

Einfluss der leberspezifischen microRNA-122 auf die Regulation der Translation der Hepatitis C Virus-RNA

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Jura Inga Henke

Diplom-Biologin

Gießen, im März 2010

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2007 bis März 2010 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Niepmann im Biochemischen Institut des Fachbereiches Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Albrecht Bindereif
Fachbereich Biologie und Chemie
Institut für Biochemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann
Fachbereich Humanmedizin
Biochemisches Institut
Justus-Liebig-Universität Gießen

Einfluss der leberspezifischen microRNA-122 auf die Regulation der Translation der Hepatitis C Virus-RNA

In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Vorgänge bei der Stimulation der Translation der Hepatitis C Virus-RNA durch die leberspezifische microRNA-122 untersucht.

Das Hepatitis C Virus (HCV) wurde im Jahr 1989 als Erreger der NonA-NonB-Hepatitis identifiziert. Weltweit sind etwa 3 % der Bevölkerung mit HCV infiziert, und 80 % der Infizierten sind nicht in der Lage, das Virus zu eliminieren. Sie entwickeln eine chronische Hepatitis, die langfristig zu Leberschäden wie einer Leberzirrhose oder sogar einem hepatozellulären Karzinom führen kann. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt keine schützende Vakzine entwickelt werden konnte und auch die therapeutischen Möglichkeiten noch immer limitiert sind, ist die detaillierte Aufklärung des HCV-Infektionszyklus absolut notwendig.

In den letzten Jahren wurde die positive Regulation des HCV-Replikationszyklus durch die leberspezifische microRNA (miR)-122 beschrieben. In unserer Arbeitsgruppe konnte dabei erstmalig gezeigt werden, dass die durch eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES)-vermittelte Translation der HCV-RNA durch die miR-122 stimuliert wird. microRNAs sind nicht codierende, kleine RNA-Moleküle, die die eukaryotische Genexpression post-transkriptionell und Gewebe- und Differenzierungsstadien-spezifisch regulieren. Nach ihrer Prozessierung aus längeren Vorläufermolekülen durch nukleäre und cytosolische Enzyme interagieren microRNAs mit komplementären Sequenzen ihrer Ziel-mRNAs und vermitteln in Abhängigkeit vom Ausmaß der Basenpaarungen deren nukleolytische Degradation oder die Inhibition ihrer Translation.

Die untranslatierten Regionen (UTRs) des HCV-Genoms weisen drei zu der miR-122 komplementäre Sequenzen auf; zwei in der 5'-UTR stromaufwärts der HCV-IRES, eine dritte in der 3'-UTR. In der vorliegenden Arbeit konnte die Stimulation der HCV-Translation durch direkte Interaktion der miR-122 mit ihren beiden Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR gezeigt werden. Die miR-122 stimuliert die HCV-Translation durch beschleunigte und dadurch vermehrte Bildung von 48S-Translations-Initiationskomplexen mit der HCV-RNA. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die HCV-RNA und die miR-122 gemeinsam in die 48S-Komplexe inkorporiert sind. Die durch die miR-122 verstärkte Assoziation der HCV-RNA mit Ribosomen zu späteren Zeitpunkten der Initiations-Phase wurde sowohl in Zell-freiem Extrakt als auch in lebenden HeLa-Zellen bestätigt.

Die Aktivierung des HCV durch Interaktion der miR-122 mit Sequenzen in der HCV-5'-UTR ist eines der wenigen Beispiele, in dem die Bindung einer microRNA an die 5'-UTR einer RNA zur Stimulation anstatt zur Repression der Translation ihrer Ziel-RNA führt. Auch wenn der molekulare Mechanismus noch nicht bekannt ist, gibt es Hinweise, dass die Modulation der microRNA-Funktion durch die Re-Organisation eines microRNA-Effektorkomplexes vermittelt wird. Bei der Suche nach Faktoren, die diesen stimulierenden Effekt der miR-122 auf die Translation der HCV-RNA übertragen, konnte ein Protein von etwa 68 kDa detektiert werden, um dessen Bindung die miR-122 mit der HCV-RNA kompetiert. Dieses Protein wurde als Heat Shock Cognate 71 kDa Protein (Hsc70) identifiziert.

In Ergänzung zu den Ergebnissen anderer Studien deuten die Beobachtungen dieser Arbeit darauf hin, dass die miR-122 einen wesentlichen Beitrag zum Gewebetropismus des HCV leistet und somit einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten bietet.

**Influence of the liver-specific microRNA-122
on translation regulation of the hepatitis C virus RNA**

In this study, the molecular mechanisms of the stimulation of hepatitis C virus RNA translation by the liver-specific microRNA-122 were investigated.

The hepatitis C virus (HCV) was discovered in 1989 as the main causative agent of the nonA-nonB-hepatitis. HCV infects an estimated 3 % of the world's population. About 80 % of infected individuals are not able to eliminate the virus. They develop a chronic hepatitis with a high risk for a long-term progress of liver diseases like liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Since a protective vaccine is not available yet and the therapeutic options are still limited, the detailed understanding of the viral life cycle is absolutely essential.

During the last years a positive regulation of the HCV life cycle by the liver-specific microRNA (miR)-122 was discovered. However, the stimulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the HCV RNA by miR-122 was initially demonstrated in our lab. microRNAs are a family of non-coding, small RNAs that regulate eukaryotic gene expression in a post-transcriptionally and a tissue- and differentiation status-specific manner. Following their maturation from longer precursor molecules by nuclear and cytoplasmic enzymes, microRNAs base-pair with complementary sequences in their target mRNAs and mediate their nucleolytic degradation or the inhibition of their translation, depending of the degree of complementarity.

The untranslated regions (UTRs) of the HCV genome contain three potential target sites for miR-122. Two of them are located in the 5'-UTR upstream of the HCV IRES, the third resides in the 3'-UTR. This study demonstrates the stimulation of HCV translation via direct interaction of miR-122 with both target sites in the HCV 5'-UTR. A kinetic analysis showed that miR-122 stimulates HCV translation by accelerating and enhancing the formation of 48S translation initiation complexes with the HCV RNA. In this context it could be shown that both HCV RNA and miR-122 are incorporated in the 48S complexes. The association of the HCV-RNA with ribosomes enhanced by miR-122 at later stages of the initiation phase was confirmed in cell-free extract as well as in living HeLa cells.

The activation of HCV by interaction of miR-122 with sequences in the HCV 5'-UTR is one of the rare cases in which the binding of a microRNA leads to stimulation rather than repression of translation of its target RNA. Although the molecular mechanism is not yet understood, there is evidence that the modulation of microRNA function is mediated by the re-organisation of the microRNA effector complex. The search for factors that confer the stimulatory effect of miR-122 on translation of the HCV RNA resulted in the discovery of a protein of about 68 kDa. miR-122 competes with the binding of this protein to the HCV RNA. This protein could be identified as the Heat Shock Cognate 71 kDa Protein (Hsc70).

The results of this work complement observations from other studies and support the hypothesis that the liver-specific miR-122 considerably contributes to the liver tropism of HCV. Therefore, further analysis of the role of miR-122 in HCV translation may lead to new therapeutic approaches.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Summary

1. Einleitung.....1

1.1 Das Hepatitis C Virus 1

 1.1.1 Struktur und genomische Organisation 2

 1.1.2 Infektionszyklus 4

1.2 Molekulare Mechanismen der Translations-Initiation 7

 1.2.1 m⁷G-Kappen-abhängige Initiation der Translation 7

 1.2.2 Interne Initiation der HCV-Translation 10

1.3 Die Rolle von microRNAs bei der Virus-Wirt-Interaktion 12

 1.3.1 Biogenese und Funktion von microRNAs 13

 1.3.2 Modulation des HCV-Replikationszyklus durch die microRNA-122 15

1.4 Ziele dieser Arbeit 18

2. Ergebnisse 19

2.1 Die leberspezifische miR-122 stimuliert die Translation der HCV-RNA durch direkte Interaktion mit beiden Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR 19

 2.1.1 Das Abfangen der endogenen miR-122 in Huh7-Zellen hat keinen Einfluss auf die HCV-Translation bei Mutation beider Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR 20

 2.1.2 Eine mutierte miR-122 kompensiert die durch Mutation beider Zielsequenzen ausbleibende Translationsstimulation der HCV-RNA in Huh7- und HeLa-Zellen .. 22

 2.1.3 Der Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation in Zellen ist unabhängig von einer translationsreprimierenden RNA-RNA-Interaktion in der HCV-RNA 26

 2.1.4 Fazit 28

2.2 miR-122 stimuliert die HCV-Translation auf dem Stadium der Initiation 29

 2.2.1 miR-122 stimuliert die HCV-Translation in der Phase der Initiation durch verstärkte Bildung von 48S-Komplexen 29

 2.2.2 miR-122 ko-migriert mit der HCV-RNA 31

 2.2.3 miR-122 beschleunigt die Assoziation der HCV-RNA mit der 40S-ribosomalen Untereinheit 33

 2.2.4 Die mutierte miR-122 verstärkt die Bildung der 80S-ribosomalen Komplexe mit der mutierten HCV-RNA in HeLa-Zellen 35

 2.2.5 Fazit 36

2.3	miR-122 beeinflusst die Interaktion der HCV-RNA mit einem Protein von 68 kDa	37
2.3.1	miR-122 vermindert die Bindung des 68 kDa-Proteins an die HCV-RNA	37
2.3.2	Das 68 kDa-Protein interagiert mit der HCV-5'-UTR	41
2.3.3	Charakterisierung des 68 kDa-Proteins	43
2.3.4	Fazit	46
2.4	Analyse von microRNA-Protein-Bindungen	47
2.4.1	Herstellung intern radioaktiv markierter microRNAs	47
2.4.2	miR-122 interagiert mit dem 68 kDa-Protein	50
2.4.3	Fazit	52
2.5	Methoden zur Identifizierung des 68 kDa-Proteins	53
2.5.1	Anreicherung der Protein-RNA-Crosslinks mit Fe(III)-IMAC (immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie)	53
2.5.2	Auftrennung der Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und anschließende MALDI-TOF-MS-Analyse der isolierten Proteine	56
2.5.3	Reinigung des 68 kDa-Proteins durch eine Kombination von Reversed Phase- Chromatographie und gelelektrophoretischer Auftrennung mit anschließender MALDI-TOF-MS-Analyse	63
	Analytische rpHPLC zur Optimierung der Gradiententrennung	63
	Anreicherung des 68 kDa-Proteins mittels präparativer rpHPLC und 2D-Gelelektrophorese zur Identifizierung durch MALDI-TOF-MS.....	67
	Anreicherung des 68 kDa-Proteins mittels präparativer rpHPLC und Isolierung über präparative 1D-Gelelektrophorese zur Identifizierung durch MALDI-TOF-MS	70
2.5.4	Fazit	81
3.	Diskussion	82
3.1	Aktivierung des Hepatitis C Virus durch die leberspezifische microRNA-122	83
3.2	Einfluss der Positionierung eines microRNA-Protein-Komplexes auf seine Funktion	85
3.3	Molekularer Mechanismus der Stimulation der Translation des Hepatitis C Virus	89
3.4	Beitrag der microRNA-122 zur Gewebespezifität des Hepatitis C Virus	92
3.5	Ansätze zur Therapie der Hepatitis C Virus-Infektion durch Inhibition der microRNA-122	94
3.6	Fazit	96

4.	Material und Methoden	97
4.1	Material	97
4.1.1	Bakterienstamm und Zelllinien	97
4.1.2	Zellextrakte	97
4.1.3	Materialien für die Zellkultur	97
4.1.4	Plasmide	98
4.1.5	Nukleotide	98
4.1.5.1	Nicht radioaktive Nukleotide	98
4.1.5.2	Radioaktive Nukleotide	98
4.1.6	Oligonukleotide	99
4.1.6.1	DNA-Oligonukleotide	99
4.1.6.2	RNA-Oligonukleotide	100
4.1.7	Enzyme	100
4.1.7.1	Restriktionsendonukleasen	100
4.1.7.2	Andere Enzyme	101
4.1.8	Größenstandards	101
4.1.8.1	DNA-Größenstandard	101
4.1.8.2	RNA-Größenstandard	101
4.1.8.3	Protein-Größenstandard	101
4.1.9	Kits	102
4.1.10	Spezielle Chemikalien und Reagenzien	102
4.1.11	Geräte und Verbrauchsmaterialien	102
4.2	Methoden	103
4.2.1	Molekularbiologische Methoden	103
4.2.1.1	Gelelektrophorese	103
4.2.1.1.1	Agarosegel-Elektrophorese	103
4.2.1.1.2	Denaturierende Agarosegel-Elektrophorese	104
4.2.1.1.3	Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese	104
4.2.1.2	Reinigung, Fällung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	104
4.2.1.2.1	Präparation von Plasmid-DNA	104
4.2.1.2.2	Proteinase K-Verdau	105
4.2.1.2.3	Phenol-Chloroform Extraktion	105
4.2.1.2.4	Alkoholfällung	105
4.2.1.2.5	DNase I-Verdau	105
4.2.1.2.6	Gelchromatographie von radioaktiv markierter RNA	106

4.2.1.3	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	106
4.2.1.3.1	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	106
4.2.1.3.2	Ligation von DNA	106
4.2.1.3.3	Dephosphorylierung von 5'-Enden	106
4.2.1.3.4	Phosphorylierung von 5'-Enden	107
4.2.1.4	RNA-Synthese <i>in vitro</i>	107
4.2.1.4.1	Anhängen einer 7-Methylguanosin-Kappe und eines poly(A)-Schwanzes an RNA	108
4.2.1.4.2	Synthese intern radioaktiv markierter microRNAs	108
4.2.1.5	PCR (Polymerasekettenreaktion)	109
4.2.1.5.1	Zielgerichtete Mutagenese mit PCR	110
4.2.1.6	Northern Blot-Analyse	111
4.2.1.6.1	Kapillartransfer der RNA und Hybridisierung mit RNA-Sonden	111
4.2.1.6.2	Elektrotransfer der RNA und Hybridisierung mit DNA-Sonden	112
4.2.1.6.3	Detektion	112
4.2.2	Methoden zur Analyse von RNA-Protein-Wechselwirkungen	113
4.2.2.1	UV-Crosslink von RNA und Proteinen	113
4.2.2.2	Diskontinuierliche Dichtegradienten-Zentrifugation	114
4.2.3	Proteinbiochemische Methoden	115
4.2.3.1	Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	115
4.2.3.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	115
4.2.3.3	Western Blot	117
4.2.3.4	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brilliant-Blau	117
4.2.3.5	Färbung von PVDF-Membranen mit Ponceaurot	117
4.2.3.6	Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i> , rpHPLC)	118
4.2.3.7	Immobilisierte Fe(III)-Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)	118
4.2.3.8	Massenspektrometrie	119
4.2.3.8.1	Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel oder auf der Membran	119
4.2.3.8.2	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Flugzeit- Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)	119
4.2.4	Zellkulturtechniken	120
4.2.4.1	Subkultivierung adhärenter eukaryotischer Zellen	120
4.2.4.2	Einfrieren eukaryotischer Zellen	120
4.2.4.3	Auftauen eukaryotischer Zellen	120

4.2.4.4	Herstellung von cytoplasmatischem Huh7-Zellysate	121
4.2.4.5	Transfektion von RNA in eukaryotische Zellen	121
4.2.4.6	Detektion der Reporterproteine Firefly- und <i>Renilla</i> -Luziferase	122
4.2.4.7	Zellviabilitätstest	123
4.2.4.8	Proteinbestimmung durch UV-Absorption	123
4.2.5	Mikrobiologische Methoden	124
4.2.5.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> XL-1 blue	124
4.2.5.2	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> XL-1 blue	124
4.2.5.3	Transformation elektrokompenter Bakterienzellen	124
4.2.5.4	Herstellung von Glycerol-Stocks	125
4.2.6	Autoradiographie	125
5.	Literaturverzeichnis	126
6.	Anhang	137
	miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR	137
	Sequenzen der microRNAs miR-122 und miR-124	138
	Mascot-Datenbankanalyse der in Kapitel 2.5.2 isolierten Proteinspots nach Auftrennung durch 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS	139
	Daten der Identifizierung des durch eine präparative rpHPLC angereicherten und über eine präparative 1D-Gelelektrophorese isolierten 68 kDa-Proteins.....	142
	Plasmidkarten	146
	Abkürzungsverzeichnis	151
	Abbildungsverzeichnis	153
	Tabellenverzeichnis	155
	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	156
	Danksagungen	157
	Eidesstattliche Erklärung	158

1. Einleitung

Viren (lat. *Virus*, Gift) sind infektiöse Partikel mit einem Durchmesser von 20 nm bis 400 nm, die aus einer Sorte Nukleinsäure, entweder DNA oder RNA, und Proteinen bestehen. Da Viren weder über einen eigenen proteinsynthetisierenden Apparat noch über energiebildende Stoffwechselsysteme verfügen, sind sie für ihre Vermehrung auf lebende Zellen angewiesen und werden daher als obligat intrazelluläre Parasiten bezeichnet. Die Virusbestandteile werden von der Wirtszelle synthetisiert, zusammengebaut und anschließend als reifes infektiöses Viruspartikel freigesetzt. Diese können je nach Mechanismus der Partikelfreisetzung entweder „nackt“ oder von einer zusätzlichen Außenhülle umgeben sein, die aus Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten der Wirtszellmembran besteht und während der Freisetzung des Viruspartikels durch das sogenannte Knospen (*Budding*) von der Zelloberfläche gebildet wird.

Viren infizieren Bakterien (dann nennt man sie Bakteriophagen), Pflanzen, Tiere und in Ausnahmefällen sogar Viren selbst (dann nennt man sie Virophagen). Sie sind Ursache unbedenklicher humaner Erkältungskrankheiten (Rhinovirus), aber auch folgenschwerer Erkrankungen wie der Grippe (Influenzavirus), der erworbenen Immunschwäche AIDS (humanes Immundefizienzvirus, HIV) oder des hämorrhagischen Fiebers (Ebolavirus). Die Existenz von Viren konnte erstmalig im Jahr 1892 mit der Entdeckung des Tabakmosaikvirus durch Dimitri I. Iwanowski bewiesen werden. Als erstes tierpathogenes Virus wurde 1897 das Maul-und Klauenseuchevirus (*foot-and-mouth disease virus*, FMDV) durch Friedrich Loeffler und Paul Frosch beschrieben, gefolgt von der Entdeckung des Erregers des Gelbfiebers.

1.1 Das Hepatitis C Virus

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation sind etwa 3 % der Weltbevölkerung mit Hepatitis C Virus (HCV) infiziert. Die Etablierung einer persistierenden Infektion der Leber wird durch den häufig asymptomatischen Verlauf einer akuten Infektion begünstigt, wodurch Infektionen nicht sofort erkannt werden können. Bei etwa 80 % der Patienten etabliert sich dann eine chronische Hepatitis, die innerhalb von etwa 20 Jahren in 10 % bis 20 % der Fälle zu der Entwicklung einer Leberzirrhose oder eines hepatozellulären Karzinoms führt (Seeff, 2002). Die Infektion mit HCV erfolgt in den meisten Fällen parenteral über Blut und Blutprodukte durch zum Beispiel Transfusionen oder Applikation intravenöser Drogen, seltener ist die sexuelle Übertragung.

Bis zu seiner molekularen Identifizierung im Jahr 1989 durch die Gruppe um Michael Houghton (Choo et al., 1989) wurde das Hepatitis C Virus den sogenannten NonA-NonB-Hepatitisviren zugeordnet, da es weder durch die Diagnostik für das Hepatitis A- noch für das Hepatitis B Virus erfasst werden konnte. Die genauere Kenntnis der molekularen Eigenschaften des HCV machte die

Einordnung dieses Virus als einziges Mitglied des Genus *Hepacivirus* in die Familie der *Flaviviridae* möglich. Zu dieser Virusfamilie zählen außer den klassischen Flaviviren wie das Gelbfiebertvirus oder das Frühsommer-Meningoencephalitis-Virus (FSME) auch die bisher noch nicht zugeordneten GB-Viren (GBV-A, GBV-B und GBV-C) und Erreger einiger schwerer Tierseuchen, die sogenannten Pestiviren (*classical swine fever virus*, CSFV oder *bovine viral diarrhoea virus*, BVDV). HCV steht in phylogenetisch engerer Beziehung zu den Pestiviren und den GB-Viren als zu den klassischen Flaviviren, was sich vor allem in der Organisation der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) widerspiegelt (Ohba et al., 1996; Simons et al., 1996), die zwischen allen HCV-Isolaten am stärksten konserviert ist.

Aufgrund der hohen genetischen Heterogenität der HCV-Isolate werden diese nach Genotypen und Subtypen klassifiziert (Simmonds et al., 2005). Man unterscheidet zwischen sechs Genotypen, deren Nukleotidsequenzen zwischen 30 % und 35 % voneinander abweichen. Die Subtypen innerhalb eines Genotyps (a, b, c und so weiter) differieren in 20 % bis 25 % ihrer Nukleotidsequenzen. Die häufigsten Varianten in den westlichen Ländern sind die Subtypen a und b des Genotyps 1 und die Subtypen a, b und c des Genotyps 2. Die große genomische Variabilität ist zum einen in dem Vorgang der homologen Rekombination und zum anderen in der hohen Fehlerrate der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des HCV, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-4} zu Basenveränderungen führt (Lohmann et al., 2000), begründet.

1.1.1 Struktur und genomische Organisation

Das Hepatitis C Virus ist ein sphärisches, membranumhülltes Partikel mit einem Durchmesser von 40 nm bis 70 nm (Abb. 1.1 A). Die viralen Glycoproteine E1 und E2 sind in die Hüllmembran inseriert, die ein ikosaedrisches Nukleokapsid, bestehend aus vielen Kopien des Core-Proteins und einer einzelnen Kopie des viralen Genoms, umgibt (Penin et al., 2004b). Die authentischen, im Patientenserum zirkulierenden HCV-Partikel sind mit triglyceridreichen Lipoproteinen, nämlich VLDL (*very low density lipoprotein*) und LDL (*low density lipoprotein*), assoziiert und werden deshalb als Lipo-Viro-Partikel (LVP) bezeichnet (Nielsen et al., 2006). Es wird angenommen, dass die Lipoproteine nicht einfach nur in der Oberfläche verankert, sondern ein integraler Bestandteil des Viruspartikels sind. Das HCV-Virion verfügt über ein lineares, einzelsträngiges RNA-Molekül mit positiver Orientierung und einer Länge von etwa 9.600 Nukleotiden (Abb. 1.1 B). Der codierende Bereich des HCV-Genoms wird von zwei stark strukturierten untranslatierten Regionen (UTRs) am 5'- und 3'-Ende flankiert, welche die zur Translation und Replikation der HCV-RNA notwendigen *cis*-regulatorischen Elemente enthalten (detaillierte Ausführung in Kapitel 1.2). Die Stem-Loops II bis IV der 5'-UTR bilden die sogenannte interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES), welche die

Translations-Initiation der HCV-RNA unabhängig von einer 5'-terminalen 7-Methylguanosin (m⁷G)-Kappe vermittelt.

Die Translation des offenen Leserahmens führt zur Synthese eines Polyproteins von etwa 3.000 Aminosäuren, an dessen aminoterminalen Ende die viralen Strukturproteine als Bestandteile des Viruspartikels lokalisiert sind und das am carboxyterminalen Ende die Nichtstrukturproteine mit enzymatischen Eigenschaften enthält. Die ko- und post-translationale Prozessierung des Polyproteins durch zelluläre und virale Proteasen führt zur Freisetzung zehn verschiedener Polypeptide (Moradpour et al., 2007). Neben dem Polyprotein ist die Expression eines durch einen alternativen Leserahmen codierten F (*frameshift*)-Proteins beschrieben worden, dessen Funktion im HCV-Infektionszyklus jedoch noch weiter untersucht werden muss (Boulant et al., 2003).

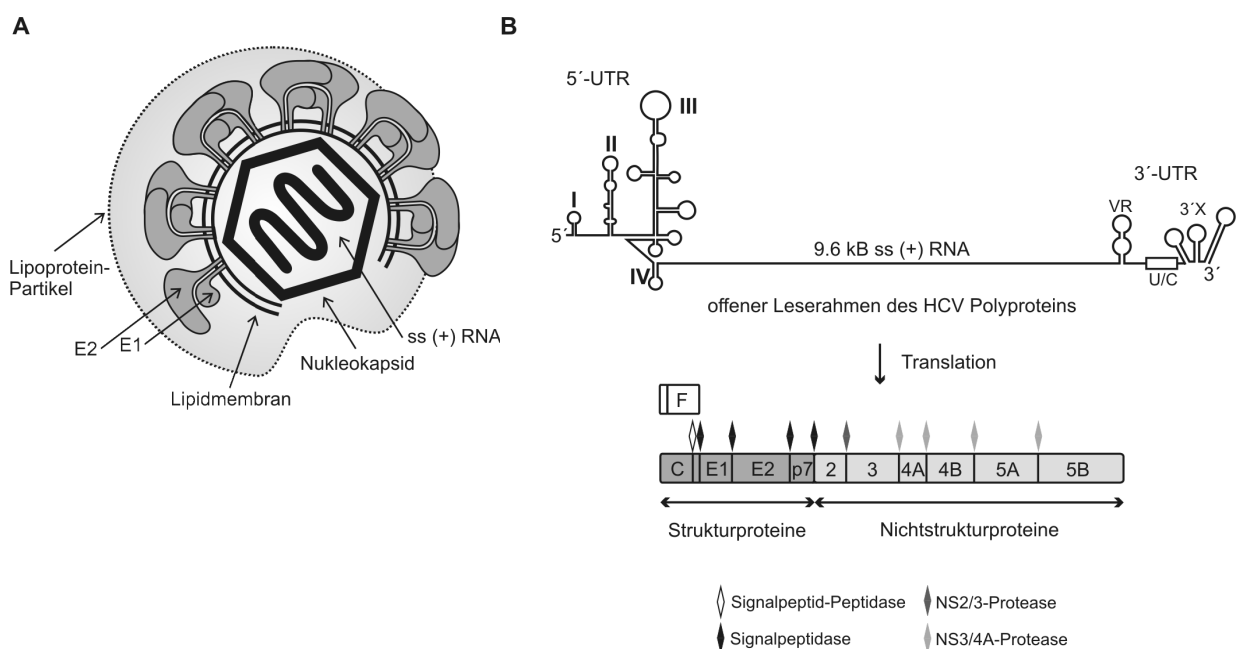


Abb. 1.1: Struktur und Genomorganisation des Hepatitis C Virus. (A) Modell des HCV-Partikels bestehend aus einer Lipidmembran, in der die viralen Glykoproteinen E1 und E2 inseriert sind, und dem Nukleokapsid aus einem Positivstrang-RNA-Genom (ss (+) RNA) komplexiert mit dem viralen Core-Protein. Das authentische HCV-Partikel ist mit Lipoprotein-Partikeln (VLDL oder LDL) assoziiert. **(B)** Schematische Darstellung der HCV-RNA und ihrer Translationsprodukte. Die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) besteht aus den Stem-Loops I bis IV, die 3'-untranslatierte Region aus der variablen Region (VR), einem poly(U/C)-Trakt (U/C) und der 3'-X-Region mit den Stem-Loops 1 bis 3. Proteasen, die an der Prozessierung des HCV-Polyproteins beteiligt sind, sind durch Rauten dargestellt. Modifiziert nach Bartenschlager et al., 2004.

Die Freisetzung der Strukturproteine erfolgt durch proteolytische Spaltung durch die zelluläre Signalpeptidase des endoplasmatischen Retikulums. Das Core-Protein wird außerdem am C-Terminus durch die Signalpeptid-Peptidase prozessiert. Das Core-Protein interagiert über basische Aminosäuren mit der viralen RNA und bildet das Nukleokapsid (Hijikata et al., 1991). Die Assoziation dieses Proteins mit sogenannten „Lipid Droplets“ scheint eine wichtige Rolle bei der Replikation der HCV-RNA und bei der Morphogenese infektiöser Viruspartikel zu haben (Boulant et

al., 2006). Außerdem wird angenommen, dass die Interaktion des Core-Proteins mit „Lipid Droplets“ Auswirkungen auf den Lipidmetabolismus der Leber hat und somit zur Entwicklung einer Steatose oder eines hepatozellulären Karzinoms beiträgt (McLauchlan, 2000). Die viralen Strukturproteine E1 und E2 sind stark glykosylierte TypI-Membranproteine und bilden durch nicht kovalente Bindungen stabile Heterodimere, welche die Grundbausteine der viralen Hülle darstellen. Das E2-Protein vermittelt die Anheftung des Viruspartikels an die Zielzelle (Rosa et al., 1996), wohingegen die Funktion des E1-Proteins im Zusammenhang mit dem auf die Adsorption folgendem Fusionsprozess diskutiert wird, bei dem das virale Genom in das Cytoplasma der Zelle entlassen wird (Garry und Dash, 2003). In dem carboxyterminalen Bereich der Strukturproteine des HCV-Polyproteins befindet sich das stark hydrophobe integrale Membranprotein p7. Es gibt Hinweise, dass dieses Protein eine Ionenkanalfunktion besitzt und in die Familie der Viroporine einzuordnen ist (Griffin et al., 2003; Pavlovic et al., 2003). Da es für eine produktive HCV-Infektion essentiell ist, wird angenommen, dass es eine wichtige Funktion bei der Reifung und Freisetzung viraler Partikel ausübt (Sakai et al., 2003).

Für die proteolytische Prozessierung der Nichtstrukturproteine NS2 bis NS5 sind zwei virale Proteasen essentiell. Die NS2-3-Autoprotease katalysiert die Spaltung zwischen NS2 und NS3, wobei der carboxyterminale Teil des NS2-Proteins und der aminoternale Teil des NS3-Proteins katalytische Aktivität aufweisen (Grakoui et al., 1993). Das NS3-Protein ist eine Serinprotease, die im Komplex mit dem Ko-Faktor NS4A alle weiteren Spaltungen des Polyproteins durchführt (Bartenschlager, 1999). Dem carboxyterminalen Teil wird jedoch auch eine NTPase/Helikase-Aktivität zugeschrieben, die wahrscheinlich bei der Endwindung der HCV-RNA für die Replikation durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B notwendig ist. Das Protein NS4B induziert die Umstrukturierung intrazellulärer Membranen zu einem Netzwerk, das als Gerüst für die Bildung des Replikationskomplexes dient (Egger et al., 2002). Über die Funktion des Phosphoproteins NS5A ist noch wenig bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass NS5A durch spezifische Protein-Protein-Interaktionen zu der Bildung eines funktionellen Replikationskomplexes beiträgt (Penin et al., 2004a).

1.1.2 Infektionszyklus

Das aktuelle Verständnis des HCV-Infektionszyklus ist teilweise noch hypothetisch und beruht unter anderem auf Studien mit dem nahe verwandten BVDV (*bovine viral diarrhea virus*) und GBV-B (GB-Virus-B). Dies ist auf das Fehlen eines geeigneten Tiermodells zur Studie der HCV-Infektion zurückzuführen. Da HCV eine sehr enge Wirtsspezifität aufweist und nur Menschen oder Schimpansen infiziert, konnte das Virus bisher ausschließlich in Mäusen mit einer chimären Leber bestehend aus murinen und humanen Hepatocyten erfolgreich vermehrt werden (Mercer et al., 2001). Daher war die Entwicklung eines Zellkultursystems, welches die HCV-Replikation effizient unterstützt, unabdingbar. Ein Durchbruch gelang mit der Entwicklung selbst replizierender

subgenomischer HCV-RNAs in der humanen Hepatomazelllinie Huh7 (Lohmann et al., 1999). Dieses Replikon-System machte die Analyse von RNA-Elementen und Proteinen des HCV und Untersuchungen zur Translation und Replikation der HCV-RNA möglich. Im Jahr 2005 gelang erstmalig die Produktion infektiöser HCV-Partikel durch Transfektion eines JFH (*japanese fulminant hepatitis*)-1 Klon in Huh7-Zellen, wodurch die Analyse des vollständigen HCV-Infektionszyklus realisierbar wurde (Wakita et al., 2005).

Die ersten Schritte im HCV-Infektionszyklus sind die Bindung des Partikels an die Wirtszelloberfläche gefolgt von der Internalisierung des viralen Genoms (Abb. 1.2). An diesen Prozessen sind verschiedene zelluläre Rezeptoren beteiligt. Das Abfangen und erste Anhaften des Viruspartikels an die Zelloberfläche erfolgt wahrscheinlich unter Beteiligung der Lektinrezeptoren DC-SIGN und L-SIGN (Gardner et al., 2003; Pöhlmann et al., 2003). Da HCV mit Lipoprotein-Partikeln (VLDL beziehungsweise LDL) assoziiert ist, geht man davon aus, dass eine stärker affine Bindung an die Zelloberfläche die Interaktion des Apolipoproteins ApoB mit Lipoprotein-bindenden Rezeptoren wie dem LDL (*low-density lipoprotein*)-Rezeptor, dem SR-BI (Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I) oder Glycosaminoglycane erfordert (Burlone und Budkowska, 2009). Für den Eintritt in die Zelle ist dann wahrscheinlich eine spezifische Interaktion des E2-Proteins der viralen Hüllmembran mit dem Tetraspanin-Rezeptor CD81 in Kooperation mit SR-BI und ein Transfer des HCV-Partikels zu den „tight junction“-Proteinen Claudin-1 und Occludin (Evans et al., 2007; Ploss et al., 2009) notwendig. Die anschließende Aufnahme in die Wirtszelle erfolgt vermutlich durch Clathrin-vermittelte Endocytose, wobei die pH-abhängige Fusion der viralen Membranhülle mit der Endosomenmembran im Zusammenhang mit dem HCV-E1-Protein diskutiert wird (Garry und Dash, 2003; Blanchard et al., 2006). Es ist allerdings noch unklar, ob die Bindung des HCV-Partikels an den LDL-Rezeptor auch direkt zur Internalisierung führt und somit einen alternativen SR-BI/CD81-unabhängigen Weg darstellt.

Durch den als „Uncoating“ bezeichneten Prozess wird das RNA-Genom in die Zelle freigesetzt und kann direkt zur HCV-IRES-vermittelten Synthese der codierten Proteine durch den zellulären Translationsapparat verwendet werden. Das dann am rauen endoplasmatischen Retikulum entstehende Polyprotein wird ko- und post-translational durch zelluläre und virale Proteasen prozessiert (siehe Kapitel 1.1.1, Abb. 1.1 B).

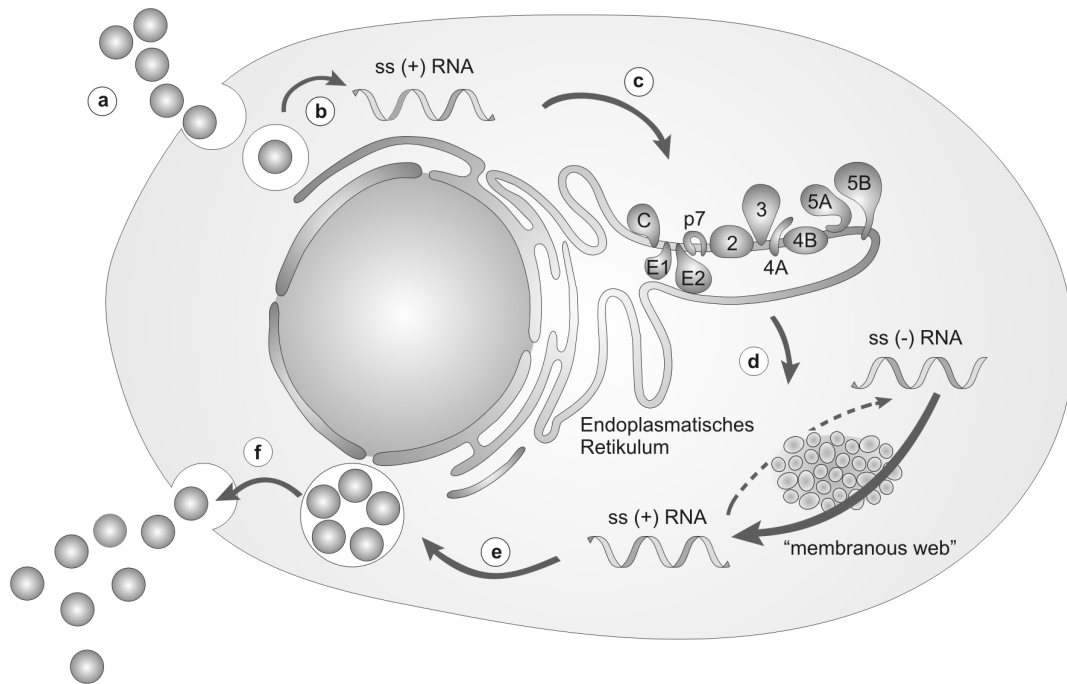


Abb. 1.2: Modell des Infektionszyklus des Hepatitis C Virus. Die Adsorption des HCV-Partikels an die Zielzelle erfolgt durch Interaktion mit spezifischen Rezeptoren auf der Zellmembran (a). Nach Aufnahme des Partikels über Clathrin-vermittelte Endocytose erfolgt die Freisetzung des HCV-Genoms in das Cytoplasma (b). Die IRES-vermittelte Translation der HCV-RNA und die Prozessierung des HCV-Polyproteins finden am endoplasmatischen Retikulum statt (c). Die Bildung der Replikationskomplexe zur Amplifikation des HCV-Genoms durch die Synthese negativ (-) und positiv (+) orientierter RNA-Moleküle erfolgt an intrazellulären Membranstrukturen, dem „membranous web“ (d). Nach der Verpackung des RNA-Genoms und dem Zusammenbau der Virusbestandteile (e) verlässt das infektiöse HCV-Partikel die Zelle wahrscheinlich über den konstitutiven sekretorischen Weg (f). Die Abläufe der Synthese und Prozessierung des HCV-Polyproteins sowie der Organisation der Replikationskomplexe und die Vervielfältigung des HCV-Genoms sind eng miteinander gekoppelte Prozesse. IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle. Modifiziert nach Moradpour et al., 2007.

In Analogie zu dem Mechanismus der RNA-Replikation anderer Flaviviren erfolgt die Amplifikation des HCV-Genoms zunächst durch die Synthese einer Negativstrang-RNA durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B. Diese bleibt vorerst in einem Doppelstrang mit ihrer Matrize verbunden und dient dann zur semikonservativen Synthese neuer Positivstrang-RNA-Genome (Bartenschlager et al., 2004). Die Bildung der Replikationskomplexe erfolgt an einem durch das HCV-NS4B-Protein induziertem Netzwerk intrazellulärer Membranen (*membranous web*), welches die Organisation des Replikationskomplexes und die lokale Konzentrierung viraler Produkte unterstützt (Gosert et al., 2003).

Da die effiziente Produktion infektiöser HCV-Partikel in Zellkultur bis vor kurzem nicht möglich war, konnte der Prozess des Zusammenbaus und der Freisetzung des Virus bisher noch nicht im Detail untersucht werden. Es wird angenommen, dass der Übergang von der Translation zur Verpackung des RNA-Genoms durch die Bindung des Core-Proteins an die 5'-UTR der HCV-RNA reguliert wird (Shimoike et al., 1999). Die Umhüllung des Nukleokapsids mit der zellulären Membran erfolgt wahrscheinlich am endoplasmatischen Retikulum und wird durch Interaktion des Core-Proteins mit dem in die Membran integrierten E1-Protein erreicht (Lo et al., 1996). Es gibt Hinweise

darauf, dass die Produktion und Freisetzung infektiöser Viren von dem Zusammenbau und der Sekretion von Lipoprotein-Partikeln abhängig ist (Huang et al., 2007a).

1.2 Molekulare Mechanismen der Translations-Initiation

Der Prozess der Translation einer eukaryotischen mRNA in ein Protein ist der finale Schritt der Genexpression und umfasst drei Stadien: Initiation, Elongation und Termination. Da die Initiation der Translation einen sehr komplexen Vorgang darstellt, der zur Bindung des 80S-Ribosoms an das Startcodon der mRNA führt, ist diese für gewöhnlich die limitierende Reaktion bei der Proteinbiosynthese.

Im Wesentlichen sind alle eukaryotischen mRNAs monocistronisch und weisen an ihrem 5'-Ende eine 7-Methylguanosin (m⁷G)-Kappe auf, die über eine 5'-5'-Triphosphat-Brücke an das erste Nukleotid der zellulären mRNA gebunden ist. Sie vermittelt unter Mitwirkung eukaryotischer Initiationsfaktoren das Heranführen der kleinen ribosomalen 40S-Untereinheit an die mRNA. Weiterhin schützt die m⁷G-Kappe die mRNA vor nukleolytischer Degradation und steuert ihren Transport aus dem Zellkern in das Cytoplasma. Der m⁷G-Kappe schließt sich ein nicht codierender Bereich von 50 bis 100 Nukleotiden an, der als 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) bezeichnet wird. Dem offenen Leserahmen folgt dann eine 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) und eine monotone Folge von 100 bis 250 Adenin-Nukleotiden. Dieses poly(A)-Ende hat eine wichtige Funktion bei der Regulation der Translation und dient außerdem zur Stabilisierung der mRNA (Jackson und Standart, 1990; Knapinska et al., 2005). Alternativ zu der m⁷G-Kappe kann die Translation an einer internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) am 5'-Ende der RNA initiiert werden, welche die Rekrutierung ribosomaler Komplexe an das Startcodon oder in seine direkte Nähe unterstützt.

1.2.1 m⁷G-Kappen-abhängige Initiation der Translation

Die m⁷G-Kappen-abhängige Initiation der Translation ist eine komplexe Reaktion, zu deren Steuerung mehrere eukaryotische Initiationsfaktoren (eIFs) benötigt werden (Tab. 1.1). Vor Beginn der Initiation muss das Ribosom in seine Untereinheiten dissoziieren (Abb. 1.3). Dies wird durch die Bindung von eIF1A und eIF3 an die 40S-Untereinheit erreicht, wodurch die Anlagerung der 60S-Untereinheit zunächst blockiert wird. Durch die Bindung des ternären Komplexes, bestehend aus der Methionin-beladenen Initiator-tRNA (Met-tRNA_i) und dem an GTP gekoppelten eIF2, an die 40S-ribosomale Untereinheit erfolgt im nächsten Schritt die Bildung des 43S-Präinitiationskomplexes (Hershey und Merrick, 2000). Das Heranführen dieses Komplexes an die 5'-terminale m⁷G-Kappe der mRNA wird durch einen Komplex aus eIF4E, eIF4G und eIF4A vermittelt, die man zusammen als eIF4F bezeichnet. Die Bindung an die m⁷G-Kappe erfolgt zwar durch das Kappen-Bindeprotein

eIF4E, die eigentliche Brücke zum Präinitiationskomplex wird allerdings durch das Adapter-Protein eIF4G und seine Bindung an den an die 40S-Untereinheit gebundenen Initiationsfaktor eIF3 gebildet (Korneeva et al., 2000). Durch die gleichzeitige Interaktion von eIF4G mit dem an das 3'-Ende der mRNA bindende poly(A)-Bindeprotein PABP wird die Zirkularisierung der mRNA eingeleitet und die 3'-UTR in unmittelbare Nähe der 5'-UTR gebracht (Wells et al., 1998). Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus die Rezyklierung der Ribosomen und ihre Rekrutierung zur 5'-UTR fördert und zur Kontrolle eines intakten 3'-Endes der mRNA dient (Niepmann, 2009a).

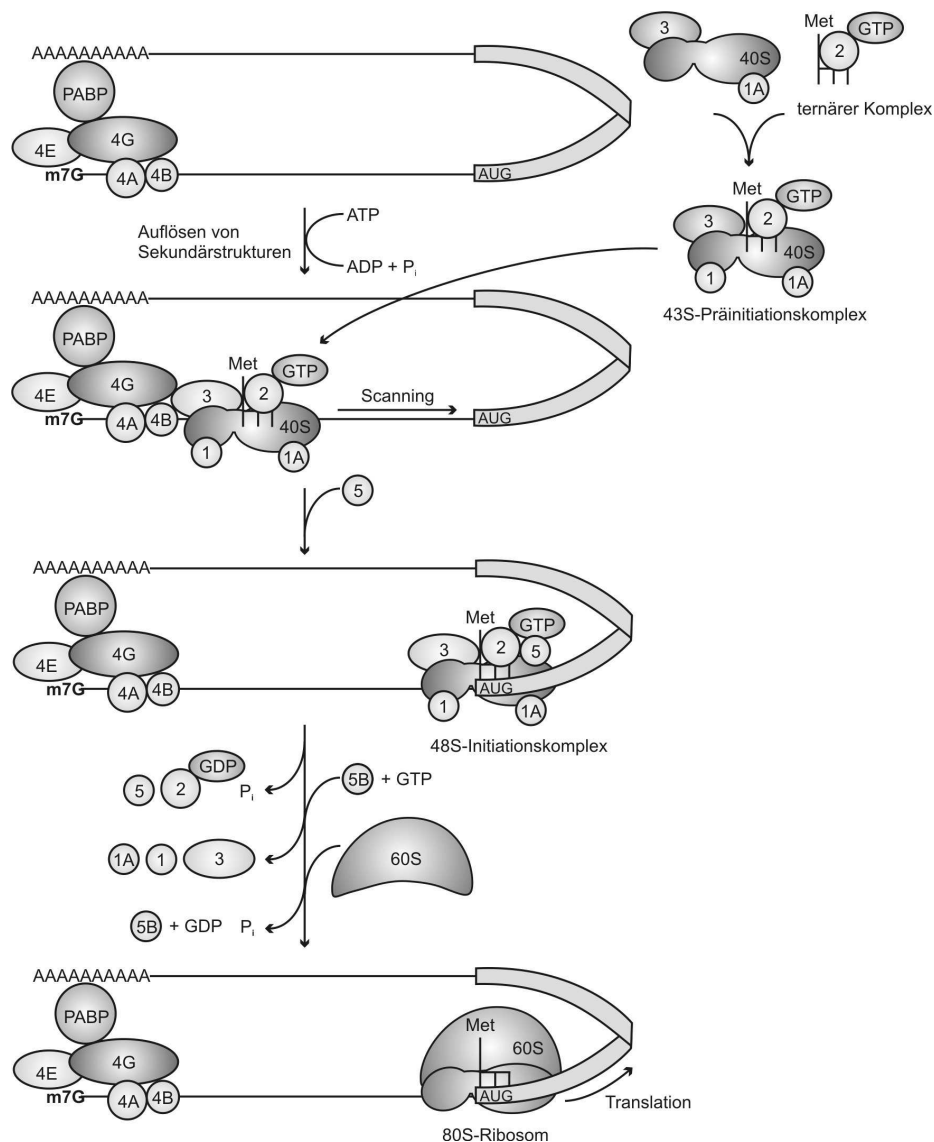


Abb. 1.3: Der Mechanismus der m⁷G-Kappen-abhängigen Translations-Initiation bei Eukaryoten. Modifiziert nach Hershey und Merrick, 2000; Gebauer und Hentze, 2004. Met, Methionin; PABP, poly(A)-bindendes Protein; AUG, Startcodon.

Das nun folgende Absuchen (*Scanning*) der 5'-mRNA-Sequenz nach einem AUG-Triplett (Startcodon) in einem optimalen Nukleotid-Kontext durch den Präinitiationskomplex erfordert die Auflösung von Sekundärstrukturen durch die RNA-Helikase eIF4A unter Verbrauch von ATP

(Rozen et al., 1990). Für die Auswahl des korrekten Startcodons sind die Initiationsfaktoren eIF1 und eIF1A essentiell (Pestova et al., 1998a). Kommt es zu einer Basenpaarung zwischen dem Startcodon und dem Anticodon der Met-tRNA_i, erfolgt die eIF5-vermittelte GTP-Hydrolyse und die daraus resultierende Dissoziation des Faktors eIF2/GDP. Die Phase der Translations-Initiation wird dann durch die Anlagerung der 60S-Untereinheit an die 40S-Untereinheit und die Dissoziation aller anderen Initiationsfaktoren, katalysiert durch eIF5B, abgeschlossen (Unbehaun et al., 2004).

Tab. 1.1: Überblick über die eukaryotischen Translations-Initiationsfaktoren (eIFs).

eIF	Untereinheiten	Größe [kDa]	Funktion
eIF1		12,6	Erkennung des AUG Positionierung der Met-tRNA _i an AUG
eIF1A		16,5	Dissoziation der 40S- und 60S-Untereinheit Bindung der Met-tRNA _i an 40S-Untereinheit Scanning
eIF2	2 α	36,2	Bildung des ternären Komplexes eIF2/GTP/Met-tRNA _i
	2 β	39,0	
	2 γ	51,8	
eIF2B	2B α	33,7	Guanosin-Nukleotid-Austauschfaktor Regeneration von eIF2/GDP
	2B β	39,0	
	2B γ	50,4	
	2B δ	57,8	
	2B ϵ	80,2	
eIF3	12 ¹⁾	~ 730,0	Dissoziation der 40S- und 60S-Untereinheit Bindung der Met-tRNA _i und mRNA an 40S-Untereinheit
eIF4A		44,4	RNA-Helikase
eIF4B		69,2	Ko-Faktor von eIF4A Stimulation der RNA-Helikase-Aktivität
eIF4E		25,1	Bindung der 5'-terminalen 7-Methylguanosin-Kappe
eIF4G		171,6	Adapter-Protein aminoterminal Domäne bindet eIF4E und PABP zentrale Domäne bindet eIF3 und eIF4A carboxyterminale Domäne bindet eIF4A und Mnk1
eIF4F			Proteinkomplex aus eIF4A, eIF4E und eIF4G
eIF5		48,9	GTPase-Aktivität Dissoziation von eIF2/GDP Codon/Anticodon-Interaktion
eIF5B		139,0	GTPase-Aktivität, Anlagerung der 60S-Untereinheit, Bildung des 80S-Ribosoms

¹⁾ Die eIF3-Untereinheiten sind nach ihrem Migrationsverhalten im SDS-Gel benannt: p170, p116, p110, p66, p48, p47, p44, p40, p36, p35, p28, p67, GA17 (Hinnebusch, 2006).

PABP, poly(A)-bindendes Protein; Mnk1, *MAP kinase-interacting serine/threonine protein kinase*.
Zusammengestellt aus Hershey und Merrick, 2000.

1.2.2 Interne Initiation der HCV-Translation

Entgegen der Hypothese, dass die Initiation der Translation durch eukaryotische Ribosomen nur in Abhängigkeit einer 5'-terminalen m⁷G-Kappe erfolgen kann, konnte die interne Translations-Initiation picornaviraler RNA durch sogenannte interne ribosomale Eintrittsstellen (IRES) in zahlreichen Studien demonstriert werden (Jang et al., 1988; Pelletier und Sonenberg, 1988). IRES-Elemente sind Regionen mit einer ausgeprägten Sekundärstruktur und ermöglichen einem im Cytoplasma replizierenden RNA-Virus eine effiziente Translation, ohne auf die mRNA-Prozessierungsmaschinerie des Zellkerns oder eigene RNA-modifizierende Enzyme angewiesen zu sein. Auch einige zelluläre mRNAs nutzen diesen alternativen Mechanismus, um ihre Translation zum Beispiel bei zellulärem Stress oder eingeleiteter Apoptose unabhängig von einer m⁷G-Kappe zu initiieren (Baird et al., 2006). Die Klassifikation der viralen IRES-Elemente erfolgt aufgrund ihrer Primärsequenz und ihrer Sekundärstruktur. Die IRES-Elemente der Picornaviren werden in vier Gruppen eingeteilt; Typ I-Elemente der Enteroviren (Poliovirus, Rhinovirus), Typ II-Elemente der Cardio- und Aphthoviren (EMCV, FMDV), Typ III-Elemente der Hepatoviren (Hepatitis A Virus) und Typ IV-Elemente der Teschoviren (Porcine Teschovirus), die eine starke strukturelle Homologie zu flaviviralen IRES-Elementen (Hepatitis C Virus, Pestiviren) aufweisen (Jang, 2006; Niepmann, 2009a).

Die 5'-UTR ist zwischen allen HCV-Isolaten hoch konserviert und besteht aus den strukturellen Domänen I bis IV (Abb. 1.4) und zwei Oligopyrimidin-Trakten, wovon sich einer zwischen den Domänen II und III und einer in der apikalen Blase der Domäne III befindet (Brown et al., 1992). Durch Interaktion des ersten Oligopyrimidin-Traktes mit 3'-terminalen Sequenzen der Domäne III wird die Domäne IV gebildet, die das authentische Startcodon (AUG) und ein Stück der für das Core-Protein codierenden Sequenz enthält. Im Gegensatz zu den meisten RNA-Viren, deren Genome ein 3'-terminales poly(A)-Ende aufweisen, wird das 3'-Ende der HCV-RNA durch eine charakteristische 3'-UTR mit einer Länge von etwa 220 Nukleotiden gebildet. Diese ist hoch strukturiert und besteht aus drei Domänen: einer nicht konservierten, variablen Region, einer UC-reichen Sequenz und einer stark konservierten 3'X-Region, die aus drei Stem-Loop-Strukturen gebildet wird (Ito und Lai, 1997). Obwohl die 3'-UTR für die effiziente Replikation des RNA-Genoms essentiell ist (Yi und Lemon, 2003), wird ihre Funktion bei der HCV-Translation kontrovers diskutiert. Einige Studien sprechen für eine translationsverstärkende Funktion der 3'-UTR (Bradrick et al., 2006; Song et al., 2006), wohingegen eine andere Studie einen negativen Einfluss der 3'-UTR auf die Translation zeigen konnte (Murakami et al., 2001). In einer kürzlich veröffentlichten Studie aus unserem Labor wurde nachgewiesen, dass die HCV-3'-UTR auch die Initiation der Translation an der zur HCV-IRES strukturell homologen PTV (Porcine Teschovirus)-IRES stimuliert (Bung et al., 2010).

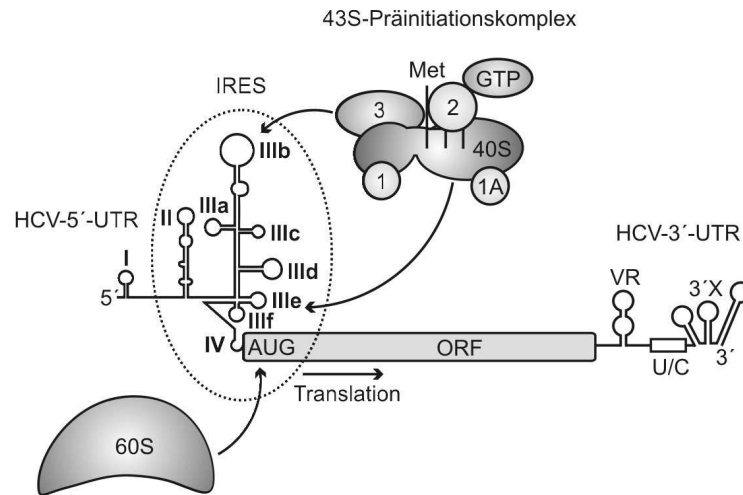


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Translations-Initiation an der HCV-IRES. Gezeigt ist die HCV-RNA mit der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) bestehend aus den Stem-Loops I bis IV. Die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) ist aus der variablen Region (VR), dem poly(U/C)-Trakt und der aus drei Stem-Loops gebildeten konservierten 3'-X-Region aufgebaut. Die Domänen II bis IV der 5'-UTR bilden das IRES-Element mit dem authentischen Startcodon AUG, an dem die Translation initiiert wird. IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; ORF, offener Leserahmen des HCV-Polyproteins; Met, Methionin.

Das eigentliche IRES-Element der 5'-UTR wird von den Domänen II bis IV gebildet. Eine zusätzliche Rolle des Stem-Loops I bei der HCV-Translation wird kontrovers diskutiert. Einige Studien gehen davon aus, dass das Vorhandensein und die korrekte Faltung des Stem-Loop I die IRES-vermittelte Translation unterstützt (Fukushi et al., 1994; Luo et al., 2003), wohingegen andere Studien von einer translationsinhibierenden Funktion ausgehen (Rijnbrand et al., 1995; Grassmann et al., 2005). Weiterhin konnten die Stem-Loops I und II als *cis*-regulatorisch notwendige Elemente für die RNA-Replikation identifiziert werden (Friebe et al., 2001).

Die apikale Region der Domäne II sowie die Regionen d, e und f der Domäne III binden die kleine 40S-ribosomale Untereinheit in Abwesenheit aller eIFs und bringen die Untereinheit in direkte Nähe des Startcodons (Pestova et al., 1998b; Kieft et al., 2001) (Abb. 1.4). Diese Bindung wird durch Interaktion von eIF3 mit den Domänen III a, b und c unterstützt, die gleichzeitig essentiell für die Bildung vollständiger 80S-Ribosomen ist. Somit wird der eIF4F-Proteinkomplex (eIF4E, eIF4G und eIF4A) funktionell durch das IRES-Element ersetzt. Es gibt Hinweise darauf, dass die eIF2-vermittelte Lieferung der Met-tRNA_i zu den ribosomalen Komplexen an der HCV-RNA bei Stress-induzierter Inaktivierung von eIF2 umgangen werden kann, die Initiation dann also nach einem prokaryotischen Mechanismus erfolgt (Terenin et al., 2008). Zur Unterstützung der internen Translations-Initiation rekrutiert die HCV-IRES zusätzlich zelluläre Proteine, die sogenannten ITAFs (*IRES trans-acting factors*) wie das La-Protein oder hnRNPL (heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein L), die durch Bindung an codierende Sequenzen der HCV-RNA die Translation stimulieren (Niepmann, 2009a).

1.3 Die Rolle von microRNAs bei der Virus-Wirt-Interaktion

microRNAs (miRNAs) bilden eine große Familie nicht codierender, einzelsträngiger RNAs von etwa 22 Nukleotiden Länge, die eine wichtige Funktion bei der Sequenz-spezifischen post-transkriptionellen eukaryotischen Genregulation durch Inhibition der Proteinsynthese oder Degradation der mRNA haben. Es wird davon ausgegangen, dass die Expression von etwa 30 % der humanen mRNAs durch miRNAs in einer Gewebe- und Entwicklungsstadien-spezifischen Weise reguliert wird (Lagos-Quintana et al., 2002; Lewis et al., 2005).

Abgesehen von Eukaryoten encodieren auch virale Genome miRNAs, was für eine wichtige Rolle der miRNA-vermittelten Repression von mRNAs bei der Interaktion zwischen Viren und ihren Wirtszellen spricht. Der negativ regulatorische Effekt viraler miRNAs auf die Synthese viraler oder zellulärer Proteine scheint die produktive Vermehrung beziehungsweise eine persistierende Infektion des Virus oder eine Immunevasion zu begünstigen. So ist zum Beispiel die EBV (Epstein-Barr-Virus)-encodierte miRNA miR-BART2 durch Repression der viralen DNA-Polymerase essentiell für die Aufrechterhaltung einer latenten Infektion (Barth et al., 2008). Die Interferenz der HCMV (humanes Cytomegalievirus)-miR-UL112 mit der zellulären mRNA des MICB (*major histocompatibility complex class I-related chain B*)-Gens bewirkt hingegen die verminderte Erkennung und Eliminierung Virus-infizierter Zellen durch natürliche Killerzellen und stellt somit einen Mechanismus dar, die wirtsspezifische Immunantwort zu umgehen (Stern-Ginossar et al., 2007).

Obwohl der Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) bei Pflanzen und Invertebraten ein wichtiger Teil der antiviralen Immunantwort ist, gibt es nur wenige Hinweise auf eine Rolle zellulärer miRNAs bei der Virusabwehr in Säugetierzellen. In einer Studie aus 2005 konnte gezeigt werden, dass die zelluläre miR-32 die Vermehrung des Primaten-Foamy-Virus Typ 1 (PFV-1) durch Interaktion mit Sequenzen in der PFV-3'-UTR signifikant inhibiert (Lecellier et al., 2005) und somit dessen Vermehrung in der Zelle kontrolliert. Einige Beobachtungen weisen jedoch darauf hin, dass Viren in der Lage sind, die zelluläre miRNA-Funktion zu ihrem eigenen Vorteil zu nutzen. Huang und Ko-Autoren konnten zeigen, dass die Repression der Expression HIV (humanes Immundefizienzvirus)-encodierter Proteine durch die zellulären miRNAs miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223 und miR-382 anscheinend ausschlaggebend für eine erfolgreiche latente Infektion ruhender CD4⁺-Zellen ist (Huang et al., 2007b).

1.3.1 Biogenese und Funktion von microRNAs

Einen Großteil der miRNA-Population stellen endogene Transkripte der RNA-Polymerase II oder III von unabhängigen Transkriptionseinheiten dar (Lee et al., 2004; Borchert et al., 2006), oder die miRNAs werden von pre-mRNA-Introns prozessiert (Bartel, 2004). Ihre Reifung erfolgt in zwei Schritten, katalysiert durch die beiden RNase III-Endonukleasen Droscha und Dicer. Diese Ribonukleasen spalten spezifisch doppelsträngige RNA und hinterlassen dort eine 5'-Phosphatgruppe und einen 3'-Überhang von zwei Nukleotiden Länge (Conrad und Rauhut, 2002). Die Prozessierung der primären Transkripte (pri-miRNAs, *primary microRNAs*) beginnt im Nukleus und wird durch die nukleäre RNase III Droscha und ihrem Doppelstrang-RNA-bindenden Ko-Faktor DGCR8 (auch bekannt als Pasha bei *D. melanogaster*) vermittelt (Han et al., 2004) (Abb. 1.5). Die entstehenden Vorläufer-miRNAs von etwa 70 Nukleotiden Länge (pre-miRNAs, *precursor microRNAs*) verlassen den Nukleus über Exportin5/Ran-GTP (Yi et al., 2003) und werden im Cytoplasma durch den Dicer/TRBP-Komplex (Dicer1/Loquacious-Komplex bei *D. melanogaster*) zu kurzen miRNA-Duplexen von etwa 22 Nukleotiden Länge prozessiert (Chendrimada et al., 2005).

miRNAs führen ihre Funktion als Komponenten von miRNA-Ribonukleoprotein (miRNP)-Komplexen aus, die als Schlüsselkomponenten Argonaute-Proteine (Ago 1 bis 4) wahrscheinlich in Assoziation mit dem „P-body“-Protein GW182 enthalten (Hutvagner und Simard, 2008; Carthew und Sontheimer, 2009). Der Strang des miRNA-Duplexes, dessen 5'-Ende an dem thermodynamisch weniger stabilen Ende des RNA-Duplexes liegt, verbleibt als funktionelle, reife miRNA im miRNP-Komplex, wohingegen der andere Strang verworfen wird (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Für diesen Prozess sind die Proteine Dicer und TRBP absolut notwendig. Innerhalb des miRNP-Komplexes ist die miRNA mit ihrem 3'-Ende in der PAZ-Domäne und mit dem 5'-Phosphat in der MID-Domäne des Ago-Proteins verankert (Wang et al., 2008b). Die Erkennung der Ziel-mRNA durch den miRNP-Komplex erfolgt dann durch die Paarung der frei zugänglichen „seed“-Sequenz der miRNA (Nukleotide 2 bis 8) mit komplementären Sequenzen in der mRNA. Bis auf einige Ausnahmen befinden sich in tierischen mRNAs alle Ziel-Sequenzen in den 3'-UTRs (Lewis et al., 2003). Die Funktion des miRNP-Komplexes ist dann abhängig von dem Ausmaß der Basenpaarungen zwischen der miRNA und der entsprechenden Ziel-mRNA. Weist die miRNA eine perfekte Komplementarität zu der mRNA auf, kommt es zur endonukleolytischen Spaltung der mRNA zwischen den Basen gegenüber den Nukleotiden 10 und 11 der miRNA. Die PIWI-Domäne der Ago-Proteine weist Gemeinsamkeiten mit der RNase H auf und besitzt damit endonukleolytische Eigenschaften (Song et al., 2004). Allerdings wurde Ago 2 als einziges Mitglied der humanen Ago-Familie mit dieser sogenannten „Slicer“-Aktivität identifiziert (Meister et al., 2004b). Im Gegensatz dazu resultiert eine nicht perfekte Basenpaarung zwischen der miRNA und Sequenzen der 3'-UTR der Ziel-mRNA in der exonukleolytischen Degradation der mRNA oder der Inhibition ihrer Translation (Doench und Sharp, 2004). Auffallend ist, dass tierische miRNAs die Expression ihrer

Ziel-mRNAs fast ausnahmslos durch unvollständige Paarung regulieren, wohingegen pflanzliche miRNAs im allgemeinen eine vollständige Komplementarität zu ihren Ziel-mRNAs aufweisen und ihren endonukleolytischen Abbau, ähnlich dem siRNA (*small interfering RNA*)-Mechanismus, vermitteln (Pillai et al., 2007).

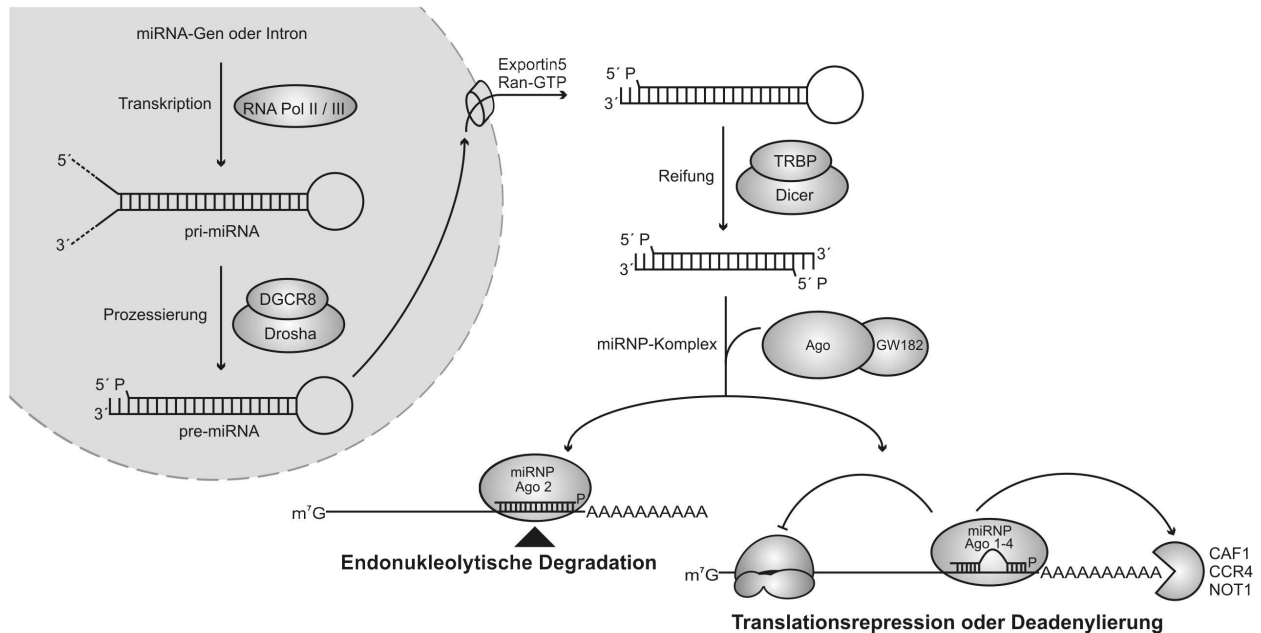


Abb. 1.5: Modell der Biogenese von microRNAs und ihrer Funktion. Die Prozessierung der primären miRNA-Transkripte (pri-miRNAs) zu miRNA-Vorläufern (pre-miRNAs) erfolgt durch das nukleäre Enzym Drosha und seinen Ko-Faktor DGCR8. Durch Interaktion mit Exportin5 und Ran-GTP wird der Transport der pre-miRNAs in das Cytoplasma vermittelt, wo eine weitere Prozessierung durch den Dicer/TRBP-Komplex zu miRNA-Duplexen und der Einbau der reifen miRNAs in miRNP (miRNA-Ribonukleoprotein)-Komplexe erfolgt. Die Schlüsselkomponenten dieser miRNP-Komplexe sind Proteine der Argonaute-Familie (Ago 1-4), die in Assoziation mit dem „P-body“-Protein GW182 die Repression der Ziel-mRNAs vermitteln. Die vollständige Paarung der miRNA an die Ziel-mRNA führt zu einem Ago 2-gekoppelten endonukleolytischen Abbau der mRNA, wohingegen eine unvollständige Paarung zur Inhibition der Translation durch den Ago (1-4)/GW182-Komplex oder zur Deadenylierung der mRNA durch den Deadenylase-Komplex CAF1:CCR4:NOT1 mit anschließender Entfernung der m⁷G-Kappe und exonukleolytischer Degradation der mRNA führt. Modifiziert nach Carthew und Sontheimer, 2009; Filipowicz et al., 2008; Winter et al., 2009.

Die post-transkriptionelle Genregulation in Tierzellen durch unvollständig paarende miRNAs umfasst unterschiedliche Mechanismen, die zurzeit noch kontrovers diskutiert werden (Chekulaeva und Filipowicz, 2009). Es gibt Hinweise, dass die miRNA-vermittelte Inhibition der Translation ihrer Ziel-mRNAs in der Phase der frühen Initiation stattfindet, wobei die kooperative Wirkung der Initiationsfaktoren eIF4E (m⁷G-Kappen-Bindeprotein) und eIF4G mit dem poly(A)-bindenden Protein PABP auf die polyadenylierte und mit einer m⁷G-Kappe versehene mRNA gestört wird (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005; Wang et al., 2006; Mathonnet et al., 2007; Thermann und Hentze, 2007; Wakiyama et al., 2007). Damit geht die Identifizierung eines m⁷G-Kappen-Bindemotifs des Ago 2-Proteins einher, das möglicherweise an der Repression der Translations-Initiation durch

die verhinderte Rekrutierung von eIF4E beteiligt ist (Kiriakidou et al., 2007). Andere Beobachtungen zeigen, dass miRNAs den Zusammenschluss der ribosomalen Untereinheiten unter Beteiligung des anti-Assoziations-Faktors eIF6 unterbinden (Chendrimada et al., 2007; Wang et al., 2008a). Die Assoziation miRNA-reprimierter mRNAs mit Polyribosomen weist allerdings auf eine post-initiative Translationsinhibition hin (Maroney et al., 2006). Es ist jedoch noch unklar, ob die Inhibition der Proteinsynthese durch eine verfrühte Termination der Translation und ein Abfallen der Ribosomen von der mRNA (Petersen et al., 2006) oder durch den Abbau des wachsenden Polypeptides durch Rekrutierung von Proteasen (Nottrott et al., 2006) verursacht wird. Als weiterer möglicher Mechanismus wird die durch miRNAs induzierte Deadenylierung von mRNAs diskutiert, die zum Verlust der m⁷G-Kappe und zur Degradation der mRNA führt (Wu et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung des Deadenylase-Komplexes CA1:CCR4:NOT1 an die Ziel-mRNA durch GW182 (GW, Glycin-Tryptophan-Wiederholungen) vermittelt wird (Behm-Ansmant et al., 2006). Auf die Deadenylierung folgt dann die Entfernung der m⁷G-Kappe durch den „Decapping“-Komplex DCP1:DCP2 und die exonukleolytische Degradation durch die 5′-3′-Exonuklease Xrn1. Mit der mRNA-destabilisierenden Funktion von miRNAs geht einher, dass Komponenten des miRNA-Effektorkomplexes zusammen mit miRNA-reprimierten mRNAs in cytosolischen Aggregaten, sogenannten „P-bodies“ (*processing bodies*), gefunden wurden (Liu et al., 2005; Sen und Blau, 2005). „P-bodies“ sind dynamische Strukturen, die als Orte des mRNA-Abbaus (Sheth und Parker, 2003) und auch als Depot reprimierter mRNAs gelten, die bei Bedarf zur Translationsmaschinerie zurückgeführt werden (Bhattacharyya et al., 2006).

1.3.2 Modulation des HCV-Replikationszyklus durch die microRNA-122

Die miRNA (miR)-122 (Sequenz siehe Anhang) repräsentiert etwa 70 % der gesamten miRNA-Population in dem Gewebe der Leber und ist in anderen Geweben wie Herz, Gehirn, Darm und Milz nur in geringen Mengen vorhanden oder nicht detektierbar (Lagos-Quintana et al., 2002). Da sie in großen Mengen in ausdifferenzierten Hepatocyten exprimiert wird (135.000 Kopien/humane Zelle, 66.000 Kopien/murine Zelle), nimmt man an, dass sie für die Etablierung eines bestimmten Genexpressionsmusters zur Aufrechterhaltung dieses Differenzierungsstadiums notwendig ist (Chang et al., 2004). In der kultivierbaren humanen Hepatomazelllinie Huh7 ist die Expressionsrate der miR-122 stark reduziert (16.000 Kopien/Zelle), wohingegen miR-122 in der Hepatomazelllinie HepG2 fast nicht detektierbar ist (< 140 Kopien/Zelle). Eine reduzierte Expression der miR-122 steht in enger Beziehung zu der Disregulation der Expression des Zellzyklus-steuernden Proteins Cyclin G1, die vermutlich mit der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms zusammenhängt (Gramantieri et al., 2007). In zwei voneinander unabhängigen Studien konnte bereits gezeigt werden,

dass miR-122 ein wichtiger Regulator des Cholesteroll- und Fettsäuremetabolismus ist (Krützfeldt et al., 2005; Esau et al., 2006).

HCV scheint die miR-122 zu seinem eigenen Vorteil zu nutzen, und zwar in einer Weise, die weder zur Inhibition der Translation noch zur Degradation der HCV-RNA führt, sondern die Synthese der viralen Proteine und die Vermehrung der viralen RNA aktiviert (Jopling et al., 2005; Henke, Goergen et al., 2008). Die untranslatierten Regionen des HCV-Genoms weisen drei zu der miR-122 komplementäre Sequenzen auf (Abb. 1.6 A). Zwei dieser Sequenzen befinden sich zwischen dem ersten und zweiten Stem-Loop der HCV-5'-UTR (ACACUCC und CACUCC), die dritte liegt in der variablen Region der HCV-3'-UTR (ACACUCC). Obwohl sich HCV als RNA-Virus durch eine sehr hohe Mutationsrate auszeichnet, sind diese potentiellen Bindungsstellen der miR-122 zwischen allen HCV-Isolaten absolut konserviert (siehe Anhang), was fast zwingend auf eine funktionelle Bedeutung dieser Sequenzen hindeutet. In der Studie von Jopling und Ko-Autoren konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation der HCV-RNA in der Hepatomazelllinie Huh7 durch die Sequenz-spezifische Inhibition der endogenen miR-122 durch 2'-O-methylierte Gegenstrang-Oligoribonukleotide signifikant reduziert wurde. Durch das Einführen von Mutationen in die zu der miR-122 komplementären Sequenzen der HCV-UTRs konnten die miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR als Determinanten für diesen Effekt identifiziert werden (Jopling et al., 2008). Da in einem separaten experimentellen Ansatz kein Effekt der miR-122 auf die Translation einer HCV-Replikon-RNA beobachtet werden konnte, kamen die Autoren zu dem Schluss, dass die RNA-Replikation, nicht aber die Translation des HCV durch die miR-122 stimuliert wird.

Die experimentellen Umstände der Jopling-Studie sprachen jedoch dafür, dem Resultat der Translationsexperimente kritisch gegenüberzustehen und eine mögliche Modulation der HCV-Translation durch die miR-122 erneut zu untersuchen. Durch die Verwendung monocistronischer HCV-Reporter-RNAs, in denen das Firefly-Luziferase-Reportergen von den für die HCV-Translation notwendigen *cis*-regulatorischen Elementen flankiert war, konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen von Jopling und Ko-Autoren eine Aktivierung der HCV-Translation durch die miR-122 gezeigt werden (Diplomarbeit J.I. Henke, 2006; Henke, Goergen et al., 2008). Das Abfangen der endogenen miR-122 mittels 2'-O-methylierter Gegenstrang-Oligoribonukleotide (anti-miR-122) führte in der humanen Hepatomazelllinie Huh7 zu einer Abnahme der Translationseffizienz der HCV-Reporter-RNAs (Abb. 1.6 B). Im Gegensatz dazu konnte die Translation der Wildtyp-HCV-Reporter-RNA in der Nicht-Leberzelllinie HeLa durch exogene miR-122 gesteigert werden (Abb. 1.6 C). Die Verwendung von Oligoribonukleotiden anderer Sequenzen hatte keinen Effekt auf die Translationseffizienzen der HCV-RNAs. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Jopling-Studie konnten die Determinanten für den positiven Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation durch Mutation der zu der miR-122 komplementären Sequenz in der variablen Region der HCV-3'-UTR (mut bulge und closed stem) in der HCV-5'-UTR lokalisiert werden (Abb. 1.6 B).

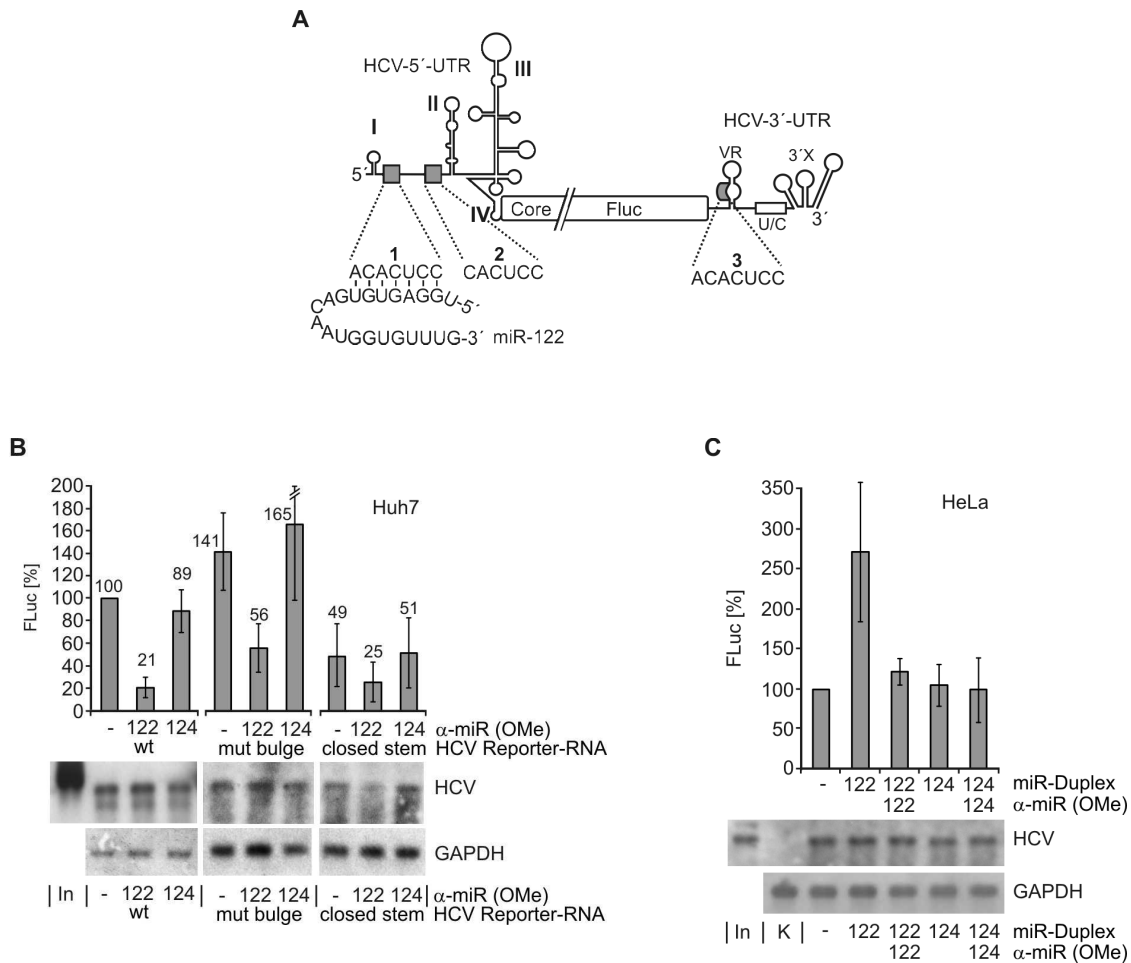


Abb. 1.6: Die leberspezifische miR-122 stimuliert die Translation monocistronischer HCV-Reporter-RNAs. **(A)** Schematische Darstellung der Wildtyp-HCV-Reporter-RNA mit der codierenden Sequenz des Firefly-Luziferase-Reporterproteins (FLuc) flankiert von den für die HCV-Translation und Replikation notwendigen untranslatierten Regionen (UTRs). Die konservierten und zu der miR-122 komplementären Sequenzen (graue Kästen) liegen zwischen dem Stem-Loop I und II der 5'-UTR und in der variablen Region (VR) der 3'-UTR. Core, Teil der HCV-Core-Protein codierenden Sequenz. **(B)** Expression der Firefly-Luziferase (FLuc) der HCV-Reporter-RNAs vier Stunden nach der Transfektion in Huh7-Zellen in Abwesenheit und Anwesenheit der 2'-O-methylierten Oligoribonukleotide (OMe) anti-miR-122 oder anti-miR-124. wt; konservierte miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'- und 3'-UTR, mut bulge; mutierte miR-122-Zielsequenz in der HCV-3'-UTR mit Erhalt des unteren Stem-Loops der VR, closed stem; mutierte miR-122-Zielsequenz in der HCV-3'-UTR ohne Erhalt des unteren Stem-Loops der VR. **(C)** Expression der Firefly-Luziferase (FLuc) der Wildtyp-HCV-Reporter-RNA vier Stunden nach der Transfektion in HeLa-Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit synthetischer miRNA-Duplexe miR-122 oder miR-124 und ihrer 2'-O-methylierten (OMe) Gegenstrang-Oligoribonukleotide anti-miR-122 beziehungsweise anti-miR-124. Unten: Stabilitätskontrollen der HCV-FLuc-Reporter-RNA und der mRNA der Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) durch Northern Blot von re-extrahierter RNA aus transfizierten Zellen. Modifiziert aus Henke, Goergen et al., 2008.

Die kontroversen Ergebnisse hinsichtlich eines Effektes der miR-122 auf die HCV-Translation sind wahrscheinlich in der Wahl des Reporter-Konstruktes begründet. Jopling und Ko-Autoren verwendeten in ihren Translationsexperimenten ein dicistronisches HCV-Replikon-Konstrukt, bei dem die 5'-terminale HCV-IRES die Translation des HIV (humanes Immundefizienzvirus)-Tat-Proteins vermittelt, wohingegen die stromabwärts liegende picornavirale EMCV (Encephalomyocarditisvirus)-IRES die Translation der HCV-Nichtstrukturproteine kontrolliert. Die

Aktivität der HCV-IRES kann somit indirekt über die Tat-Protein-vermittelte Expression eines separaten SEAP (sezernierte alkalische Phosphatase)-Reportergens gemessen werden. Detaillierte Untersuchungen aus unserem Labor zeigten jedoch, dass picornavirale IRES-Elemente auch die Translation eines stromaufwärts liegenden Gens durch Weitergabe von Initiationsfaktoren oder Ribosomen verstärken können (Jünemann et al., 2007). Im Gegensatz zu monocistronischen Systemen, in denen sich Mutationen in der HCV-IRES direkt auf die Translation des zu messenden Reportergens auswirken, können Translationsdifferenzen eines unter Kontrolle der HCV-IRES translatierten Reportergens in dicistronischen Replikon-Konstrukten durch Verwendung einer picornaviralen IRES ausgeglichen werden. Es ist somit möglich, dass den Autoren der Jopling-Studie ein Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation entgangen ist.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen sollte in der vorliegenden Arbeit eine funktionelle Interaktion der leberspezifischen miR-122 mit den Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR und die der Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 zugrunde liegenden molekularen Mechanismen näher untersucht werden. Dazu wurde in verschiedenen experimentellen Ansätzen folgenden Fragen genauer nachgegangen:

- I. Basiert die Translationsstimulation auf der direkten Bindung der miR-122 an die Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR und sind beide miR-122-Zielsequenzen an diesem Effekt beteiligt?
- II. Auf welchem Stadium der Translation überträgt die miR-122 ihre aktivierende Wirkung auf die HCV-RNA?
- III. Ist die Translationsstimulation durch eine Chaperon-ähnliche Funktion der miR-122 und eine damit einhergehende Konformationsänderung der HCV-5'-UTR bedingt, oder ist die Modulation der miRNA-Funktion auf eine Re-Organisation von Proteinen, zum Beispiel Komponenten des miRNP-Komplexes, an der HCV-5'-UTR zurückzuführen?

2. Ergebnisse

2.1 Die leberspezifische miR-122 stimuliert die Translation der HCV-RNA durch direkte Interaktion mit beiden Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR

microRNAs (miRNAs) sind an der eukaryotischen post-transkriptionellen Genregulation beteiligt. Normalerweise paaren miRNAs mit ihren Nukleotiden 2 – 8, der sogenannten „seed“-Region, an komplementäre Sequenzen der 3'-UTR ihrer Ziel-mRNAs und reprimieren ihre Translation, wohingegen eine vollständige Paarung der miRNA zum Abbau der Ziel-mRNA führt (Chekulaeva und Filipowicz, 2009). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die leberspezifische microRNA-122 (miR-122), im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Mechanismen, die Translation der HCV-RNA stimuliert (Henke, Goergen et al., 2008). Die untranslatierten Regionen (UTRs) der HCV-RNA weisen drei zu der „seed“-Region der miR-122 komplementäre und konservierte Sequenzen auf und stellen somit potentielle Interaktionsstellen der miR-122 mit der HCV-RNA dar. Zwei dieser Sequenzen befinden sich zwischen dem ersten und zweiten Stem-Loop der 5'-UTR, die dritte liegt in der variablen Region der 3'-UTR (Abb. 2.1 A). Durch das Einführen von Mutationen in die miR-122-Zielsequenz der HCV-3'-UTR wurde nachgewiesen, dass diese Sequenz an der Regulation der HCV-Translation durch die miR-122 nicht beteiligt ist und die Determinanten somit in der HCV-5'-UTR lokalisiert sein müssen (Diplomarbeit J.I. Henke, 2006; Henke, Goergen et al., 2008).

In diesem Teil der Arbeit sollte eine direkte Interaktion der miR-122 mit ihren Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR und die damit zusammenhängende Stimulation der HCV-Translation gezeigt werden.

Dazu wurden Reporter-RNAs generiert, in denen die erste, zweite oder beide miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR mutiert waren und somit eine Interaktion mit der „seed“-Sequenz der miR-122 auszuschließen war. Diese RNAs wurden in Transfektionsexperimenten mit der humanen Hepatomazelllinie Huh7, welche endogene miR-122 enthält, und mit der humanen cervikalen Karzinomen Zelllinie HeLa, in der keine miR-122 detektierbar ist, verwendet (Abb. 2.1 B). Um einen Einfluss anderer translationsregulatorischer Elemente auf die HCV-IRES-gesteuerte Translation zu vermeiden, wurden monocistronische Reporter-RNAs eingesetzt (Jünemann et al., 2007), die für die effiziente Translation des Firefly-Luziferase-Reportergens (FLuc) außer der HCV-5'-UTR auch die HCV-3'-UTR mit einem der HCV-RNA entsprechenden, authentischen 3'-Ende (Song et al., 2006) enthielten (Abb. 2.1 A). Da der 3'-terminale Teil der HCV-IRES funktionell in die codierende Sequenz des HCV-Core-Proteins übergeht (Reynolds et al., 1995), enthielten die RNAs außerdem einen Teil der für das Core-Protein codierenden Sequenz. Zur Freisetzung eines funktionellen Firefly-Luziferase (FLuc)-Reporterproteins aus dem somit synthetisierten Core-FLuc-Fusionsprotein war die für Ubiquitin codierende Sequenz vor das Luziferasegen fusioniert. Durch die Spaltung des Ubiquitins an seinem carboxyterminalen Ende durch zelluläre Proteasen erfolgt die Freisetzung der Firefly-Luziferase mit einem korrekten aminoterminalen Ende.

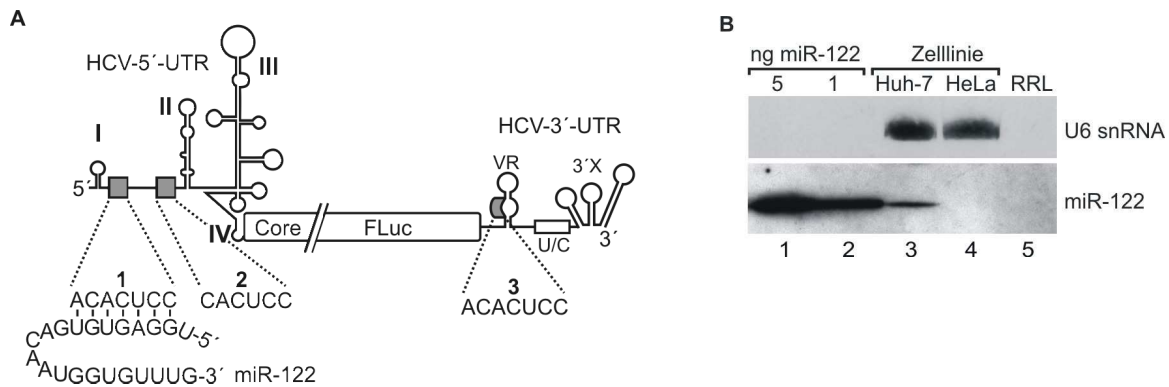


Abb. 2.1: Die untranslatierten Regionen der HCV-RNA weisen drei potentielle Interaktionsstellen für die miR-122 auf. (A) Schematische Darstellung der monocistronischen HCV-Reporter-RNA HCV-FLuc-3'-UTR. Die codierende Sequenz der Firefly-Luziferase (FLuc) wird flankiert von der HCV-5'-UTR (Stem-Loops I bis IV) mit einem Teil der für das HCV-Core-Protein codierenden Sequenz und der HCV-3'-UTR bestehend aus der variablen Region (VR), einem poly(U/C)-Trakt und der 3'X-Region mit den Stem-Loops 1 - 3. Zur Anpassung der Bildgröße wurde der Core-Ubiquitin-FLuc-Leserahmen unterbrochen gezeichnet. Gezeigt sind außerdem die miR-122 und ihre konservierten Zielsequenzen in der HCV-5'- und 3'-UTR (graue Kästen). **(B)** Detektion der miR-122 in Huh7- und HeLa-Zellen sowie in Nuklease-behandeltem Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL) mittels Northern Blot-Analyse. Zur Auftragskontrolle wurde die U6 snRNA (*small nuclear RNA*) nachgewiesen. Zum Vergleich wurden oben angezeigte Mengen einer synthetischen miR-122 verwendet. A und B verändert aus Henke, Goergen et al., 2008.

2.1.1 Das Abfangen der endogenen miR-122 in Huh7-Zellen hat keinen Einfluss auf die HCV-Translation bei Mutation beider Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR

Die Sequenz-spezifische Inhibition von miRNAs durch Gegenstrang-Oligoribonukleotide ist eine effiziente Methode zur Untersuchung von miRNA-Funktionen *in vitro* und *in vivo* (Davis et al., 2006; Meister et al., 2004a). Dabei wird ein Oligoribonukleotid mit bestimmter Sequenz durch eine im miRNP (miRNA-Ribonukleoprotein)-Komplex vorliegende miRNA aufgrund der Nukleotid-komplementarität erkannt und irreversibel gebunden. Durch die Bindung werden speziell diese miRNP-Komplexe austitriert und stehen dann nicht mehr als miRNA-Effektorkomplexe zur Verfügung (Hutvagner et al., 2004). Die Voraussetzungen hierfür sind eine schnelle und stabile Bindung des Oligoribonukleotides an die miRNA und seine Resistenz gegenüber zellulären Ribonukleasen, was durch das Einführen einer Methyl-Gruppe an der Hydroxygruppe des zweiten Kohlenstoffatoms der Ribose erreicht wird (Inoue et al., 1987). Durch die Verwendung eines zu der miR-122 komplementären 2'-O-Me (2'-O-methylierten)-Oligoribonukleotids (anti-miR-122) wurde bereits demonstriert, dass das Abfangen der endogenen miR-122 in Huh7-Zellen die Translation monocistronischer HCV-Reporter-RNAs signifikant herabsetzt und dass dieser Effekt Sequenz-spezifisch und Dosis-abhängig ist (Diplomarbeit J.I. Henke, 2006; Henke, Goergen et al., 2008). Daraus wurde geschlossen, dass die miR-122 die Translation des HCV stimuliert.

Um zu belegen, dass die Determinanten für den Effekt der anti-miR-122 in Huh7-Zellen in der HCV-5'-UTR liegen und somit die dortigen miR-122-Zielsequenzen beteiligt sind, wurden HCV-Reporter-RNAs mit Mutationen in beiden miR-122-Zielsequenzen der 5'-UTR (Abb. 2.2 A) zusammen mit der anti-miR-122 in Huh7-Zellen transfiziert und die Aktivität der Firefly-Luziferase nach vier Stunden gemessen. Da die mutierten Reporter-RNAs nur eine (5mut1 und 5mut2) oder keine (5mut1,2) Interaktionsstelle für die miR-122 aufweisen, sollte ein Abfangen der endogenen miR-122 keine signifikante Translationsinhibition dieser RNAs verursachen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die allgemeine Translationseffizienz der Reporter-RNAs HCV-FLuc-3'-UTR 5mut1, 5mut2 und 5mut1,2 im Vergleich zu der der Wildtyp-RNA stark verringert war (Abb. 2.2 B). Dies spricht für die Bedeutung beider miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR bei der Regulation der HCV-Translation. Als Folge der Inhibition der endogenen miR-122 durch die anti-miR-122 ging die Translationseffizienz der Wildtyp-Reporter-RNA stark zurück (Abb. 2.2 B). Die Aktivität der Firefly-Luziferase nahm durch die Ko-Transfektion der anti-miR-122 um etwa 80 % ab. Wie erwartet verursachte das Abfangen der endogenen miR-122 bei den Reporter-RNAs 5mut1 und 5mut2 nur eine leichte Abnahme der Translationseffizienz (um etwa 10 %). In Übereinstimmung damit zeigte die doppelt mutierte Reporter-RNA 5mut1,2 keine Antwort auf die Ko-Transfektion der anti-miR-122. Da 2'-O-Me-Oligoribonukleotide potentiell cytotoxisch sind und das Zellwachstum negativ beeinflussen können (Davis et al., 2006), sollte durch Ko-Transfektion eines 2'-O-Me-Oligoribonukleotids komplementär zur gehirnspezifischen miR-124 (anti-miR-124) ausgeschlossen werden, dass die Translationsrepression der Reporter-RNAs eine Folge der Transfektion eines 2'-O-Me-Oligoribonukleotids im Allgemeinen war und statt dessen auf die Sequenz-spezifische Inhibition der endogenen miR-122 durch die anti-miR-122 zurückzuführen ist. Weder bei der Wildtyp-Reporter-RNA noch bei den mutierten Reporter-RNAs (5mut1, 5mut2 und 5mut1,2) zeigte sich eine signifikante Verminderung in der Expression der Firefly-Luziferase als Folge der Ko-Transfektion der zur miR-122 unverwandten anti-miR-124 (Abb. 2.2 B). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Translationsrepression der HCV-Reporter-RNAs auf die spezifische Inaktivierung der miR-122 durch die anti-miR-122 zurückzuführen ist.

Durch dieses Experiment wurde nachgewiesen, dass die Sequenz-spezifische Inhibition der endogenen miR-122 in Huh7-Zellen die Translation einer HCV-Reporter-RNA mit Mutationen in beiden zu der miR-122 komplementären Sequenzen nicht beeinflusst. Die Tatsache, dass die Translationseffizienz der Reporter-RNAs mit Mutationen in einer oder beiden miR-122-Zielsequenzen der HCV-5'-UTR in Huh7-Zellen stark abfällt, lässt vermuten, dass eine Translationsstimulation durch die endogene miR-122 nicht mehr stattfinden kann. Beide Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR für den positiven Effekt der leberspezifischen miR-122 auf die HCV-Translation von Bedeutung sind.

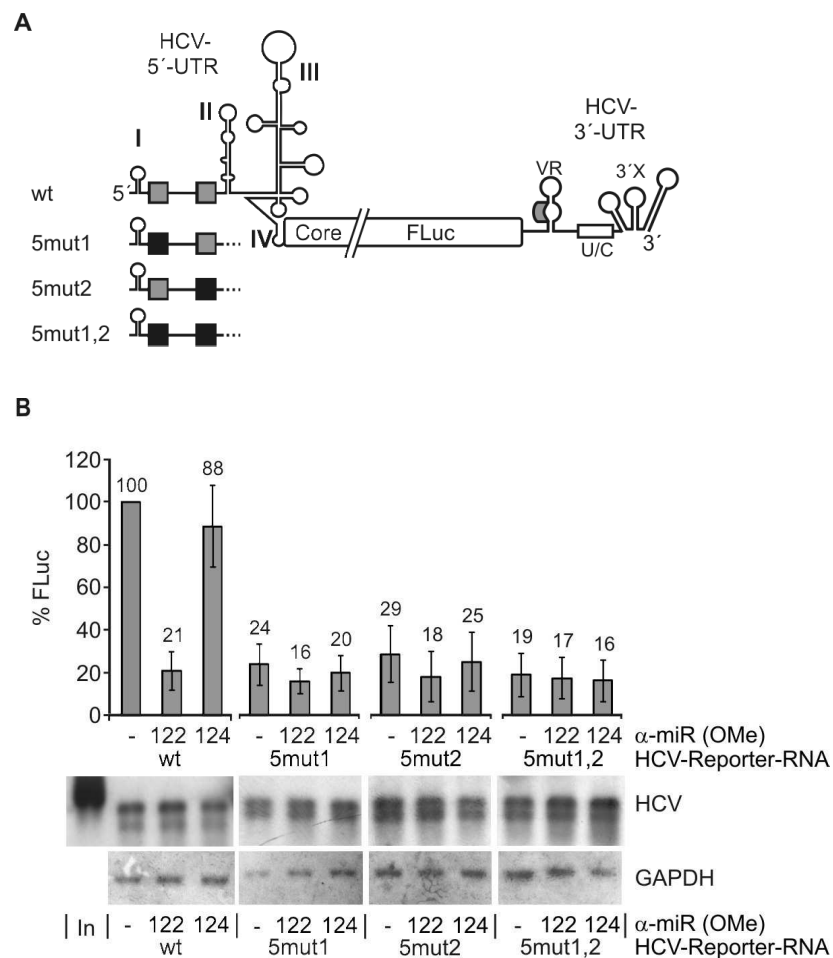


Abb. 2.2: Die Determinanten für die Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 liegen in der HCV-5'-UTR. (A) Schematische Darstellung der monocistronischen HCV-Reporter-RNAs mit den konservierten (graue Kästen) und den mutierten (schwarze Kästen) miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR. FLuc, Firefly-Luziferase; Core, Teil der codierenden Sequenz des HCV-Core-Proteins. **(B)** Expression der Firefly-Luziferase (FLuc) der HCV-Reporter-RNAs vier Stunden nach der Transfektion in Huh7-Zellen in Abwesenheit und Anwesenheit der 2'-O-methylierten Oligoribonukleotide (OMe) anti-miR-122 oder anti-miR-124. Die gemessenen Aktivitäten der Firefly-Luziferase wurden auf die Expressionswerte einer ko-transfizierten mRNA der *Renilla*-Luziferase normalisiert. Die HCV-Reporter-RNAs sowie anti-miR-122 und anti-miR-124 wurden mit 400 ng/well transfiziert. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten. Unten: Stabilitätskontrollen der HCV-FLuc Reporter-RNA und der mRNA der Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) durch Northern Blot von re-extrahierter RNA aus transfizierten Zellen. A und B verändert aus Henke, Goergen et al., 2008.

2.1.2 Eine mutierte miR-122 kompensiert die durch Mutation beider Zielsequenzen ausbleibende Translationsstimulation der HCV-RNA in Huh7- und HeLa-Zellen

Um eine direkte Interaktion der miR-122 mit ihren Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR nachzuweisen, wurde eine mutierte miR-122 mu entworfen, deren „seed“-Sequenz komplementär zu den Zielsequenzen in den mutierten HCV-Reporter-RNAs ist (Abb. 2.3). Durch die Wiederherstellung der Basenpaarungen zwischen der miR-122 und der HCV-RNA sollte eine Stimulation der Translation wieder möglich werden. Dazu wurden miRNA-Duplexe mit einem 3'-Überhang von zwei Nukleotiden Länge generiert, die in der Zelle mit Proteinen zu miRNP-

Komplexen zusammgebaut und durch eine Helikase entwunden werden, sodass sie im Effektor-Komplex als einzelsträngige, reife miRNAs ihre Funktion ausüben können (Filipowicz et al., 2008). Diese miRNA-Duplexe wurden zusammen mit der Wildtyp- und den mutierten HCV-Reporter-RNAs in Huh7- und HeLa-Zellen transfiziert und die Aktivität der Firefly-Luziferase nach vier Stunden gemessen.

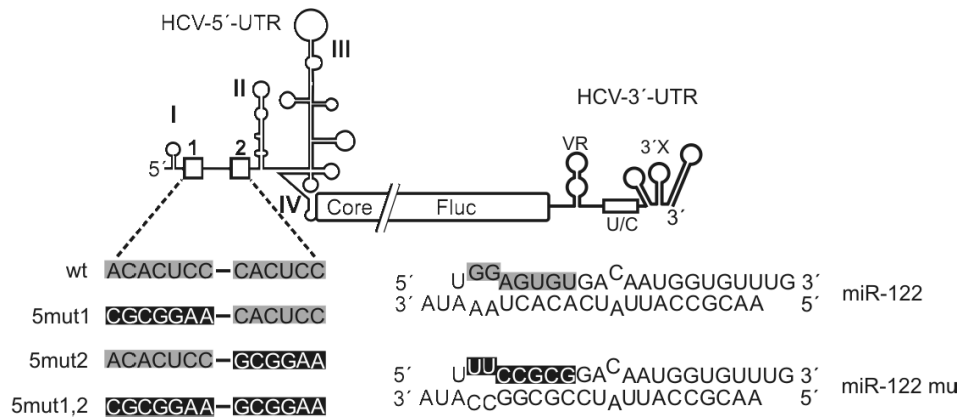


Abb. 2.3: Die miR-122-Zielsequenzen und ihre Substitutionsmutanten in der HCV-5'-UTR. Dargestellt sind die konservierten (grau) und mutierten (schwarz) miR-122-Zielsequenzen zwischen den Stem-Loops I und II der HCV-Reporter-RNAs sowie Duplexe der miR-122 und miR-122 mu mit kompensatorischen Mutationen der „seed“-Sequenz (schwarz). FLuc, Firefly-Luziferase; Core, Teil der codierenden Sequenz des HCV-Core-Proteins.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Ko-Transfektion synthetischer miR-122-Duplexe in Huh7-Zellen, zusätzlich zu der endogenen miR-122, die Translationseffizienz der Wildtyp-HCV-RNA auf etwa das Dreifache erhöhte, wohingegen Duplexe der miR-122 mu oder der gehirnspezifischen miR-124 keinen Effekt auf die Translation hatten (Abb. 2.4 A). Das Erhöhen des Gehalts an miR-122 in Huh7-Zellen stimulierte also die HCV-Translation. Auch in diesem Experiment sank die Translationseffizienz der mutierten HCV-Reporter-RNAs 5mut1, 5mut2 und 5mut1,2 gegenüber der Wildtyp-RNA um etwa 50 – 70 % ab. Durch Ko-Transfektion synthetischer miR-122 mu-Duplexe konnte die Translationseffizienz der Reporter-RNA 5mut1 auf etwa das Dreifache und die der Reporter-RNA 5mut2 auf etwa das Zweifache gesteigert werden. Auch die Zugabe authentischer miR-122-Duplexe hatte bei beiden RNAs einen leicht stimulierenden Effekt. Im Gegensatz dazu konnte die Reporter-RNA 5mut1,2 durch Ko-Transfektion von Duplexen der miR-122 mu auf mehr als das Dreifache verstärkt werden, wobei eine Stimulation durch authentische miR-122-Duplexe vollständig ausblieb. Eine Ko-Transfektion von Duplexen der gehirnspezifischen miR-124 zeigte bei keiner der mutierten HCV-Reporter-RNAs einen Effekt (Abb. 2.4 A).

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 auf der direkten Interaktion der miR-122 mit ihren Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR basiert, da die Translation der HCV-Reporter-RNAs mit mutierten miR-122-Zielsequenzen durch eine kompensatorisch mutierte miR-122 mu in Huh7-Zellen stimuliert werden konnte. Die Reporter-

RNAs 5mut1 und 5mut2 enthalten jeweils eine Wildtyp- und eine mutierte miR-122-Zielsequenz und wurden sowohl von der authentischen miR-122 als auch von der mutierten miR-122 mu stimuliert. Dies spricht dafür, dass beide miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR an der Translationsregulation beteiligt sind. Beide RNAs weisen nur eine Interaktionsstelle für eine entsprechende miRNA auf. Daher entsprach die Effizienz der Translationsstimulation dieser RNAs weder durch die miR-122 noch die miR-122 mu dem Ausmaß der Translationsstimulation der Wildtyp-RNA durch die miR-122. Im Gegensatz dazu wurde die Translation der doppelt mutierten HCV-RNA 5mut1,2 durch Ko-Transfektion der mutierten miR-122 mu im gleichen Ausmaß stimuliert wie die Wildtyp-HCV-RNA durch die Wildtyp-miR-122.

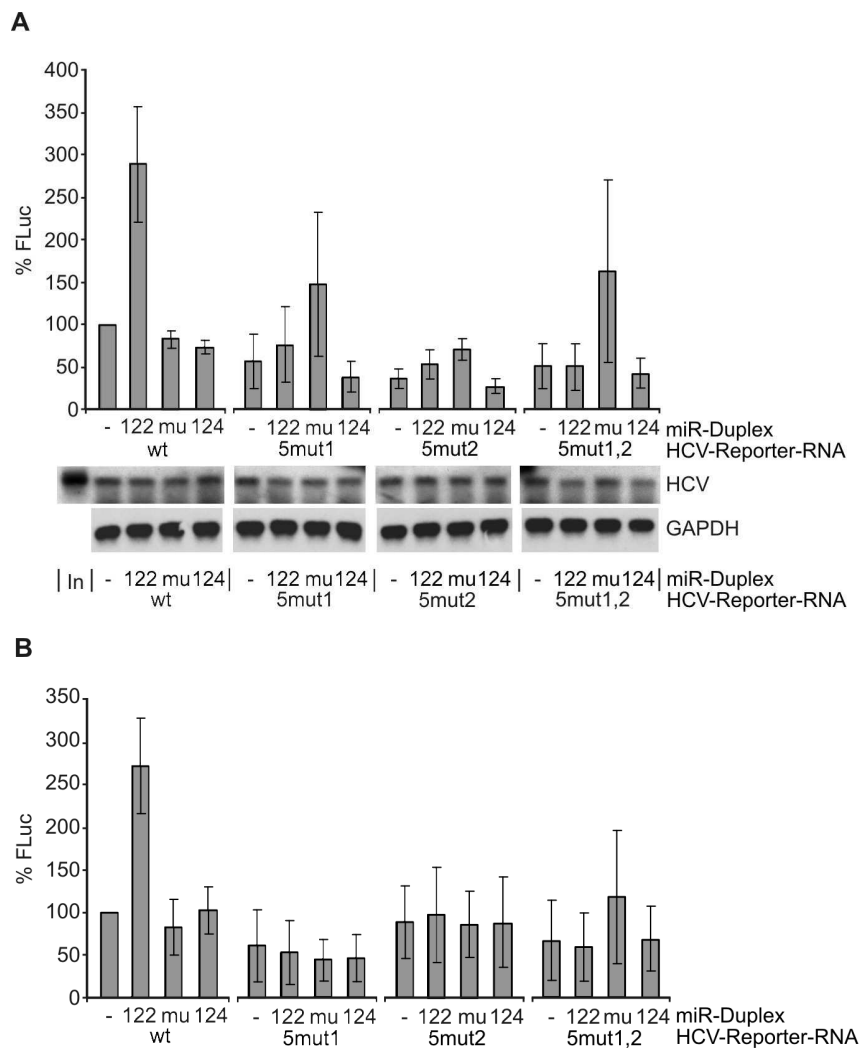


Abb. 2.4: miR-122 stimuliert die HCV-Translation durch Interaktion mit beiden Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR. Expression der Firefly-Luziferase (FLuc) der HCV-Reporter-RNAs vier Stunden nach der Transfektion in Zellen in Anwesenheit der Duplexe miR-122, miR-122 mu oder miR-124. **(A)** Huh7-Zellen. Die gemessenen Aktivitäten der Firefly-Luziferase wurden auf die Expressionswerte einer ko-transfizierten mRNA der *Renilla*-Luziferase normalisiert. Die Reporter-RNAs sowie die miRNA-Duplexe wurden mit 400 ng/well transfiziert. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten. Weiterhin sind RNA-Stabilitätskontrollen durch Northern Blot gezeigt. Verändert aus Henke, Goergen et al., 2008. **(B)** HeLa-Zellen. Die Normalisierung der gemessenen Firefly-Luziferase-Aktivitäten erfolgte durch Messung des Gesamtproteingehaltes oder durch den WST-1 Test. Die Reporter-RNAs sowie die miRNA-Duplexe wurden mit 300 ng/well transfiziert. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs voneinander unabhängigen Experimenten.

In Übereinstimmung mit der Tatsache, dass HCV ausschließlich Hepatocyten infiziert (Perrault und Pecheur, 2009), ist die Beobachtung, dass die Translationseffizienz der HCV-RNA in HeLa-Zellen im Vergleich zu Huh7-Zellen stark verringert ist (Song et al., 2006). Eine mögliche Ursache könnte sein, dass HeLa-Zellen keine endogene miR-122 enthalten und somit eine positive Regulation der Translation der HCV-RNA ausbleibt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Translation monocistronischer HCV-Reporter-RNAs in HeLa-Zellen durch die Ko-Transfektion von miR-122-Duplexen stimuliert wird (Diplomarbeit J.I. Henke, 2006; Henke, Goergen et al., 2008).

Die hier dargestellten Ergebnisse aus Transfektionen von HeLa-Zellen bestätigen diese Beobachtung (Abb 2.4 B). Die Ko-Transfektion von miR-122-Duplexen verstärkte die Translation der Wildtyp-HCV-Reporter-RNA auf das Zwei- bis Dreifache und damit in einem, mit der Translationsstimulation in Huh7-Zellen vergleichbaren Ausmaß (Vergleich Abb. 2.4 A und B). Die Ko-Transfektion von Duplexen der mutierten miR-122 mu oder der gehirnspezifischen miR-124 hatte auch in dieser Zelllinie keinen Effekt auf die HCV-Translation. Da die Translationsstimulation anscheinend durch direkte Interaktion der miR-122 mit ihren Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR erfolgt, sollten die HCV-Reporter-RNAs mit Mutationen in den miR-122-Zielsequenzen durch die komplementär mutierte miR-122 mu ebenfalls stimuliert werden. Die Translation der Reporter-RNA 5mut1,2 konnte durch die Zugabe von Duplexen mutierter miR-122 mu auf das Zweifache gesteigert werden. Dies entspricht in etwa der Effizienz der Translationsstimulation der Wildtyp-Reporter-RNA durch die authentische miR-122. Die Interaktion der mutierten miR-122 mu mit beiden zu ihr komplementären Sequenzen in der HCV-RNA 5mut1,2 kann also den Verlust der Translationsstimulation durch die Wildtyp-miR-122 fast vollständig ausgleichen. Die Ko-Transfektion von Duplexen authentischer miR-122 oder gehirnspezifischer miR-124 hatte erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Translation der doppelt mutierten HCV-RNA. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Ergebnis aus den Transfektionsexperimenten mit Huh7-Zellen überein (Vergleich Abb. 2.4 A und B). Ein anderes Bild ergibt sich bei den Reporter-RNAs 5mut1 und 5mut2, bei denen jeweils nur eine miR-122-Zielsequenz mutiert war. Hier konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Huh7-Zellen weder eine Stimulation durch die miR-122 noch durch die kompensatorisch mutierte miR-122 mu beobachtet werden. Anscheinend ist die Interaktion der miR-122 mit nur einer Zielsequenz in der HCV-5'-UTR in HeLa-Zellen für eine Translationsstimulation der Reporter-RNAs nicht ausreichend. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutsamkeit *beider* Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR für die Translationsregulation der HCV-RNA durch die miR-122. Die Translationseffizienz der mutierten HCV-RNAs gegenüber der Wildtyp-RNA war in HeLa-Zellen im Vergleich zu Huh7-Zellen nur leicht oder gar nicht verringert. Die Mutationen der miR-122-Zielsequenzen haben in HeLa-Zellen aufgrund der fehlenden Expression der miR-122 anscheinend keine große Auswirkung auf die Gesamttranslationseffizienz dieser Reporter-RNAs, was ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der miR-122 bei der Translationsregulation der HCV-RNA in Leberzellen ist.

2.1.3 Der Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation in Zellen ist unabhängig von einer translationsreprimierenden RNA-RNA-Interaktion in der HCV-RNA

In einer Studie aus dem Jahr 2003 wurde von einer RNA-RNA-Interaktion in der HCV-RNA zwischen den Nukleotiden 24 bis 38 der Region Ib der 5'-UTR und den Nukleotiden 428 bis 442 der für das Core-Protein codierenden Sequenz berichtet, die die Bildung einer phylogenetisch konservierten Sekundärstruktur bewirkt, welche die Translationseffizienz der IRES-abhängigen Translation der HCV-RNA vermindert (Kim et al., 2003). Durch ortsspezifische Mutagenese konnte diese RNA-RNA-Interaktion destabilisiert und die Translation dicistronischer HCV-Reporter-RNAs in Kaninchen-Retikulozytenlysat und der humanen Hepatomazelllinie HepG2 verstärkt werden. Interessanterweise überlappen beide miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR (Nukleotide 22 bis 28 und 38 bis 43) mit dem Interaktionsbereich der 5'-UTR und der codierenden Sequenz. Somit kam die Hypothese auf, dass die direkte Interaktion der miR-122 mit ihren Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR zur Destabilisierung der translationsreprimierenden RNA-RNA-Interaktion führt und dadurch indirekt die Translation der HCV-RNA verstärkt. Unterstützt wird diese Vermutung durch eine Studie, in der die Konformationsänderung der HCV-IRES von einer geschlossenen Konformation zu einer geöffneten Konformation durch Bindung der miR-122 an ihre Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR und die damit einhergehende Translationsstimulation propagiert wird (Diaz-Toledano et al., 2009) (Abb. 2.5).

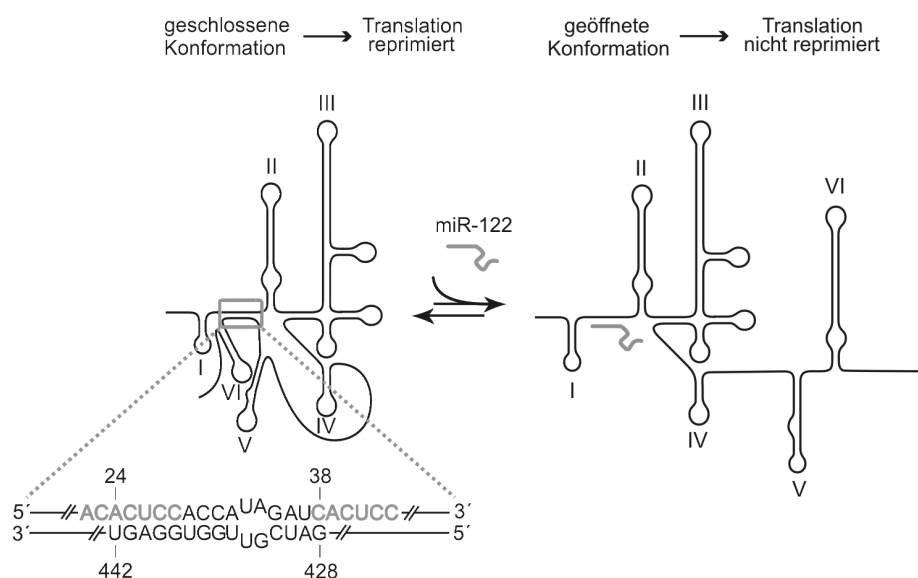


Abb. 2.5 : Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der Nukleotide 1 – 570 der HCV-RNA. Links: geschlossene Konformation durch Interaktion der Nukleotide 428 – 442 der codierenden Sequenz mit den Nukleotiden 24 – 38 der 5'-UTR. Die in diesem Bereich liegenden miR-122-Zielsequenzen sind grau dargestellt. Rechts: geöffnete Konformation durch Bindung der miR-122 an ihre Zielsequenzen in der 5'-UTR. Modifiziert nach Diaz-Toledano et al., 2009.

Um zu untersuchen, ob die Stimulation der HCV-Translation indirekt durch die Destabilisierung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion zwischen den Nukleotiden 24 bis 38 und 428 bis 442 der HCV-RNA durch Bindung der miR-122 bewirkt wird, wurde eine monocistronische HCV-Reporter-RNA konstruiert, in der die codierende Sequenz auf die für die IRES-Struktur und -Aktivität absolut notwendigen Nukleotide reduziert war (Reynolds et al., 1995; Honda et al., 1996). Aufgrund der Deletionen im Bereich der Core-Sequenz kann die translationsinhibierende Sekundärstruktur nicht mehr gebildet werden. Wenn die oben genannte Hypothese zutrifft, sollte die Translation dieser Reporter-RNA durch die Inaktivierung der endogenen miR-122 in Huh7-Zellen nicht vermindert werden. Da die inhibierende RNA-RNA-Interaktion nicht mehr stattfinden kann, sollte auch die weitere Zugabe synthetischer miR-122 keinen translationsverstärkenden Effekt auf diese RNA in Zellen haben.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Translation der Reporter-RNA HCV Δ 428 – 442 (Ursprungsplasmid pHCV-FL) durch eine Inaktivierung der endogenen miR-122 mittels 2'-O-methylierter anti-miR-122 in Huh7-Zellen um etwa 40 % herabgesetzt wurde (Abb. 2.6 A). Damit entspricht das Ausmaß der Translationsrepression in etwa dem, welches für die HCV-Reporter-RNA mit den Nukleotiden 428 – 442 der codierenden Sequenz (Ursprungsplasmid pHCV-FLuc-3'-UTR) beobachtet werden konnte. In beiden Fällen hatte die Ko-Transfektion eines zu der miR-124 komplementären 2'-O-Me-Oligoribonukleotides keinen Einfluss auf die Translationseffizienz. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Transfektion von miR-122 in Huh7-Zellen im Gegensatz zur miR-124 die Translation der HCV-Reporter-RNA mit deletierter codierender Sequenz, genauso wie die Reporter-RNA mit verlängerter codierender Sequenz auf etwa das 2,5-fache verstärkte (Abb. 2.6 B).

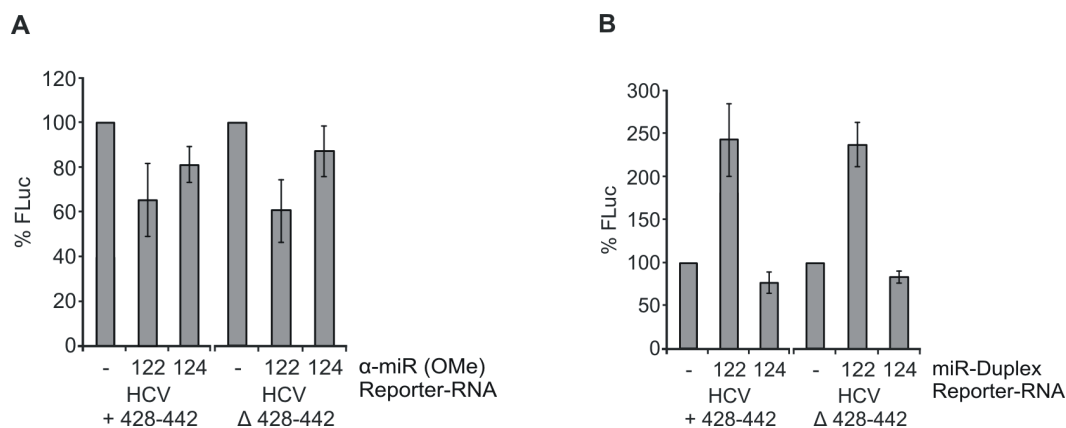


Abb. 2.6: Die Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 in Zellen beruht nicht auf einem Struktureffekt. Expression der Firefly-Luziferase (FLuc) der HCV-Reporter-RNAs vier Stunden nach der Transfektion in Huh7-Zellen. Die gemessenen Aktivitäten der Firefly-Luziferase wurden auf die Expressionswerte einer ko-transfizierten mRNA der *Renilla*-Luziferase normalisiert. Die Reporter-RNAs sowie die miRNA-Duplexe und 2'-O-Me-Gegenstrang-Oligoribonukleotide wurden mit 400 ng/well transfiziert. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. **(A)** Translation der HCV-Reporter-RNAs in Anwesenheit von anti-miR-122 oder anti-miR-124. **(B)** Translation der HCV-Reporter-RNAs in Anwesenheit der Duplexe miR-122 oder miR-124.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die verstärkte Translation der HCV-Reporter-RNAs nicht auf einen Struktureffekt der miR-122 zurückzuführen ist und geben Anlass zu der Annahme, dass die Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 in eukaryotischen Zellen einem anderen Mechanismus unterliegt.

2.1.4 Fazit

Die leberspezifische miR-122 stimuliert die Translation der HCV-RNA durch direkte Interaktion mit ihren Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR. Für das Ausmaß der Stimulation sind beide Zielsequenzen von Bedeutung. Da die Destabilisierung der translationsinhibierenden RNA-RNA-Interaktion zwischen Nukleotiden der HCV-5'-UTR und der codierenden Sequenz des HCV-Core-Proteins durch die Bindung der miR-122 an ihre Zielsequenzen keine Rolle bei der Translationsstimulation der HCV-RNA durch die miR-122 in Zellen spielt, sollte im Folgenden ein möglicher anderer molekularer Mechanismus näher untersucht werden.

2.2 miR-122 stimuliert die HCV-Translation auf dem Stadium der Initiation

Zur internen Initiation der Translation an der HCV-IRES wird nicht der komplette Satz an eukaryotischen Initiationsfaktoren benötigt. Die Bindung der kleinen ribosomalen 40S-Untereinheit in Assoziation mit dem ternären Komplex (eIF2/GTP/Met-tRNA_i) und eIF3 an die HCV-IRES erfolgt ohne die Unterstützung des Adapter-Proteinkomplexes eIF4F (Pestova et al., 1998b). Für die Bildung dieses sogenannten 48S-Komplexes ist der Initiationsfaktor eIF3 entbehrlich. Er unterstützt jedoch die Interaktion der 40S-Untereinheit mit der HCV-IRES durch Bindung an die Domänen III a, b und c (Buratti et al., 1998; Sizova et al., 1998; Kieft et al., 2001) und ist für die Bildung vollständiger 80S-Ribosomen absolut notwendig (Pestova et al., 1998b).

In diesem Teil der Arbeit sollte durch eine eher mechanistische Herangehensweise untersucht werden, auf welchem Stadium die Translation der HCV-RNA durch die miR-122 stimuliert wird. Dies erfolgte durch die Analyse der Bildung von 48S- und 80S-Initiationskomplexen mittels Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation nach Anthony und Merrick (Anthony und Merrick, 1992).

2.2.1 miR-122 stimuliert die HCV-Translation in der Phase der Initiation durch verstärkte Bildung von 48S-Komplexen

Die Bildung von Initiationskomplexen mit der HCV-RNA in Abwesenheit beziehungsweise Anwesenheit von miR-122 wurde in Nuklease-behandeltem Kaninchen-Retikulozytenlysat (*rabbit reticulocyte lysate*, RRL) durchgeführt, welches allgemein als effizientes, zellfreies, eukaryotisches *in vitro*-Translationssystem bekannt ist (Pelham und Jackson, 1976). Dazu wurde eine kurze, intern radioaktiv markierte RNA verwendet, in der ein offener Leserahmen von 96 Nukleotiden von der zur Translation notwendigen HCV-5'- und 3'-UTR flankiert war (Ursprungsplasmid pHCV SIN). Der offene Leserahmen enthielt 61 Nukleotide der für das Core-Protein codierenden Sequenz der HCV-RNA (ohne die zur Bildung der translationsreprimierenden RNA-RNA-Interaktion notwendigen Nukleotide, siehe Kapitel 2.1.3) und 35 Nukleotide der codierenden Sequenz der Firefly-Luziferase (Abb. 2.7 E). Da dem Kaninchen-Retikulozytenlysat anscheinend zelluläre Komponenten zur Beladung von miRNP-Komplexen mit miRNA-Duplexen fehlen und die miRNP-Komplexe hier direkt an die miRNA:mRNA-Duplexe binden (Wang et al., 2006), wurde zur Untersuchung eines Effekts der miR-122 auf die Bildung der HCV-Translations-Initiationskomplexe nur der reife Einzelstrang der miR-122 verwendet. Zum Erhalt und zur Identifizierung von 80S-Ribosomen nach der Translations-Initiation wurde die Bildung der RNA-Ribosomen-Komplexe in Anwesenheit des Elongationsinhibitors Anisomycin durchgeführt.

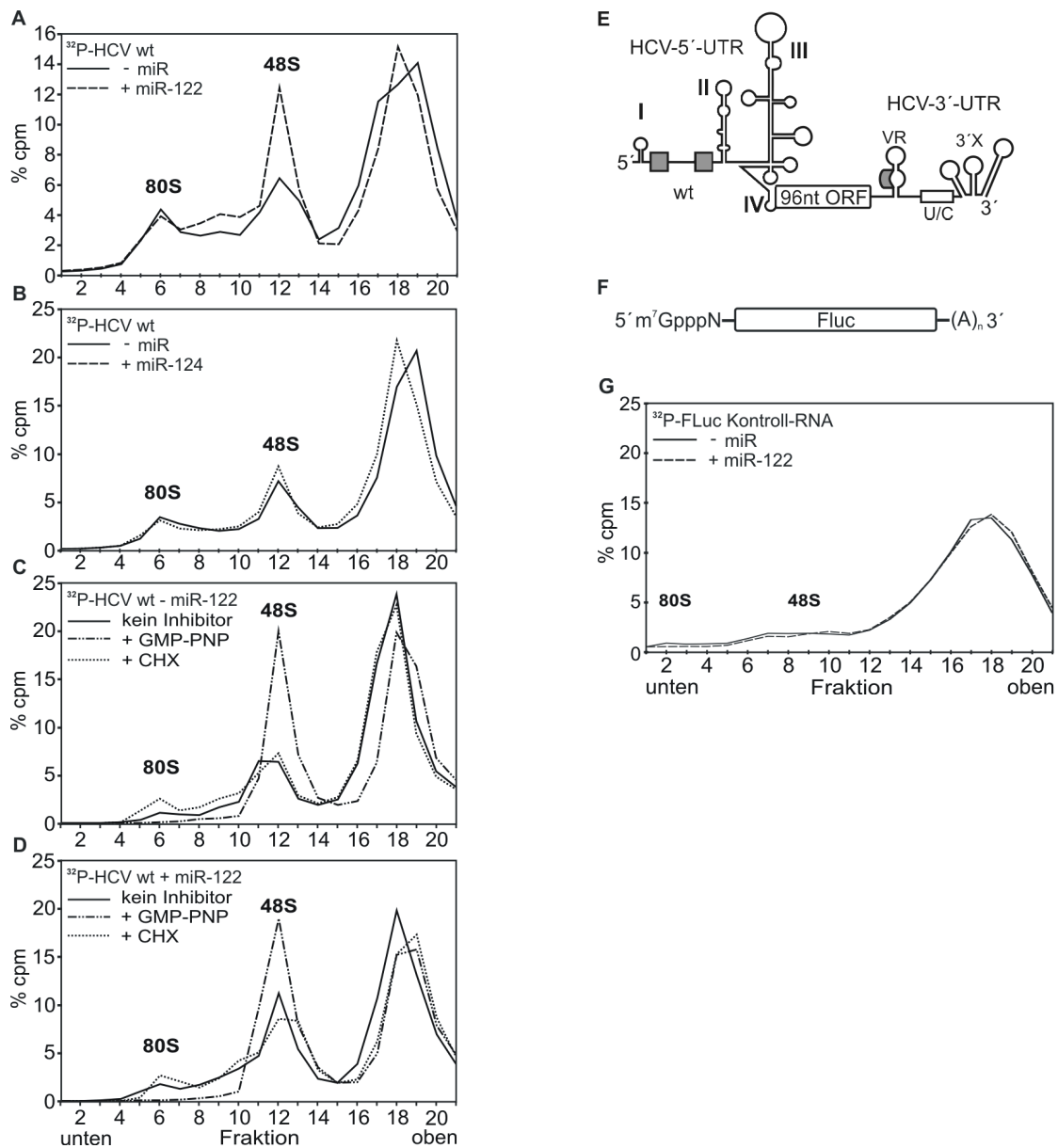


Abb. 2.7: miR-122 stimuliert die Bildung von 48S-Initiationskomplexen mit der HCV-RNA. (A, B) Sucrose-Dichtegradienten-Analyse der Bildung von Initiationskomplexen mit radioaktiv markierter HCV-RNA (E) nach 10 min Inkubation in RRL in Abwesenheit beziehungsweise Anwesenheit von miR-122 (A) oder miR-124 (B) (n = 4). (C, D) Bildung von Initiationskomplexen in Abwesenheit (C) oder Anwesenheit (D) von miR-122 ohne Translationsinhibitoren, mit GMP-PNP oder Cycloheximid (CHX) (n = 2). (E) Die für die Analyse der Komplexbildung verwendete HCV-RNA mit den konservierten miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR. (F) Die für die Analyse der Komplexbildung verwendete Kontroll-mRNA der Firefly-Luziferase mit 7-Methylguanosisin-Kappe und poly(A)-Schwanz. (G) Sucrose-Dichtegradienten-Analyse der radioaktiv markierten FLuc-mRNA (F) in Abwesenheit oder Anwesenheit von miR-122 (n = 14). Verändert aus Henke, Goergen et al., 2008.

Die RNA-Radioaktivitätsprofile zeigen, dass die Assoziation der HCV-RNA mit der kleinen 40S-ribosomalen Untereinheit in Anwesenheit der miR-122 verstärkt wurde, was zu einem signifikant erhöhten Anteil an 48S-Initiationskomplexen führte (Abb. 2.7 A). Dieser Effekt konnte mit der als Kontrolle eingesetzten gehirnspezifischen miR-124 nicht beobachtet werden (Abb. 2.7 B). Um zu zeigen, dass die verstärkte Bildung von 48S-Komplexen ein spezifischer Effekt der miR-122 auf die HCV-RNA ist, wurde in den RNA-Ribosomen-Bindungsreaktionen eine artifizielle polyadenylierte

mRNA der Firefly-Luziferase mit 5'-terminaler 7-Methylguanidin-Kappe verwendet (Abb. 2.7 F). Hier hatte die miR-122 weder einen Effekt auf die Bildung der 48S-Komplexe noch auf die Bildung vollständiger 80S-Ribosomen (Abb. 2.7 G). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die miR-122 spezifisch die Interaktion der 40S-Untereinheit mit der HCV-IRES fördert und dadurch die Bildung von 48S-Initiationskomplexen verstärkt. Zur Identifizierung der ribosomalen 48S-Komplexe wurde das nicht hydrolysierbare GTP-Analogon GMP-PNP verwendet (Anthony und Merrick, 1992). Dieser Inhibitor verhindert die Bildung der 80S-Ribosomen, indem die von der GTP-Hydrolyse abhängige Anlagerung der 60S-Untereinheit blockiert wird und die 48S-Komplexe auf ihrem Assoziationsstatus „eingefroren“ werden. Dies zeigt sich in den RNA-Radioaktivitätsprofilen durch einen erhöhten 48S-Peak in den Fraktionen 11 bis 13 (Abb. 2.7 C und D). In diesen Fraktionen findet sich auch der durch die miR-122 erhöhte Peak wieder (Abb. 2.7 C und D). Unter Anwesenheit von GMP-PNP konnte die Bildung der 48S-Komplexe durch die miR-122 nicht weiter verstärkt werden, was darauf hinweist, dass es sich bei den durch miR-122 und GMP-PNP beeinflussten ribosomalen Initiationskomplexen um die gleichen, also um 48S-Komplexe handelt (Vergleich Abb. 2.7 C und D). Die Identifizierung vollständiger 80S-Ribosomen (Monosomen) erfolgte durch Zugabe von Cycloheximid. Cycloheximid inhibiert die frühe Phase der Elongation und verstärkt dadurch die Ansammlung von 80S-Initiationskomplexen. Deren Bildung war in Anwesenheit von miR-122 leicht verstärkt (Vergleich Abb. 2.7 C und D).

2.2.2 miR-122 ko-migriert mit der HCV-RNA

Um die Ko-Migration der miR-122 mit der HCV-RNA nachzuweisen, wurde die Verteilung einer 5'-terminal radioaktiv markierten miR-122 in einem Sucrose-Dichtegradienten nach Inkubation in Kaninchen-Retikulozytenlysate in Abwesenheit beziehungsweise Anwesenheit einer nicht markierten HCV-RNA analysiert. Trotz der Behandlung des Retikulozytenlysates mit der Calcium-abhängigen Mikrococcus-Nuklease zur Eliminierung endogener mRNA zeigt das Lysat eine geringe Hintergrund-Translationsaktivität (Pelham und Jackson, 1976). Aus diesem Grund konnte wahrscheinlich eine Komplexbildung mit der miR-122 und miR-124 beobachtet werden (Abb. 2.8 A und B). Die RNA-Radioaktivitätsprofile zeigen, dass in der Anwesenheit der HCV-RNA ein erhöhter Anteil miR-122 in den Fraktionen der 48S-Initiationskomplexe detektiert werden konnte. Dieser Effekt konnte bei der Analyse der Verteilung der gehirnspezifischen miR-124 nicht beobachtet werden. Dieses Ergebnis und die Beobachtung, dass die miR-122 die Assoziation der HCV-RNA mit der ribosomalen 40S-Untereinheit fördert, weisen darauf hin, dass die miR-122 gemeinsam mit der HCV-RNA in den Fraktionen der 48S-Komplexe vorliegt. Durch diesen experimentellen Ansatz konnte auch die Interaktion der miR-122 mit beiden Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR belegt werden. Die Sucrose-Dichtegradienten-Analyse zeigt, dass die mutierte HCV-RNA 5mut1,2, nicht aber die Wildtyp-HCV-RNA den Anteil der radioaktiv markierten mutierten miR-122 in den Fraktionen der 48S-

Initiationskomplexe steigerte (Abb. 2.8 D), und zwar etwa im gleichen Ausmaß wie die Auswirkung der Wildtyp-HCV-RNA auf die Wildtyp-miR-122.

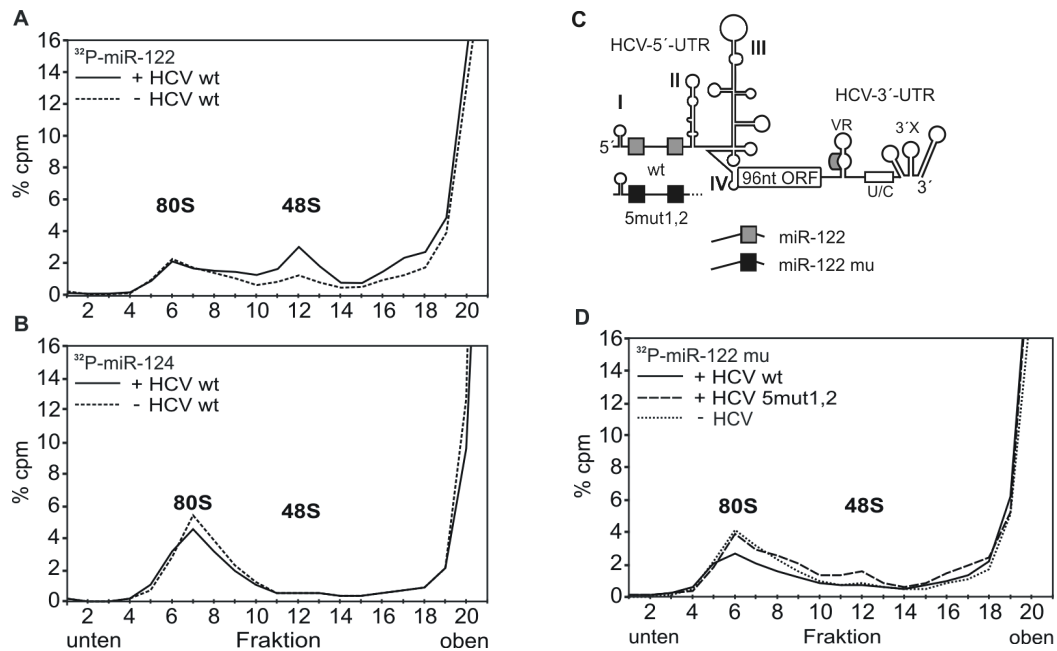


Abb. 2.8: miR-122 ko-migriert mit der HCV-RNA. (A, B) Sucrose-Dichtegradienten-Analyse des Einbaus radioaktiv markierter miR-122 (A) und miR-124 (B) in ribosomale Initiationskomplexe in Abwesenheit (miR-122; n = 3, miR-124; n = 2) oder Anwesenheit (miR-122; n = 5, miR-124; n = 3) nicht markierter Wildtyp-HCV-RNA (C) nach 10 min Inkubation in RRL in Anwesenheit von Anisomycin. Verändert aus Henke, Goergen et al., 2008. (C) Die für die Analyse der Komplexbildung verwendete HCV-RNA mit den konservierten (graue Kästen) oder mutierten (schwarze Kästen) miR-122-Zielssequenzen in der 5'-UTR und die dazu komplementäre miR-122 oder miR-122 mu. (D) Sucrose-Dichtegradienten-Analyse des Einbaus radioaktiver mutierter miR-122 mu in Abwesenheit (n = 6) von HCV-RNA oder Anwesenheit nicht markierter Wildtyp-(n = 4) oder mutierter (n = 2) HCV-RNA (C).

Weiterhin konnte die Assoziation der miR-122 mit 80S-Initiationskomplexen bestätigt werden. Dazu wurde die Verteilung radioaktiv markierter miR-122 und miR-124 in einem Sucrose-Dichtegradienten nach Inkubation in Kaninchen-Retikulozytenlysat analysiert. Um die Dissoziation der 80S-Ribosomen zu unterbinden und die Komplexe dadurch zu identifizieren, wurde die Komplexbildung auch in Anwesenheit des Elongationsinhibitors Anisomycin durchgeführt. Das Radioaktivitätsprofil der miR-122 zeigt, dass die Fraktionen 5 bis 7 eindeutig als Fraktionen der 80S-Initiationskomplexe identifiziert werden konnten (Abb. 2.9 A). Durch die inhibitorische Wirkung des Anisomycins wurde der Anteil der miR-122 in diesen Fraktionen stark erhöht, was für eine Assoziation der miR-122 mit 80S-Initiationskomplexen spricht. Im Gegensatz zu der miR-124 konnte die miR-122 auch in den 48S-Fractionen detektiert werden (Vergleich Abb. 2.9 A und B). Eine Assoziation der miR-122 mit 48S-Initiationskomplexen konnte bereits zuvor bestätigt werden (Abb. 2.8 A).

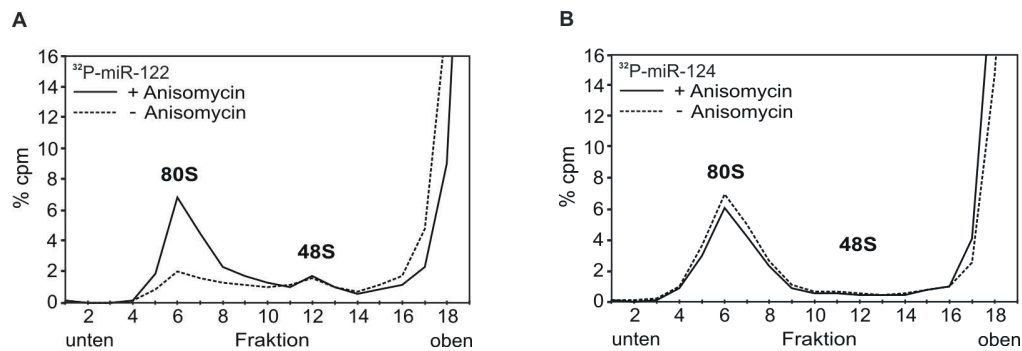


Abb. 2.9: microRNAs sind mit 80S-Ribosomen assoziiert. (A, B) Sucrose-Dichtegradienten-Analyse des Einbaus radioaktiv markierter miR-122 (A; n = 4) und miR-124 (B; n = 6) in ribosomale Initiationskomplexe nach 10 min Inkubation in RRL in Abwesenheit oder Anwesenheit des Elongationsinhibitors Anisomycin.

Diese Beobachtung lässt die Annahme zu, dass die miR-122 mit Faktoren der frühen Translations-Initiation assoziiert sein könnte. Interessanterweise sedimentierte ein großer Teil der gehirnspezifischen miR-124 auch ohne Zugabe von Anisomycin in den 80S-Fractionen, weshalb dieser Peak durch das „Einfrieren“ der 80S-Ribosomen nicht weiter erhöht werden konnte (Abb. 2.9 B). Dadurch konnte hier eine physikalische Assoziation der miR-124 mit 80S-Ribosomen nicht eindeutig bewiesen werden.

Die Beobachtungen werden durch Studien unterstützt, in denen die Ko-Sedimentation von miRNP-assoziierten Proteinen, wie Argonaute-Proteine, und miRNAs, aber auch von Komponenten der dsRNA-Prozessierungs-Maschinerie mit 80S-Ribosomen gezeigt werden konnte (Pham et al., 2004; Landthaler et al., 2008).

2.2.3 miR-122 beschleunigt die Assoziation der HCV-RNA mit der 40S-ribosomalen Untereinheit

Um die Effizienz der durch die miR-122 verstärkten Bildung von 48S-Initiationskomplexen mit der HCV-RNA zu untersuchen, wurde die Kinetik der RNA-Ribosomen-Bindung in Abwesenheit oder Anwesenheit von miR-122 analysiert. Dazu wurden Bindungsreaktionen in Kaninchen-Retikulozytenlysat ohne Elongationsinhibitoren durchgeführt. Um die Komplexbildung nach verschiedenen Inkubationszeiten zu stoppen und den augenblicklichen Assoziationsstatus der Initiationskomplexe zu erhalten, wurde den Reaktionen nach der Inkubation MgCl₂ in einer Endkonzentration von 30 mM zugegeben.

Die kinetische Analyse der Initiationskomplexbildung zeigt, dass die miR-122 die Bildung der 48S-Komplexe mit der HCV-RNA zu frühen Zeitpunkten verstärkt (Abb. 2.10 B).

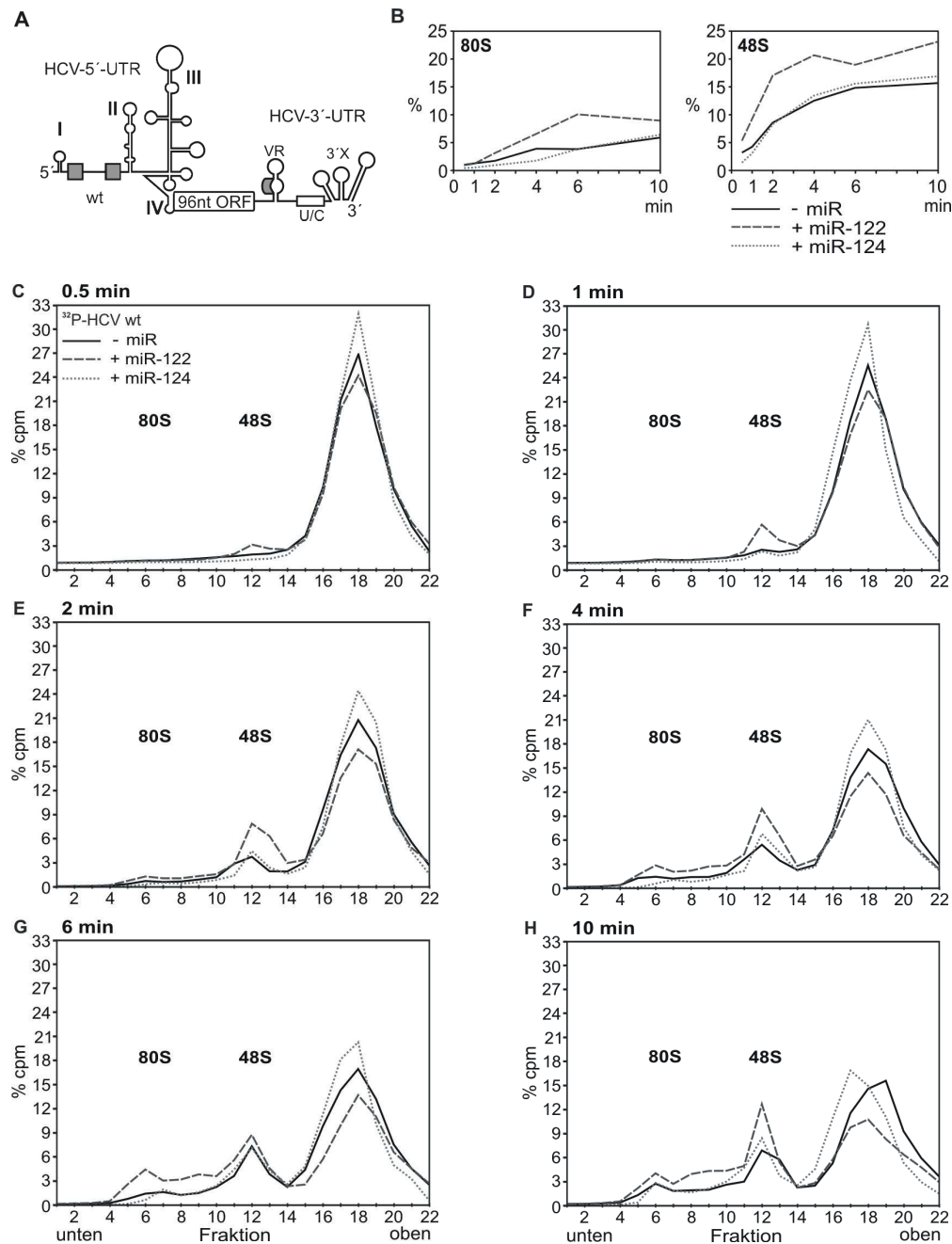


Abb. 2.10: miR-122 beschleunigt die Assoziation der HCV-RNA mit der kleinen 40S-ribosomalen Untereinheit. (A) Die in der kinetischen Analyse verwendete HCV-RNA. (B) Relative Anteile der radioaktiv markierten HCV-RNA (A) in den 48S- und 80S-Komplexen zu verschiedenen Zeitpunkten in Abwesenheit oder Anwesenheit von miR-122 beziehungsweise miR-124. Die gezeigten Daten sind die Summe der Werte der Fraktionen 5 bis 7 (80S) und 11 bis 13 (48S) der Gradienten C-H. (C-H) Sucrose-Dichtegradienten-Analyse der Geschwindigkeit der Bildung von 48S- und 80S-Initiationskomplexen mit der radioaktiv markierten HCV-RNA in RRL in Abwesenheit (geschlossene Linie) oder Anwesenheit von miR-122 (unterbrochene Linie) beziehungsweise miR-124 (punktierete Linie). Alle hier dargestellten Werte sind Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Verändert aus Henke, Goergen et al., 2008.

In Anwesenheit der miR-122 war der Anteil der radioaktiv markierten HCV-RNA in den 48S-Komplexen, im Gegensatz zu der Reaktion ohne miR-122 oder mit der als Kontrolle verwendeten miR-124, bereits nach 0,5 min erhöht. Die durch die miR-122 verstärkte Bildung der 48S-Komplexe

erreichte nach etwa 2 min ihr Maximum (Abb. 2.10 E). Zu diesem Zeitpunkt war der Anteil der HCV-RNA in den 48S-Komplexen in Anwesenheit von miR-122 gegenüber dem in Abwesenheit von miR-122 oder Anwesenheit von miR-124 maximal erhöht (Abb. 2.10 B). Im zeitlichen Verlauf lässt sich erkennen, dass die miR-122 auch Einfluss auf die Bildung vollständiger 80S-Ribosomen hatte (Abb. 2.10 C bis H). Der Anteil radioaktiv markierter HCV-RNA in diesen Fraktionen war in Anwesenheit von miR-122, im Gegensatz zu Bindungsreaktionen ohne miR-122, nach 6 min erhöht (Abb. 2.10 B). Damit erreichte die Bildung von 80S-Ribosomen nach 6 min ihr Maximum (Abb. 2.10 G). Nach 10 min ging der Anteil an 80S-Ribosomen wieder leicht zurück, wohingegen die 48S-Komplexe wieder verstärkt gebildet wurden (Abb. 2.10 H). Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass ein großer Anteil der 80S-Ribosomen den Initiationsort zwischen 6 min und 10 min verlassen hat und dieser somit für einen neuen Initiationsvorgang zur Verfügung stand.

2.2.4 Die mutierte miR-122 verstärkt die Bildung der 80S-ribosomalen Komplexe mit der mutierten HCV-RNA in HeLa-Zellen

Die verstärkte Bildung von 80S-Translations-Initiationskomplexen mit der HCV-RNA konnte auch *in vivo* bestätigt werden. Dazu wurden HeLa-Zellen, die keine endogene miR-122 enthalten, mit einer radioaktiv markierten HCV-RNA, in der beide miR-122-Zielsequenzen in der 5'-UTR mutiert waren, transfiziert (Abb. 2.11 A). Die Bildung der ribosomalen Translations-Initiationskomplexe in Anwesenheit oder Abwesenheit der RNA-Duplexe miR-122 oder miR-122 mu wurde zwei Stunden nach der Transfektion durch Auftrennung der Zellysate auf einem Sucrose-Dichtegradienten analysiert.

Durch Zugabe des Elongationsinhibitors Cycloheximid 90 min nach der Transfektion konnten in den Fraktionen 7 bis 9 ein und in den Fraktionen 3 bis 5 zwei vollständig gebildete 80S-Ribosomen durch einen signifikanten Anstieg der radioaktiven HCV-RNA in diesen Fraktionen im Vergleich zu Transfektionen ohne Zugabe von Cycloheximid identifiziert werden (Abb. 2.11 B). In Anwesenheit der mutierten miR-122 mu war die Bildung von 80S-Initiationskomplexen mit der HCV-RNA 5mut1,2 verstärkt. Im Vergleich zu Transfektionen ohne miRNA-Duplexe oder mit der Wildtyp-miR-122 erhöhte sich die Menge an 80S-Ribosomen in den Fraktionen 7 bis 9 und in den Fraktionen 3 bis 5 (Abb. 2.11 B). Hier konnte also die Interaktion der mutierten miR-122 mu mit den zu ihr komplementären Sequenzen in der 5'-UTR der mutierten HCV-RNA nachgewiesen und die daraus resultierende Stimulation der Bildung von Translations-Initiationskomplexen *in vivo* demonstriert werden.

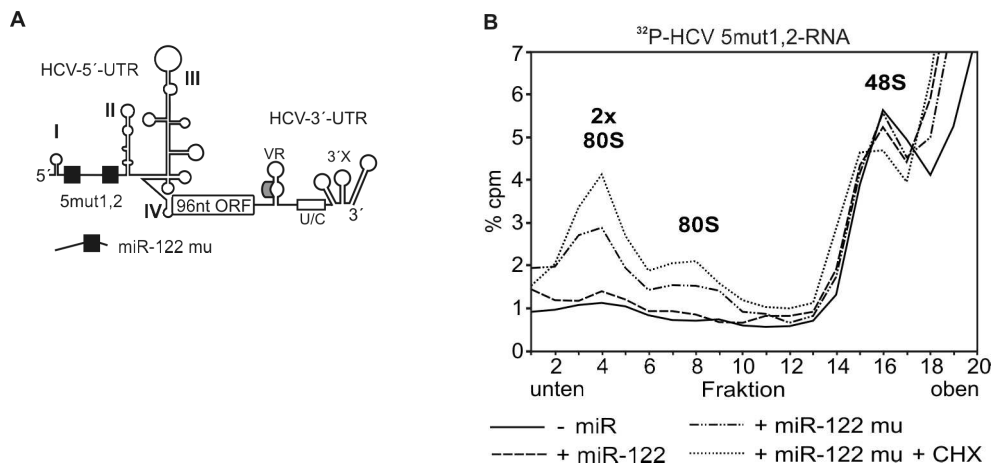


Abb. 2.11: miR-122 mu stimuliert die Bildung von 80S-Ribosomen mit der mutierten HCV-RNA in HeLa-Zellen. (A) Die HCV-RNA 5mut1,2 mit Mutationen in beiden miR-122-Zielsequenzen (schwarze Kästen) und die mutierte miR-122 mu mit kompensatorischen Mutationen in der „seed“-Sequenz. **(B)** Sucrose-Dichtegradienten-Analyse der Bildung von Translations-Initiationskomplexen in HeLa-Zellen 2 h nach der Transfektion radioaktiv markierter HCV-RNA (A) in Abwesenheit und Anwesenheit von miR-122 oder miR-122 mu. Die Identifizierung der 80S-Ribosomen erfolgte durch Zugabe von Cycloheximid (CHX) 30 min vor der Zellyse. Die hier dargestellten Werte sind Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Verändert aus Henke, Goergen et al., 2008.

2.2.5 Fazit

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die miR-122 die Assoziation der HCV-RNA mit der 40S-ribosomalen Untereinheit zu frühen Zeitpunkten der Translations-Initiation fördert und damit die Bildung von 48S-Initiationskomplexen *in vitro* verstärkt. Die daraus resultierende vermehrte Bildung von 80S-Ribosomen konnte auch *in vivo* in HeLa-Zellen demonstriert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die direkte Interaktion der miR-122 mit ihren Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR die HCV-Translation in der Phase der frühen Initiation stimuliert. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die miR-122 mit der HCV-RNA ko-migriert und in Anwesenheit der HCV-RNA verstärkt in den 48S-Initiationskomplexen detektierbar ist. Wie allerdings die Bindung der HCV-RNA an die 40S-ribosomale Untereinheit durch die miR-122 stimuliert wird, ist an dieser Stelle noch unklar. Bisher konnte die Assoziation von miRNAs im Komplex mit Argonaute-Proteinen mit 80S-Ribosomen demonstriert werden (Landthaler et al., 2008). Hier konnte allerdings gezeigt werden, dass die miR-122 auch mit 48S-Komplexen kosedimentiert. Daher kann nur spekuliert werden, dass entweder ein funktioneller miRNP-Komplex oder aber eine „nackte“ miR-122 durch Interaktion mit ribosomalen Proteinen oder Faktoren, die an der Translations-Initiation beteiligt sind, die HCV-Translation stimulieren.

2.3 miR-122 beeinflusst die Interaktion der HCV-RNA mit einem Protein von 68 kDa

Da miRNAs ihre Wirkung auf zelluläre mRNAs in Form von Ribonukleoprotein-Komplexen ausüben, deren Schlüsselkomponenten Proteine der sogenannten Argonaute (Ago)-Familie sind (Hutvagner und Simard, 2008), kam die Vermutung auf, dass diese Proteine auch an der Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 beteiligt sein könnten. Argonaute-Proteine haben ein Molekulargewicht von etwa 97 kDa und weisen drei charakteristische Domänen auf (PAZ, MID und PIWI) (Cerutti et al., 2000; Yuan et al., 2005). Die PAZ-Domäne bindet spezifisch die durch das Enzym Dicer generierten 3'-Überhänge der miRNA-Duplexe, wohingegen die MID-Domäne aufgrund ihrer basischen Eigenschaften das 5'-Phosphat der RNA an das Ago-Protein verankert (Wang et al., 2008b). Die PIWI-Domäne weist Gemeinsamkeiten mit der RNase H auf und besitzt damit endonukleolytische Eigenschaften (Song et al., 2004). Allerdings wurde Ago 2 als einziges Mitglied der humanen Ago-Familie mit dieser sogenannten „Slicer“-Aktivität identifiziert (Meister et al., 2004b).

In diesem Teil der Arbeit sollte die Beteiligung von Proteinfaktoren, möglicherweise Argonaute-Proteine, an der Regulation der HCV-Translation durch die miR-122 näher untersucht werden. Zur Identifizierung von RNA-Protein-Interaktionen wurden UV-Crosslink-Experimente, erstmalig beschrieben durch Pelletier und Sonenberg (Pelletier und Sonenberg, 1985), in cytoplasmatischem Zellextrakt durchgeführt. Dabei können auch kurzlebige Bindungsereignisse durch UV-induzierte kovalente Bindungen zwischen RNA und Proteinen erfasst werden. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht werden die Pyrimidin-Nukleotide einer intern radioaktiv markierten RNA zunächst energetisch angeregt. Diese können dann mit reaktiven Aminosäuregruppen RNA-bindender Proteine kovalente Bindungen eingehen, wodurch die radioaktive Markierung auf das Protein übertragen wird. Nicht kovalent gebundene RNA und nicht durch das bindende Protein geschützte RNA-Bereiche werden anschließend mit RNase verdaut. Bei der Auftrennung der Proteine in einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden dann alle nicht UV-fixierten RNA-Protein-Interaktionen dissoziiert. Folglich bleiben im Gel Proteine zurück, die getrimmte radioaktiv markierte RNA-Oligonukleotide gebunden haben und dann durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden können.

2.3.1 miR-122 vermindert die Bindung des 68 kDa-Proteins an die HCV-RNA

Um zu prüfen, ob die miR-122 das Bindungsverhalten von Proteinen an die HCV-RNA verändert beziehungsweise die Proteinkomponenten re-organisiert, wurden die RNA-Protein-Bindungsreaktionen in Abwesenheit oder Anwesenheit unterschiedlicher Mengen miR-122 durchgeführt. Dazu wurde eine intern radioaktiv markierte HCV-RNA verwendet, bei der ein kurzer offener Leserahmen von der HCV-5'-UTR mit konservierten oder mutierten miR-122-Zielsequenzen

und der authentischen HCV-3'-UTR flankiert war (Abb. 2.12 A). Das Ergebnis des UV-Crosslink-Experiments zeigt, dass verschiedene Proteine sowohl mit der Wildtyp- als auch mit der mutierten HCV-RNA in HeLa-Zellextrakt interagieren. Besonders prominent ist ein Protein, das im Molekularbereich von 57 kDa im SDS-Gel migriert (Abb. 2.12 B und C). Durch den Vergleich mit Ergebnissen aus vorangehenden Studien konnte diese Proteinbande als Polypyrimidin-Trakt-Bindeprotein (PTB) identifiziert werden, welches spezifisch an die 3'X-Region der HCV-3'-UTR bindet (Tsuchihara et al., 1997; Luo, 1999). In dem Bereich von 97 kDa konnte keine Proteinbande detektiert werden, die auf die Bindung eines Argonaute-Proteins an die HCV-RNA in Abwesenheit oder Anwesenheit der miR-122 hinweisen könnte.

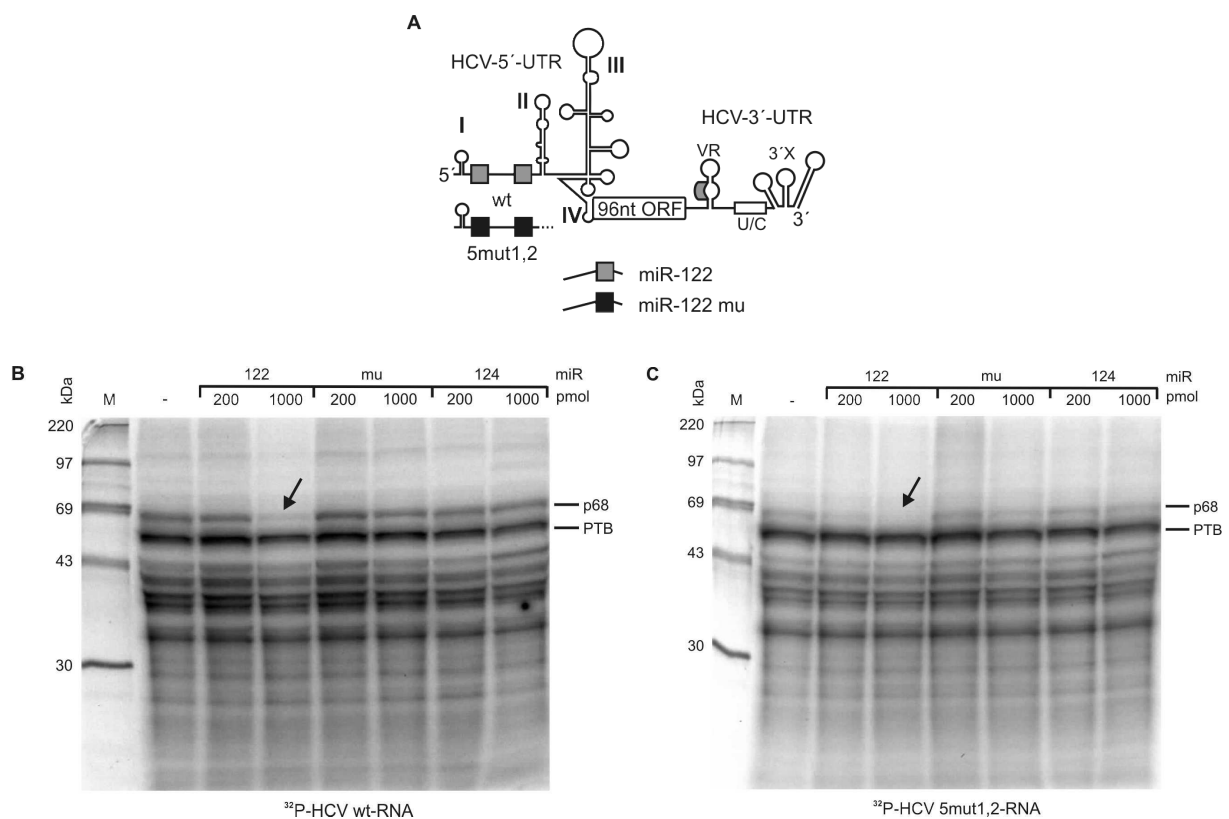


Abb. 2.12: Die miR-122 schwächt die Bindung eines Proteins von etwa 68 kDa an die HCV-RNA. (A) Die radioaktiv markierte HCV-RNA mit den konservierten (graue Kästen) oder mutierten (schwarze Kästen) miR-122-Zielssequenzen in der 5'-UTR und die dazu komplementäre nicht radioaktiv markierte miR-122 oder miR-122 mu. Die RNA enthält einen offenen Leserahmen von 96 Nucleotiden einschließlich 61 Nucleotide der für das HCV-Core-Protein codierende Sequenz. **(B, C)** UV-Crosslink-Experiment der Wildtyp-HCV-RNA (B) oder der mutierten HCV-RNA 5mut1,2 (C) mit cytoplasmatischem HeLa-Zellextrakt in Abwesenheit oder Anwesenheit von 200 pmol und 1000 pmol miR-122, miR-122 mu oder miR-124. Die Proteine wurden auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie (40 Stunden, Raumtemperatur) sichtbar gemacht. Die Pfeile kennzeichnen das 68 kDa-Protein, zur Orientierung ist die Position des Proteins PTB im Gel angezeigt. M, ¹⁴C-Proteinmarker.

Weiterhin ist eine Proteinbande zu erkennen, die im Molekularbereich von 68 kDa migriert. Die Bindung dieses Proteins an die Wildtyp- oder mutierte HCV-RNA wurde in Anwesenheit großer Mengen miR-122 stark vermindert (Abb. 2.12 B und C). Ein bereits 200-facher Überschuss an

miR-122 gegenüber der HCV-RNA hatte Auswirkung auf die Bandenstärke des 68 kDa-Proteins, und ein 1000-facher Überschuss führte zu einer fast vollständigen Inhibition der Bindung des Proteins sowohl an die Wildtyp- als auch an die mutierte HCV-RNA (Abb. 2.12 B und C). Um die Spezifität dieses Effekts zu prüfen, wurde die Bindungsreaktion in Anwesenheit entsprechender Mengen der mutierten miR-122 mu oder der gehirnspezifischen miR-124 durchgeführt. Die Bindung des 68 kDa-Proteins an die HCV-RNA konnte durch Zugabe dieser beiden miRNAs nicht annähernd so effizient geschwächt werden wie bei der authentischen miR-122 (Abb. 2.12 B und C). Die Inhibition der Bindung des Proteins an die HCV-RNA beruht also nicht auf der Zugabe eines Überschusses an unspezifischem Kompetitor.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Abschwächung der Bindung des 68 kDa-Proteins an die HCV-RNA durch Sequenz-spezifische Inhibition der miR-122 durch das 2'-O-methylierte Gegenstrang-Oligoribonukleotid anti-miR-122 unterbunden werden kann (Abb. 2.13 A und B). Dieses Ergebnis ist ein weiterer Beweis, dass der Rückgang der Proteinbande spezifisch auf die miR-122 zurückzuführen ist. Die Autoradiogramme zeigen auch, dass die Zugabe eines jeden 2'-O-methylierten Oligoribonukleotids die Bindung eines Proteins von etwa 43 kDa an die HCV-RNA beeinflusste. Da dieser Effekt unspezifisch zu sein scheint, wurde er in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

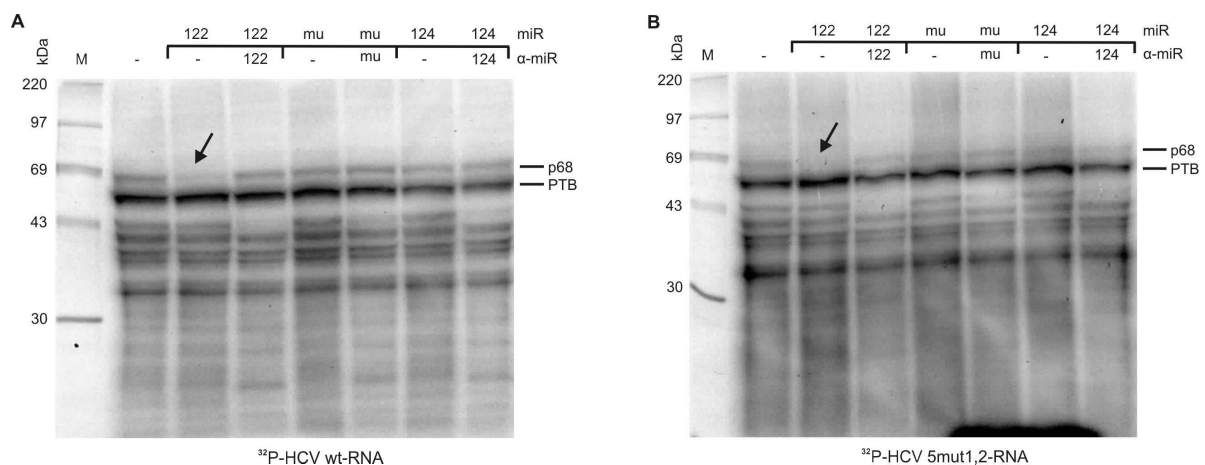


Abb. 2.13: Die Interaktion des 68 kDa-Proteins mit der HCV-RNA kann durch Inaktivierung der miR-122 wieder hergestellt werden. UV-Crosslink-Experimente der radioaktiv markierten HCV-RNA Wildtyp (A) und 5mut1,2 (B) in HeLa-Zellextrakt in Abwesenheit und Anwesenheit von jeweils 500 pmol nicht markierter miR-122, miR-122 mu oder miR-124 und der zu ihnen komplementären 2'-O-Me-Oligoribonukleotide anti-miR-122, anti-miR-122 mu und anti-miR-124. Die Autoradiographie der über ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten radioaktiv markierten Proteine erfolgte bei Raumtemperatur für 24 Stunden. Die Pfeile kennzeichnen das 68 kDa-Protein. M, ¹⁴C-Proteinmarker.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass anscheinend nur die Verwendung des reifen miRNA-Einzelstranges zur Verminderung der Bindung des 68 kDa-Proteins an die HCV-RNA führt. Die Proteinbindung an die HCV-RNA wurde weder durch miR-122-Duplex noch durch miR-122 mu-Duplex oder miR-124-Duplex beeinflusst (Abb. 2.14 A und B). Für dieses Ergebnis gibt es

verschiedene Erklärungsansätze. Zum einen könnte die Inkubationszeit der Bindungsreaktion von RNA und Zellextrakt zu kurz sein, um eine ausreichende Prozessierung und eine damit einhergehende Funktionalität der miRNA-Duplexe zu gewährleisten. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Proteinausstattung des zellulären Extraktes, ähnlich wie bei Kaninchen-Retikulozytenlysat (Wang et al., 2006), nicht ausreicht, um die miRNA-Duplexe zu prozessieren. Diese Überlegung wird von einer Studie unterstützt, in der die effiziente Konversion einer externen pre-miR-let-7 zur funktionellen miRNA let-7 in cytoplasmatischem Extrakt von HEK293F-Zellen nur durch Überexpression von Ago1 beziehungsweise Ago2 zu beobachten war (Wakiyama et al., 2007). Da Argonaute-Proteine als Schlüsselkomponenten von miRNP-Komplexen auch mit anderen RNA-bindenden Proteinen inklusive dem RNase III-Enzym Dicer interagieren (Tahbaz et al., 2004), lässt die Beobachtung in der Studie von Wakiyama Rückschlüsse auf die Bedeutung von Argonaute-Proteinen in frühen miRNA-Prozessierungsschritten zu.

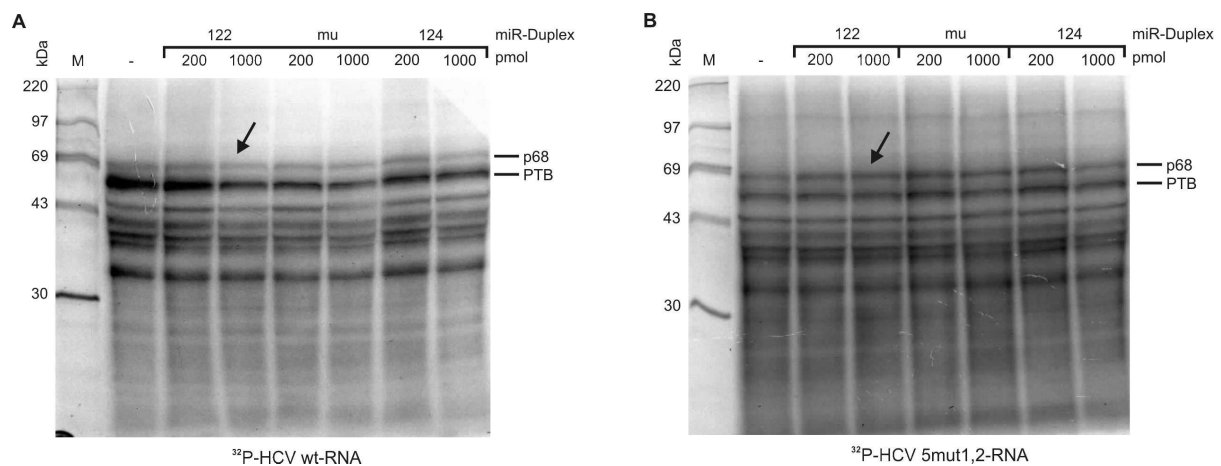


Abb. 2.14: Die Prozessierung von miR-122-Duplexen in Zellextrakt ist nicht ausreichend, um die Interaktion des 68 kDa-Proteins mit der HCV-RNA zu unterbinden. UV-Crosslink-Experimente der radioaktiv markierten HCV-RNA Wildtyp (A) und 5mut1,2 (B) in HeLa-Zellextrakt in Abwesenheit und Anwesenheit von 200 pmol oder 1000 pmol der nicht markierten miRNA-Duplexe miR-122, miR-122 mu oder miR-124. Die Proteine wurden anschließend auf einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt, getrocknet und autoradiographiert (40 Stunden, Raumtemperatur). Die Pfeile kennzeichnen das 68 kDa-Protein. M, ^{14}C -Proteinmarker.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Bindung eines Proteins von 68 kDa an die HCV-RNA spezifisch durch reife, einzelsträngige miR-122 blockiert wird. Dies führt zu der Annahme, dass die Interaktion der miR-122 mit ihren Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR die Verdrängung des 68 kDa-Proteins von der HCV-RNA bewirkt. Auffallend ist jedoch, dass sowohl die Bindung des Proteins an die HCV-RNA mit den konservierten miR-122-Zielsequenzen in der 5'-UTR als auch an die HCV-RNA mit den mutierten miR-122-Zielsequenzen durch Zugabe der Wildtyp-miR-122 vermindert wird. Diese Beobachtung spricht gegen die eben aufgestellte Hypothese, dass für die verminderte Bindung des Proteins an die HCV-RNA eine Verdrängung des Proteins durch die direkte Interaktion der miR-122 mit ihren Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR von Bedeutung ist. Da

die variable Region der HCV-3'-UTR jedoch auch eine zu der „seed“-Region der miR-122 komplementäre Sequenz enthält, könnte hier eine mögliche Interaktion der miR-122 mit der HCV-RNA stattfinden, die zur Verdrängung des 68 kDa-Proteins führt.

2.3.2 Das 68 kDa-Protein interagiert mit der HCV-5'-UTR

Um zu untersuchen, ob der Effekt der miR-122 auf die Bindung des 68 kDa-Proteins an die HCV-RNA auf einer direkten Interaktion der miR-122 mit ihrer komplementären Sequenz in der HCV-3'-UTR zurückzuführen ist und ob das Protein an die 5'-UTR der HCV-RNA bindet oder mit der 3'-UTR interagiert, wurde für die Bindungsreaktion in cytoplasmatischem Zellextrakt eine HCV-RNA mit Wildtyp- oder mutierter 5'-UTR verwendet, in der die gesamte 3'-UTR deletiert war (Abb. 2.15 C).

Die Ergebnisse der Autoradiographie zeigen, dass das Proteinmuster im Allgemeinen dem, welches für die Experimente mit der HCV-RNA mit 3'-UTR beobachtet werden konnte, entspricht (Abb. 2.15 A und B). Auffallend ist, dass die dominante Proteinbande von 57 kDa durch Deletion der HCV-3'-UTR nicht mehr detektierbar war. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei diesem Protein um PTB handelt. Die Proteinbande von 68 kDa ist weiterhin zu erkennen und konnte durch die Konkurrenz mit miR-122 identifiziert werden. Dadurch wird deutlich, dass das Protein mit der HCV-5'-UTR interagiert.

Die Vermutung, dass eine direkte Interaktion der miR-122 mit ihren beiden Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR zur Verdrängung des Proteins und damit zur Abschwächung seiner Bindung an die HCV-RNA führt, wurde hier allerdings widerlegt. Bei Zutreffen dieser Hypothese sollte die Bindung des 68 kDa-Proteins an die mutierte HCV-RNA nicht durch die authentische miR-122, sondern nur durch die mutierte miR-122 zu vermindert werden. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Inhibition der Proteinbindung durch die authentische miR-122 sowohl bei der HCV-RNA mit den konservierten miR-122-Zielsequenzen als auch bei der HCV-RNA mit den mutierten miR-122-Zielsequenzen zu beobachten war (Abb. 2.15 A und B). Im Gegensatz dazu konnte die Bindung des 68 kDa-Proteins an die Wildtyp- oder mutierte HCV-RNA erst bei einem 1000-fachen Überschuss an mutierter miR-122 minimal inhibiert werden. Die in HeLa-Zellextrakt erzielten Ergebnisse konnten im Extrakt der unverwandten Hepatomazelllinie Huh7 bestätigt werden. Auch hier führte die Konkurrenz mit miR-122 im Gegensatz zu miR-122 mu oder miR-124 zu der Abschwächung der Interaktion des 68 kDa-Proteins mit der HCV-RNA (Abb. 2.15 D).

Die verminderte Bindung des 68 kDa-Proteins an die HCV 5'-UTR ist wahrscheinlich auf die Bindung des Proteins an die miR-122 zurückzuführen. Da sich die authentische und die mutierte miR-122 in ihrer Sequenz nur in den Nukleotiden 2 bis 8, der sogenannten „seed“-Sequenz

unterscheiden, lassen sich die differierenden Bindungsaffinitäten des 68 kDa-Proteins eventuell durch eine leichte Präferenz des Proteins für die 5'-terminale Sequenz der Wildtyp-miR-122 erklären.

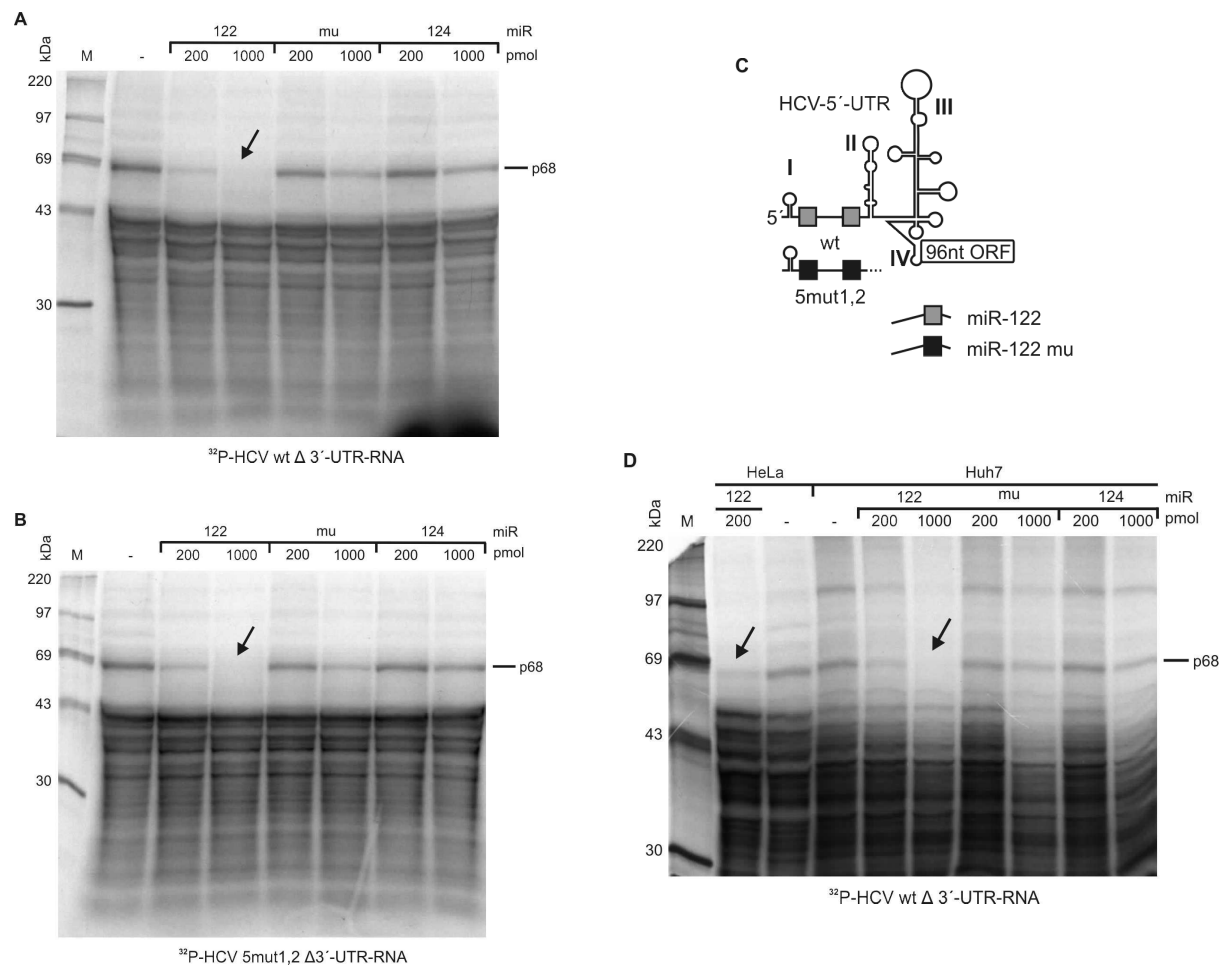


Abb. 2.15: Das 68 kDa-Protein interagiert mit der HCV-5'-UTR. (A, B) UV-Crosslink-Experimente der radioaktiv markierten Wildtyp- oder mutierten HCV-RNA mit deletierter HCV-3'-UTR (C) in HeLa-Zellextrakt in Abwesenheit und Anwesenheit von 200 pmol oder 1000 pmol nicht markierter miR-122, miR-122 mu oder miR-124. (C) Die radioaktiv markierte HCV-RNA mit den konservierten (graue Kästen) oder mutierten (schwarze Kästen) miR-122-Zielsequenzen in der 5'-UTR und die dazu komplementäre nicht radioaktiv markierte miR-122 oder miR-122 mu. Die RNA enthält einen offenen Leserahmen von 96 Nucleotiden einschließlich 61 Nucleotide der für das HCV-Core-Protein codierenden Sequenz. Die HCV-3'-UTR mit der zu der miR-122 komplementären Sequenz in der variablen Region ist deletiert. (D) UV-Crosslink-Experiment der radioaktiv markierten Wildtyp-HCV-RNA mit deletierter HCV-3'-UTR (C) in Huh7-Zellextrakt in Abwesenheit und Anwesenheit von 200 oder 1000 pmol nicht markierter miR-122, miR-122 mu oder miR-124. Die Identifizierung des 68 kDa-Proteins erfolgte durch ein UV-Crosslink-Experiment mit radioaktiv markierter HCV-RNA in HeLa-Zellextrakt in Abwesenheit beziehungsweise Anwesenheit der miR-122. Die Proteine eines jeden UV-Crosslink-Experimentes wurden auf einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt, getrocknet und autoradiographiert (A und B; 24h, Raumtemperatur, D; 10 Tage, Raumtemperatur). Die Pfeile kennzeichnen das 68 kDa-Protein. M, ^{14}C -Proteinmarker.

2.3.3 Charakterisierung des 68 kDa-Proteins

Bei der näheren Charakterisierung des Proteins von 68 kDa sollte zunächst festgestellt werden, ob es sich hierbei um Serumalbumin mit einem Molekulargewicht von etwa 69 kDa handelt. Dazu wurde die kurze intern radioaktiv markierte HCV-RNA mit deletierter HCV-3'-UTR mit unterschiedlichen Mengen Albumin inkubiert, um dessen Bindung an die RNA zu erlauben. Da die Albumine unterschiedlicher Spezies eine sehr hohe Homologie zueinander aufweisen, wurde bovines Serumalbumin (BSA) für die UV-Crosslink-Experimente verwendet.

Das Ergebnis der Autoradiographie zeigt, dass trotz der Inkubation der HCV-RNA mit sehr großen Mengen BSA keine radioaktiv markierten Proteinbanden detektiert werden konnten (Abb. 2.16 A). Dadurch konnte bewiesen werden, dass die HCV-RNA nicht an Albumin bindet und dass es sich daher bei dem Protein von etwa 68 kDa nicht um Albumin handeln kann. Diese Beobachtung wird durch die Tatsache unterstützt, dass Albumin ausschließlich in der Leber synthetisiert wird, das Protein von 68 kDa aber sowohl in HeLa-Zellen als auch in der Hepatomazelllinie Huh7 durch Interaktion mit der radioaktiv markierten HCV-RNA nachgewiesen werden kann.

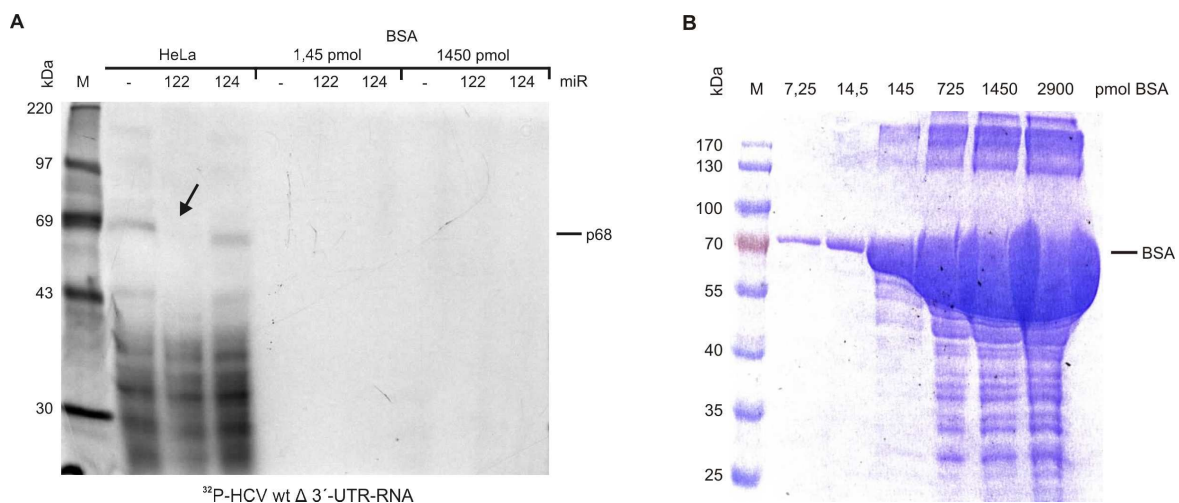


Abb. 2.16: Bei dem 68 kDa-Protein handelt es sich nicht um Serumalbumin. (A) UV-Crosslink-Experiment der radioaktiv markierten HCV-RNA mit 1,45 pmol oder 1450 pmol BSA in Abwesenheit und Anwesenheit von 200 pmol oder 1000 pmol nicht markierter miR-122, miR-122 mu oder miR-124. Zur Kontrolle und Identifizierung des 68 kDa-Proteins wurde ein entsprechendes UV-Crosslink-Experiment in HeLa-Zellextrakt durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend auf einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt, getrocknet und autoradiographiert (7 Tage, -70°C). Der Pfeil kennzeichnet das 68 kDa-Protein. M, ^{14}C -Proteinmarker. (B) Visualisierung unterschiedlicher Mengen BSA mittels eines Coomassie-Blau-gefärbten 10 % SDS-Polyacrylamidgels. M, Proteinmarker PAGE-Ruler.

Zur weiteren Untersuchung der Spezifität des Effekts der miR-122 auf die Interaktion des 68 kDa-Proteins mit der HCV-IRES wurden UV-Crosslink-Experimente in HeLa-Zellextrakt mit einer zur HCV-IRES unverwandten radioaktiv markierten FMDV (*foot-and-mouth disease virus*)-IRES durchgeführt (Abb. 2.17 A und B). Dadurch sollte überprüft werden, ob das 68 kDa-Protein speziell

an die 5-UTR des HCV bindet beziehungsweise ob der Effekt der miR-122 auf das 68 kDa-Protein nur bei der HCV-IRES zu beobachten ist.

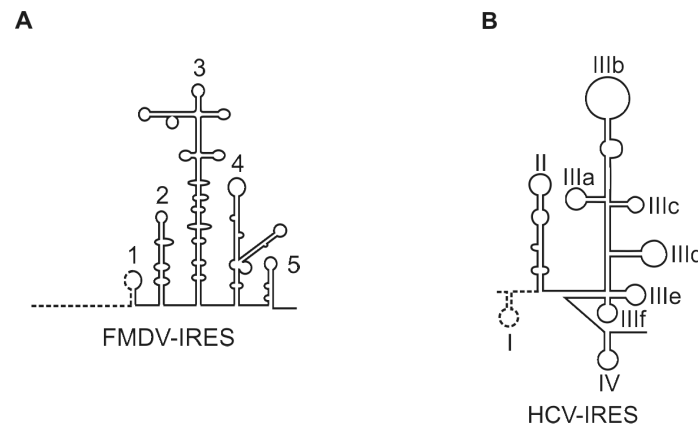


Abb.: 2.17: Organisation viraler IRES-Elemente. (A, B) Schematische Darstellung der FMDV- und HCV-IRES mit der in der Literatur gängigen Bezeichnung ihrer Domänen. Modifiziert nach Niepmann, 2009a.

Die Autoradiographie der über ein SDS-Gel aufgetrennten radioaktiv markierten Proteine des UV-Crosslinks mit der FMDV-IRES zeigt eine starke Bande im Bereich von 57 kDa, bei der es sich mit einer großen Wahrscheinlichkeit um das Polypyrimidintrakt-Bindeprotein (PTB) handelt (Abb. 2.18, Spur 2). Außerdem ist eine Bande im Bereich von 220 kDa zu erkennen, deren Migrationsverhalten dem des Translations-Initiationsfaktors eIF4G entspricht. PTB interagiert mit den Stem-Loops 2, 4 und 5 der FMDV-IRES, erleichtert durch eine Chaperon-ähnliche Funktion das Heranführen des Translations-Initiationsfaktors eIF4G an die Stem-Loops 4 und 5 der FMDV-IRES und stimuliert dadurch ihre Aktivität (Saleh et al., 2001; Song et al., 2005). Weiterhin konnte die Interaktion der FMDV-IRES mit Proteinen im Bereich von 110 kDa und 68 kDa detektiert werden (Abb. 2.18). Das Autoradiogramm zeigt, dass die Bindung dieser Proteine an die FMDV-IRES in Anwesenheit der miR-122 verringert wurde, wohingegen die miR-124 keinen Effekt hatte (Abb. 2.18, Spur 3 und 4). Da die FMDV-IRES mit den Untereinheiten p110 und p116 des Translations-Initiationsfaktors eIF3 interagiert (Lopez de Quinto et al., 2001), könnten diese Proteinbanden den verschiedenen eIF3-Untereinheiten entsprechen.

eIF3 hat ein Molekulargewicht von etwa 700 kDa und besteht aus 13 individuellen Untereinheiten. Auch HCV nutzt eIF3 zur Initiation der IRES-vermittelten Translation des viralen Polyproteins. Durch Bindung der Untereinheiten p170, p116, p66 und p47 an die Regionen a, b und c der Domäne III der HCV-IRES, unterstützt eIF3 die Bindung der 40S-ribosomalen Untereinheit an die IRES und ist für die effiziente Bildung von 80S-Ribosomen absolut essentiell (Buratti et al., 1998; Pestova et al., 1998b; Sizova et al., 1998, Kieft et al., 2001). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Bindung von eIF3-Untereinheiten durch die Deletion der Domäne III b der HCV-IRES stark reduziert wird (Ji et al., 2004).

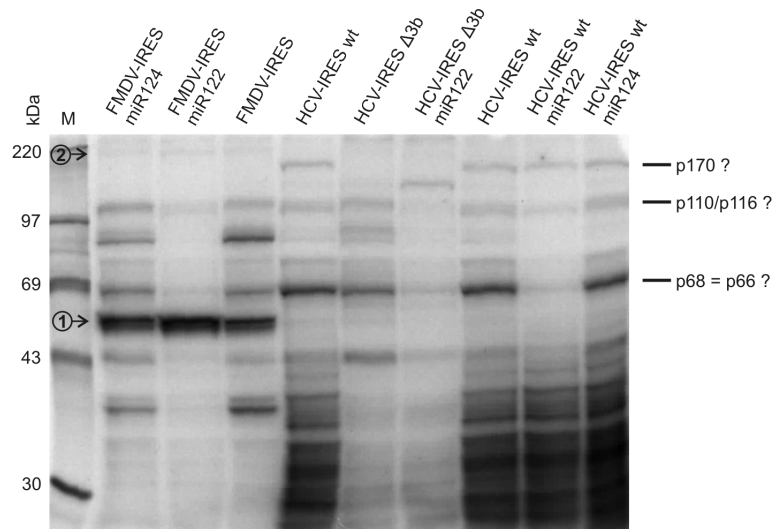


Abb.: 2.18: Das 68 kDa-Protein interagiert mit der FMDV-IRES. UV-Crosslink-Experiment einer radioaktiv markierten FMDV-IRES, einer Wildtyp-HCV-IRES oder HCV-IRES mit deletierter Domäne III b in HeLa-Zellextrakt. Die RNA-Protein-Bindungen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von 500 pmol nicht markierter miR-122 oder miR-124 durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend auf einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt, getrocknet und autoradiographiert (3 Tage, -70°C). Gekennzeichnet sind die Proteine PTB (1) und eIF4G (2) sowie die vermeintlichen eIF3-Untereinheiten p170, p100/116 und p66 beziehungsweise das zu identifizierende 68 kDa-Protein p68. M, ^{14}C -Proteinmarker.

Um zu prüfen, ob es sich bei dem mit der HCV-RNA interagierenden 68 kDa-Protein um eine eIF3-Untereinheit handelt, wurden RNA-Protein-Bindungen einer intern radioaktiv markierten RNA mit deletierter Region III b der HCV-IRES in HeLa-Extrakt in Abwesenheit beziehungsweise Anwesenheit der miR-122 durchgeführt. Durch die Deletion der Domäne III b konnte im Vergleich zu der Wildtyp-HCV-IRES die Interaktion des Proteins im Bereich von 170 kDa nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 2.18, Spur 6). Dies spricht dafür, dass es sich bei diesem Protein um die eIF3-Untereinheit p170 handelt. Weiterhin detektierbar waren jedoch die Proteinbanden im Bereich von 110 kDa und 68 kDa, deren Bindung an die HCV-IRES in Anwesenheit der miR-122 ebenfalls reduziert wurde (Abb. 2.18, Spur 7). Dies spricht gegen die Überlegung, dass es sich bei diesen Proteinen um die Untereinheiten p116/p110 oder p66 des Initiationsfaktors eIF3 handelt.

Der Vergleich mit den Ergebnissen eines UV-Crosslink-Experimentes in Huh7-Zellextrakt mit einer HCV-IRES ohne die Domänen III a, b, c und d ($\Delta 3$ in Abb. 12 B, Dissertation Y. Song, 2006) zeigte, dass trotz der Deletion fast der gesamten Domäne III der HCV-IRES noch immer die Proteinbanden p110 und p68 detektiert werden konnten. Da die Domänen III a, b und c in zahlreichen Studien als eIF3-Interaktionsstellen identifiziert wurden, lässt dieses Ergebnis vermuten, dass es sich bei den Proteinen im Bereich von 110 kDa und 68 kDa nicht um eIF3-Untereinheiten handelt. Wahrscheinlich ist die durch die miR-122 verminderte Bindung des Proteins p116/p110 (Abb. 2.18, Spur 7) eher unspezifischer Natur, da dieser Effekt in den vorhergehenden Experimenten nicht beobachtet werden konnte. Durch die fast vollständige Deletion der Domäne III lässt sich eine Bindung des Initiationsfaktors eIF3 allerdings nicht absolut ausschließen, da die Bindung von eIF3-

Untereinheiten durch die noch intakten Regionen III e und f der HCV-IRES übernommen werden könnte. Aus diesen Ergebnissen geht also nicht eindeutig hervor, ob es sich bei den durch das UV-Crosslink-Experiment nachgewiesenen Proteinen im Molekularbereich von 110 kDa und 68 kDa um Untereinheiten des Initiationsfaktors eIF3 handelt. Folglich können keine Rückschlüsse auf die Identität des Proteins von 68 kDa, dessen Bindung an die HCV-IRES spezifisch durch die miR-122 vermindert wird, gezogen werden. Da eIF3 jedoch für die Initiation der Translation an der HCV-IRES notwendig ist, ist es relativ unwahrscheinlich, dass die Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 auf der verminderten Bindung dieses Proteins an die HCV-IRES beruht.

2.3.4 Fazit

Bei der Suche nach Faktoren, die den stimulierenden Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation vermitteln, wurde ein Protein von etwa 68 kDa gefunden, dessen Bindung an die HCV-RNA spezifisch durch die miR-122 vermindert wird. Dieser Effekt beruht nicht auf einer Verdrängung des Proteins von der HCV-RNA durch Bindung der miR-122 an ihre Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR und kann durch die Sequenz-spezifische Inhibition der miR-122 mit dem 2'-O-methylierten Gegenstrang-Oligoribonukleotid anti-miR-122 unterbunden werden. Bei dem 68 kDa-Protein handelt es sich nicht um Serumalbumin. Die Bindung des Proteins konnte auch an einer zur HCV-IRES unverwandten FMDV-IRES demonstriert werden. Die daraus entstandene Hypothese, dass es sich bei dem Protein um die eIF3-Untereinheit p66 handeln könnte, konnte durch weitere Untersuchungen zur näheren Charakterisierung des Proteins durch RNA-Protein-Bindungsstudien jedoch nicht bestätigt werden.

2.4 Analyse von microRNA-Protein-Bindungen

In dem vorangehenden Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Bindung eines Proteins von 68 kDa an die HCV-RNA durch die leberspezifische miR-122 signifikant vermindert wird. Da dieser Effekt anscheinend nicht auf der Verdrängung des Proteins durch Bindung der miR-122 an ihre Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR beruht, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um einen kompetitiven Effekt handelt. Anscheinend kompetiert die miR-122 mit der HCV-RNA um die Bindung an dieses Protein. In diesem Teil der Arbeit sollte daher die Bindung des 68 kDa-Proteins an die miR-122 durch UV-Crosslink-Experimente nachgewiesen werden.

Da ein wesentlicher Schritt eines UV-Crosslink-Experimentes der Abbau nicht kovalent gebundener RNA durch RNase ist, muss die verwendete RNA intern, das heißt während ihrer Synthese, radioaktiv markiert werden. Eine einfache Markierung am 5'-Ende der RNA wäre nicht ausreichend, um kovalent gebundene Proteine über Autoradiographie sichtbar zu machen, da nicht durch die Bindung des Proteins geschützte RNA anschließend endonukleolytisch abgebaut wird und somit zur Markierung des Proteins nicht mehr zur Verfügung steht. Aus diesem Grund wurde im ersten Teil dieses Kapitels der Fokus auf die effiziente Synthese radioaktiv markierter miRNA durch *in vitro* Transkription gelegt.

2.4.1 Herstellung intern radioaktiv markierter microRNAs

Die *in vitro* Transkription unter Verwendung der Bakteriophagen T7-RNA-Polymerase ist eine effiziente Methode zur RNA-Synthese von linearisierter Plasmid-DNA oder von PCR-Produkten, hat aber im Hinblick auf die Synthese von miRNAs eine wesentliche Einschränkung. Die Effizienz der RNA-Synthese ist stark abhängig von der Sequenz der Initiationsstelle und des Promotors (Chapman et al., 1988) (Abb. 2.19 A). Die Initiationseffizienz der Transkription und damit der Gehalt an synthetisierter RNA ist hoch, sofern das 5'-Ende der RNA reich an Purinen ist, andernfalls ist die Ausbeute sehr gering. Um diese Restriktion zu umgehen und miRNAs mit exaktem 5'- und 3'-Ende in ausreichender Menge herstellen zu können, wurden spezielle Konstrukte nach dem Vorbild einer Studie von Price und Ko-Autoren verwendet (Price et al., 1995). In den dafür entworfenen Plasmiden miR-122_BsmAI, miR-122mu_BsaI und miR-124_BsmAI geht der miRNA-Sequenz die Sequenz eines *cis*-aktiven Hammerhead-Ribozyms voraus, und es schließt sich eine Restriktionsschnittstelle für die Enzyme BsmAI oder BsaI an (Abb. 2.19 C).

Hammerhead-Ribozyme sind kleine, in ausgeprägter Sekundärstruktur vorliegende katalytische RNA-Moleküle, die in der Lage sind, eine Phosphodiesterbindung direkt stromabwärts (3') der Hammerhead-Ribozymsequenz zu spalten. Eine effiziente Spaltung kann nur erfolgen, wenn bestimmte Sequenzanforderungen im Kern des Ribozyms berücksichtigt werden (Abb. 2.19 B) (Haseloff und Gerlach, 1988; Koizumi et al., 1989; Sheldon und Symons, 1989). Mit Hilfe des

stromaufwärts (5') der miRNA-Sequenz angeordneten Ribozyms ist es also möglich, die Sequenzanforderung für die T7-RNA-Polymerase an das 5'-Ende der Sequenz des Hammerhead-Ribozyms zu verlagern, das authentische 5'-Ende der miRNA zu erhalten und die RNA trotzdem effizient zu synthetisieren. Die Restriktionsenzyme BsmAI und BsaI schneiden außerhalb ihrer Erkennungssequenz, wodurch der Matrizenstrang so gespalten wird, dass das 3'-Ende der synthetisierten RNA dem authentischen 3'-Ende der miRNA entspricht (Abb. 2.19 C).

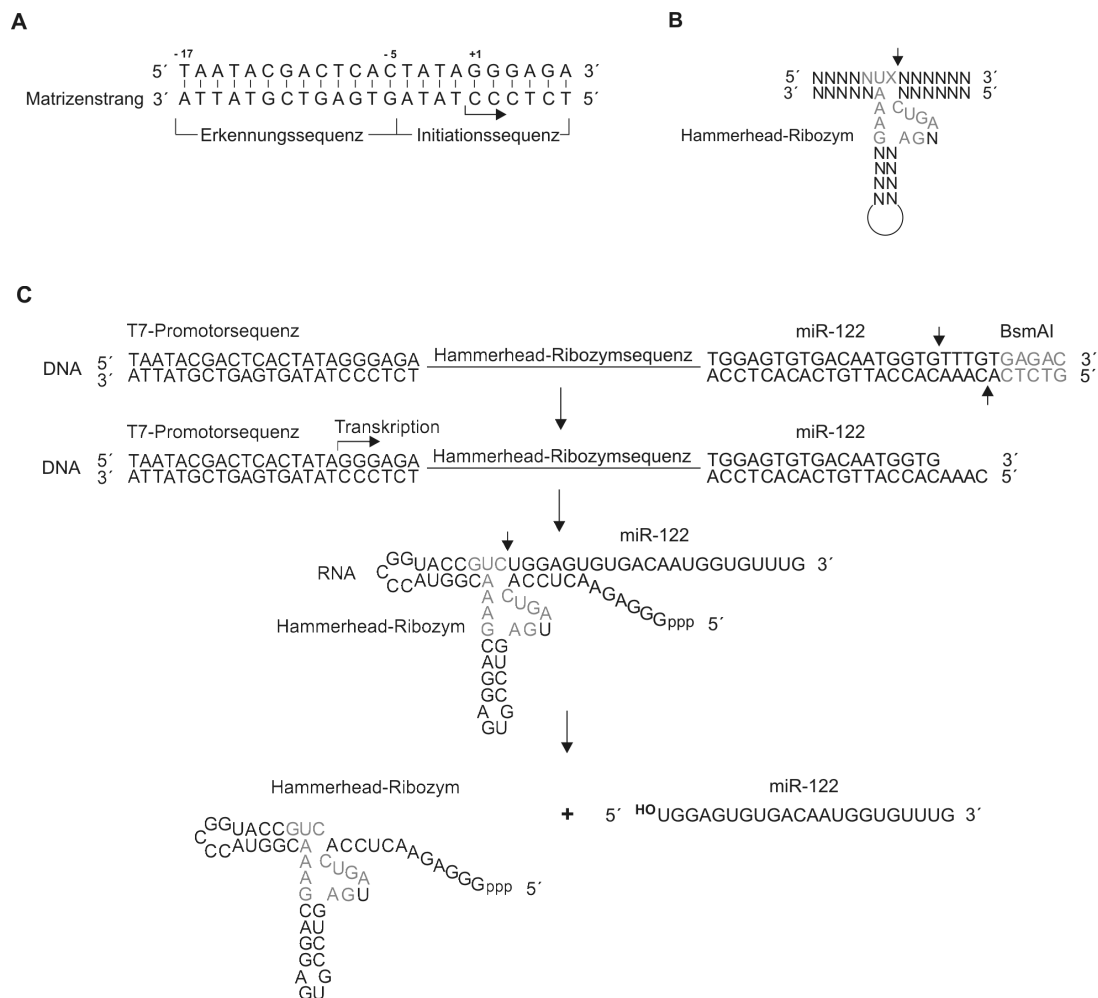


Abb. 2.19: Herstellung intern radioaktiv markierter microRNAs. (A) Die Konsensus-Sequenz des T7-RNA-Polymerase-Promotorelements. Das Promotorelement unterteilt sich in eine Erkennungsdomäne (Position -17 bis -5) für die T7-RNA-Polymerase und eine Initiationsdomäne (Position -4 bis +6). Der Pfeil zeigt den Startpunkt der Transkription an. Die Initiationssequenz ist somit Teil der entstehenden RNA. **(B) Das Hammerhead-Ribozym.** Die für eine effiziente Spaltung erforderlichen konservierten Sequenzen sind grau markiert. N = rA, rC, rG oder rU, X = rA, rC oder rU. Die Spaltstelle ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. **(C) Schematische Darstellung der Synthese von miR-122 durch *in vitro* Transkription.** Gezeigt ist die DNA-Matrize von pmiR-122_BsmAI vor und nach der Spaltung mit dem Restriktionsenzym BsmAI und das Produkt der *in vitro* Transkription durch die T7-RNA-Polymerase. Nach der Prozessierung des RNA-Moleküls durch das 5'-terminale cis-aktive Hammerhead-Ribozym erhält man die miR-122 mit authentischem 5'- und 3'-Ende. Die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym BsmAI ist grau markiert. Alle Spaltstellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. B und C modifiziert nach Price et al., 1995.

Zur Synthese der radioaktiv markierten miRNA wurden die Plasmide miR-122_BsmAI, miR-122mu_BsaI und miR-124_BsmAI zunächst mit dem entsprechenden Restriktionsenzym BsmAI oder BsaI linearisiert. Die Enzyme BsmAI und BsaI spalten die DNA am 5'-Ende der Erkennungssequenz 5'-(N₅)GAGAC-3' beziehungsweise 5'-(N₅)GAGACC-3'. Anschließend erfolgte die Transkription von den linearisierten DNA-Matrizen durch die T7-RNA-Polymerase in Anwesenheit von [α -³²P]-UTP. In Abbildung 2.19 C ist die Herstellung radioaktiv markierter miRNA am Beispiel der miR-122 gezeigt. Da die Spaltung des RNA-Moleküls durch das Hammerhead-Ribozym von divalenten Metallionen abhängig ist (Dahm und Uhlenbeck, 1991), wurde die Prozessierungsreaktion im Anschluss an die Transkription in Anwesenheit von Mg²⁺ durchgeführt. In einer gelelektrophoretischen Analyse der Synthese und Prozessierung der miR-122 bei unterschiedlichem Mg²⁺-Gehalt erwies sich eine MgCl₂-Konzentration von 22 mM, zusätzlich zu dem im Transkriptionspuffer enthaltenem MgCl₂, zur Spaltung des RNA-Moleküls als ausreichend (Abb. 2.20 A).

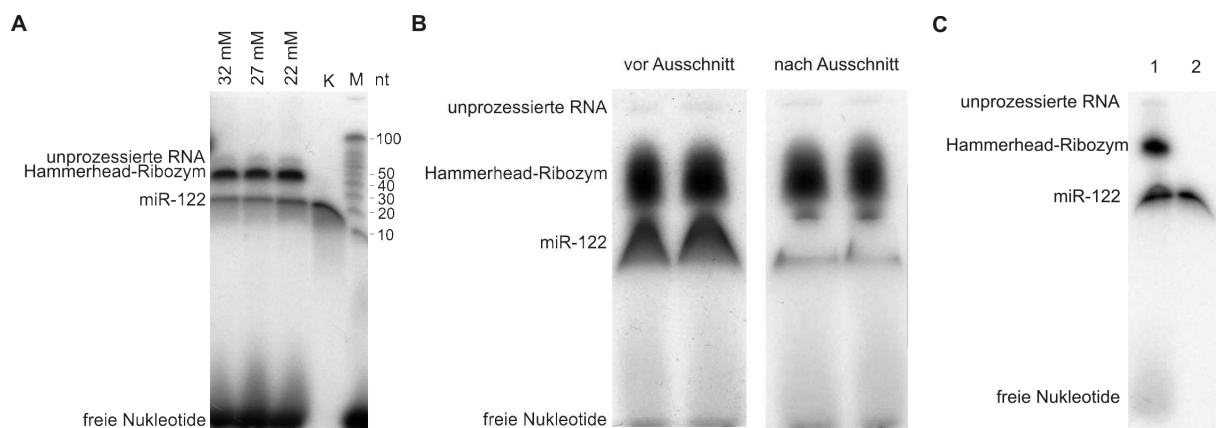


Abb. 2.20: Prozessierung und Aufreinigung intern radioaktiv markierter miR-122. (A) Effizienz der posttranskriptionellen Spaltung des *in vitro* synthetisierten miR-122-Konstruktes durch das *cis*-aktive Hammerhead-Ribozym in Anwesenheit von 32 mM, 27 mM oder 22 mM MgCl₂. Die *in vitro* Transkriptionen wurden für 4 Stunden und die Prozessierungsreaktionen für 2 Stunden bei 37°C durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte über ein denaturierendes 15 % Polyacrylamidgel. Als Kontrolle (K) wurde eine 5'-radioaktiv markierte miR-122 aufgetragen. Der radioaktiv markierte RNA-Marker (M) wurde durch Verwendung des Decade™ Marker Systems (Ambion) hergestellt. Eine Marker-RNA von 150 Nukleotiden Länge wurde zunächst in einer Kinase-Reaktion an ihrem 5'-Ende mit [γ -³²P]-ATP markiert und anschließend in einer Reaktion mit einem Schneide-Reagenz zu einem Set aus Marker-Banden prozessiert. Exposition 15 min, Raumtemperatur. (B) Präparation der *in vitro* synthetisierten miR-122 aus einem denaturierenden 15 % Polyacrylamidgel. Exposition 90 sec, Raumtemperatur. (C) Intern radioaktiv markierte miR-122 vor (1) und nach (2) der Aufreinigung aus einem präparativen Polyacrylamidgel. Exposition 5 min, Raumtemperatur.

Es konnten drei RNA-Moleküle unterschiedlicher Größe detektiert werden. Die oberste Bande stellt wahrscheinlich den geringen Anteil unprozessierter RNA von 74 Nukleotiden Länge dar. Darunter ist eine sehr dominante Bande zu erkennen, die in etwa mit der Marker-RNA von 50 Nukleotiden im Polyacrylamidgel ko-migrierte. Diese Bande entspricht somit dem Hammerhead-Ribozym, das

zusammen mit der Initiationssequenz der T7-RNA-Polymerase und der kurzen zu dem 5'-Ende der miR-122 komplementären Sequenz eine Länge von 52 Nukleotiden hat. Knapp über der Marker-Bande von 20 Nukleotiden migriert ein RNA-Molekül, das aufgrund der Ko-Migration mit 5'-markierter miR-122 als miR-122 identifiziert werden konnte. Die Spaltung am Phosphodiester-Rückgrat der RNA durch das Hammerhead-Ribozym führt zu einem zyklischen 2',3'-Phosphodiester am Ende des Hammerhead-Ribozyms und einer 5'-OH-Gruppe an der miRNA (Buzayan et al., 1986). Aus diesem Grund mussten die miRNAs im Anschluss an ihre Prozessierung mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase an ihrem 5'-Ende phosphoryliert werden. Die weitere Aufreinigung der miRNAs erfolgte über präparative Polyacrylamidgele. Dazu wurden die prozessierten RNA-Moleküle zunächst elektrophoretisch aufgetrennt, die RNA-Banden mittels Autoradiographie nachgewiesen und unter Zuhilfenahme des entwickelten Röntgenfilms aus dem Gel ausgeschnitten (Abb. 2.20 B). Unter Anwendung dieser Methode war es möglich, intern radioaktiv markierte miRNAs mit authentischem 5'- und 3'-Ende *in vitro* zu synthetisieren (Abb. 2.20 C).

2.4.2 miR-122 interagiert mit dem 68 kDa-Protein

Um eine Bindung der miR-122 an das Protein von 68 kDa zu überprüfen und eine Konkurrenz mit der HCV-RNA um die Bindung an das Protein darzustellen, wurden RNA-Protein-Bindungsreaktionen mit intern radioaktiv markierten miRNAs in HeLa-Zellextrakt in Abwesenheit oder Anwesenheit unterschiedlicher Mengen nicht markierter HCV-RNA durchgeführt.

Das Ergebnis der Autoradiographie der auf einem SDS-Gel aufgetrennten radioaktiv markierten Proteine zeigt, dass sowohl bei der miR-122 als auch bei der mutierten miR-122 mu und der gehirnspezifischen miR-124 zwei Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich von etwa 45 kDa und 95 kDa detektiert werden konnten (Abb. 2.21 A und B). Da miRNAs auch *in vitro* mit Komponenten der miRNA-Maschinerie assoziiert sein können (Wakiyama et al., 2007), könnte es sich bei den Proteinen im Bereich von 95 kDa um Argonaute-Proteine handeln, die ein Molekulargewicht von etwa 97 kDa aufweisen. Auffallend ist, dass das Protein von etwa 45 kDa sehr stark durch die miR-122 mu markiert wurde. Da vergleichbare Mengen der miRNAs in die Bindungsreaktionen eingesetzt wurden, kann dieser Effekt nur im Zusammenhang mit einer starken Bindung der miR-122 mu an dieses Protein stehen.

Weiterhin ließ sich eine Proteinbande im Bereich detektieren, die in etwa mit dem an die HCV-RNA gebundenen 68 kDa Protein im SDS-Gel ko-migrierte (Abb. 2.21 A und B, Vergleich der Spuren 2, 3 und 4). Dieses Protein interagiert nicht mit der miR-124 und nur schwach mit der miR-122 mu, konnte aber im UV-Crosslink-Experiment mit der authentischen miR-122 nachgewiesen werden. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Crosslinks mit der markierten HCV-RNA, in denen die Bindung des 68 kDa-Proteins an die HCV-RNA durch die miR-124 nicht beeinflusst wurde und erst

ein 1000-facher Überschuss an miR-122 mu die Bindung leicht schwächen konnte (Kap. 2.3.2, Abb. 2.15). Weiterhin lässt sich erkennen, dass die Bindung dieses Proteins an die miR-122 durch Zugabe einer nicht markierten HCV-RNA mit beiden konservierten oder beiden mutierten miR-122-Zielsequenzen der 5'-UTR abgeschwächt werden konnte (Abb. 2.21 A und B). Die HCV-RNA kompetiert also mit der miR-122 um die Bindung des 68 kDa-Proteins. Daher ist es wahrscheinlich, dass es sich um das Protein handelt, welches in den Crosslink-Experimenten mit der radioaktiv markierten HCV-RNA detektiert werden konnte. Das etwas unterschiedliche Laufverhalten der durch die radioaktive HCV-RNA und die radioaktive miR-122 markierten Proteine ist möglicherweise auf unterschiedliches Trimmen der kovalent an die Proteine gebundenen RNAs durch die RNase zurückzuführen. Es bleibt also eine gewisse Unsicherheit bei der Identifizierung des Proteins.

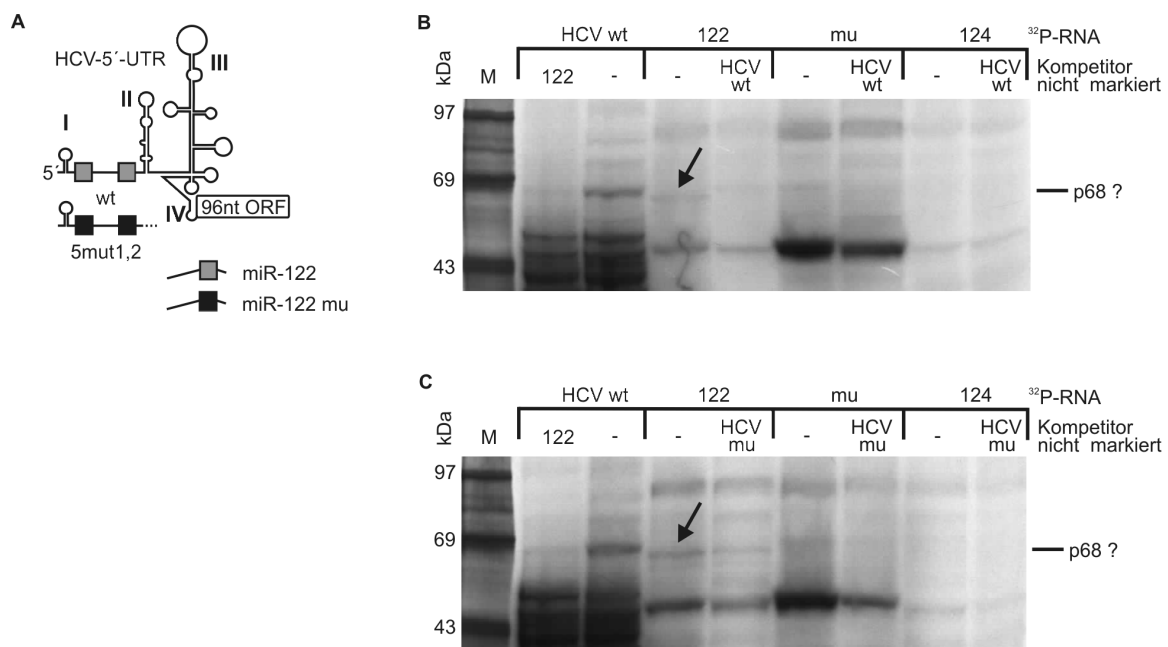


Abb. 2.21: Die miR-122 kompetiert mit der HCV-RNA um die Bindung des 68 kDa-Proteins. (A) Die in den UV-Crosslink-Experimenten verwendete nicht radioaktiv markierte HCV-RNA mit Wildtyp- (graue Kästen) oder mutierten (schwarze Kästen) miR-122-Zielsequenzen und deletierter HCV-3'-UTR, sowie die radioaktiv markierte miR-122 und miR-122 mu. (B und C) UV-Crosslink-Experiment der radioaktiv markierten miR-122, miR-122 mu und miR-124 in HeLa-Zellextrakt in Abwesenheit und Anwesenheit der nicht markierten Wildtyp- (B) oder mutierten (C) HCV-RNA. Das Protein von 68 kDa ist durch einen Pfeil markiert. Die Proteine wurden auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie (7 Tage, Raumtemperatur) sichtbar gemacht. Zur Identifizierung des 68 kDa-Proteins ist ein Crosslink mit radioaktiv markierter HCV-RNA in HeLa-Zellextrakt in Anwesenheit (Spur 2) oder Abwesenheit (Spur 3) von miR-122 aufgetragen.

2.4.3 Fazit

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit sollte eine Interaktion der miR-122 mit dem Protein von 68 kDa bestätigt werden, um die Konkurrenz der miR-122 mit der HCV-RNA um die Bindung an das Protein zu beweisen. Dabei konnte die Assoziation eines Proteins mit der miR-122 demonstriert werden, welches mit dem 68 kDa-Protein im SDS-Gel ko-migrierte und dessen Bindung an die miR-122 in Anwesenheit der HCV-RNA vermindert wurde. Daraus wurde geschlossen, dass es sich bei dem Protein um das gleiche 68 kDa-Protein handelt, welches auch mit der HCV-RNA interagiert.

Der in diesem Kapitel entwickelte experimentelle Ansatz wurde jedoch im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Da die UV-Crosslink-Effizienz der radioaktiv markierten microRNAs mit Proteinen der cytoplasmatischen Zellextrakte zu gering war, um eine ausreichend starke radioaktive Markierung auf mit der RNA interagierende Proteine zu übertragen und dadurch deutlich detektierbar zu machen, schien die Anfertigung von präparativen UV-Crosslink-Ansätzen mit der radioaktiven miR-122 zur weiteren Charakterisierung des 68 kDa-Proteins wenig Erfolg versprechend. Stattdessen sollte im folgenden Teil der Arbeit das mit der radioaktiven HCV-RNA interagierende 68 kDa-Protein identifiziert werden.

2.5 Methoden zur Identifizierung des 68 kDa-Proteins

In den vorangehenden Experimenten wurde in RNA-Protein-Interaktionsstudien das Bindungsverhalten eines Proteins von 68 kDa an die HCV-IRES unter Einwirkung der miR-122 untersucht. Eine nähere Charakterisierung dieses Proteins ist Voraussetzung, um untersuchen zu können, ob die Bindung des Proteins an die HCV-IRES die Translation der HCV-RNA beeinflusst und ob die Verminderung der Interaktion dieses Proteins mit der HCV-RNA durch die miR-122 in Beziehung zu dem stimulierenden Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation steht. Da aus den UV-Crosslink-Experimenten keine Rückschlüsse auf die Identität des 68 kDa-Proteins gezogen werden konnten, sollte das Protein in diesem Teil der Arbeit mittels Massenspektrometrie (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Flugzeit-Massenspektrometrie, MALDI-TOF-MS) identifiziert werden.

MALDI-TOF-MS ist eine geeignete Methode zur Analyse von Proteinen, die komplexiert mit RNA in sogenannten Ribonukleoprotein-Komplexen vorliegen (Höck et al., 2007). Allerdings ist für ihre Anwendung die Aufreinigung des zu identifizierenden Proteins notwendig, um die in komplexen Proteinmischungen häufig zu beobachtende Suppression der molekularen Ionisation zu reduzieren (Steen et al., 2001) und Kontaminationen, welche die Identifizierung beeinflussen könnten, abzureichern. Weiterhin sollte durch die optimierte Anreicherung des eventuell wenig abundanten 68 kDa-Proteins die Intensität der Peaks der MALDI-TOF-MS-Spektren erhöht und die Identifizierung dadurch erleichtert werden. Da durch den UV-Crosslink nur etwa 5 % bis 10 % der RNA-Protein-Interaktionen durch kovalente Bindungen fixiert und alle anderen Bindungen durch zum Beispiel denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgelöst werden (Song et al., 2005), war die Verwendung ausreichender Mengen radioaktiv markierter HCV-RNA und Zellysats notwendig, um das 68 kDa-Protein während der gesamten Aufreinigung über die radioaktive Markierung identifizieren zu können.

2.5.1 Anreicherung der Protein-RNA-Crosslinks mit Fe(III)-IMAC (immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie)

Um die durch UV-Induktion an die HCV-RNA kovalent gebundenen Proteine aus einem komplexen Proteingemisch wie HeLa- oder Huh7-Zellextrakt anzureichern, wurde zunächst die immobilisierte Fe³⁺-Metallchelat-Affinitätschromatographie auf ihre Anwendbarkeit überprüft. Bei dieser Chromatographie-Methode ist eine Metall-chelatierende Gruppe, in diesem Fall Nitrilotriessigsäure (NTA), am Säulenmaterial immobilisiert. Daran werden Fe³⁺-Metallionen so gebunden, dass Koordinationsbindungen für eine Interaktion mit basischen Gruppen von Proteinen zur Verfügung stehen. In einer Studie aus 1986 konnte gezeigt werden, dass Phosphatgruppen eine hohe Affinität zu Fe³⁺-Kationen haben (Andersson und Porath, 1986). Aus diesem Grund kann die an Proteine

kovalent geknüpfte RNA aufgrund ihres negativ geladenen Phosphodiester-Rückgrats an die Fe^{3+} -Ionen der Säule binden und RNA-Protein-Komplexe können aus den UV-Crosslink-Experimenten selektiv aufgereinigt werden. Diese Methode konnte bereits für die Anreicherung von DNA-Peptid- und RNA-Peptid-Heterokonjugaten erfolgreich angewendet werden (Geyer et al., 2004; Kühn-Hölsken et al., 2007).

Für die Aufreinigung der HCV-RNA-Protein-Crosslinks aus HeLa-Zellextrakt mittels Fe(III)-IMAC wurde der 10-fache UV-Crosslink-Ansatz in einer 50 mM Ammoniumacetatlösung (pH 5,8) aufgenommen und auf die Fe^{3+} -NTA-Agarose aufgeladen. Um die Interaktion der RNA mit den Fe^{3+} -Metallionen zu ermöglichen, wurde diese im Rahmen des UV-Crosslink-Experimentes nicht mit RNase getrimmt. Die Bindung der Probe an die Säule wurde durch Messung der Radioaktivität im Überstand der Säule verfolgt. Nach der Bindungsreaktion und mehreren Waschschrritten wurden die über die Phosphatgruppen der RNA gebundenen Proteine mit einem Ammoniumacetat/Kaliumhydrogenphosphat-Puffer (pH 8,5) in mehreren Schritten von der Säule eluiert. Zum besseren Ablösen der RNA von den Fe^{3+} -Ionen wurde dem Elutionspuffer zusätzlich RNase A zugegeben. Die Anreicherung der RNA-Protein-Komplexe aus dem UV-Crosslink-Ansatz wurde durch die Auftrennung der Proteine über ein SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung und Autoradiographie überprüft. Da die Erfassung der Coomassie-Blau-gefärbten Proteine des SDS-Gels mit Hilfe eines Flachbettscanners aufgrund technischer Schwierigkeiten jedoch nicht zufriedenstellend war, ist hier nur das Ergebnis der Autoradiographie gezeigt.

Das Autoradiogramm zeigt, dass sich das Muster der mit der radioaktiven HCV-RNA interagierenden Proteine des UV-Crosslinks-Ansatzes durch die Aufreinigung über die Fe(III)-IMAC nicht signifikant veränderte (Abb. 2.22, vergl. Spur 4 und 5 mit Spur 11). Die Verwendung von RNase A machte eine effektive Elution der Proteine von der Säule durch die endoribonukleolytische Spaltung der gebundenen RNA möglich. Durch die Färbung mit Coomassie-Blau konnten in diesen Spuren keine Proteinbanden detektiert werden (Scan des Coomassie-Blau-gefärbten Gels ist nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Abtrennung der UV-fixierten RNA-Protein-Komplexe aus einem komplexen Proteingemisch durch die Fe(III)-IMAC grundsätzlich möglich ist. Da die Effizienz des UV-Crosslinks sehr gering ist und nur etwa 5 % bis 10 % der RNA-Protein-Interaktionen fixiert werden, ist es nicht überraschend, dass die an RNA kovalent gebundenen Proteine nach der Elution von der Säule durch die Färbung mit Coomassie-Blau nicht sichtbar gemacht werden konnten. Das Ergebnis der Autoradiographie zeigt allerdings auch, dass ein Großteil der radioaktiv markierten RNA-Protein-Komplexe nicht an die Fe^{3+} -NTA-Agarose gebunden werden konnte und im Überstand der Säule zurück blieb (Abb. 2.22, Spur 11). Die Bindung der radioaktiv markierten RNA an die Fe^{3+} -Metallionen war nicht effizient genug, um die RNA-Protein-Komplexe vollständig aus dem Proteingemisch zu isolieren. Weiterhin ist erkennbar, dass relativ schwache Bindungen an die Säule durch die Waschschrritte gelöst wurden.

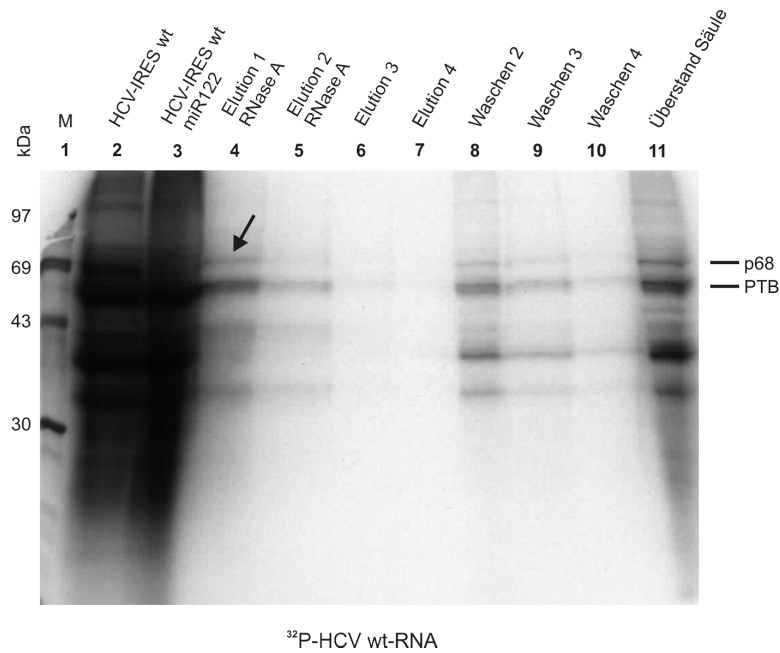


Abb. 2.22: Anreicherung der RNA-Protein-Crosslinks mittels Fe(III)-IMAC. Das Autoradiogramm (30 h, Raumtemperatur) zeigt die über ein 12 % SDS-Gel aufgetrennten Proteine eines UV-Crosslink-Experimentes in HeLa-Zellextrakt mit einer kurzen radioaktiv markierten RNA bestehend aus der HCV-5'-UTR, einem offenen Leserahmen von 96 Nukleotiden und der HCV-3'-UTR. Zur Identifizierung des 68 kDa-Proteins wurde ein UV-Crosslink-Ansatz der radioaktiv markierten HCV-RNA in HeLa-Zellextrakt in Abwesenheit oder Anwesenheit der miR-122 aufgetragen (Spur 2 und 3). Der Pfeil markiert das zu untersuchende 68 kDa-Protein. Die Spuren 4 bis 7 zeigen die durch die HCV RNA radioaktiv markierten Proteine nach der Elution von der Fe³⁺-NTA-Agarose. Durch das Waschen der Säule gelöste RNA-Protein-Komplexe sind in den Spuren 8 bis 10 aufgetragen. Die Spur 11 zeigt nicht an die Säule gebundene RNA-Protein-Komplexe. M = ¹⁴C-Poteinmarker.

Anhand dieses Ergebnisses lässt sich die Anwendbarkeit der Fe(III)-IMAC für die Aufreinigung der an die HCV-RNA durch UV-Crosslink fixierten Proteine aus einem komplexen Proteingemisch gut beurteilen. Die Bindung der radioaktiv markierten RNA an die Säule ist nicht effizient genug, um die daran kovalent gebundenen Proteine ausreichend anzureichern. Bisher wurde die Fe³⁺-IMAC nur zur Anreicherung von Phosphopeptiden und RNA- oder DNA-Peptid-Heterokonjugaten erfolgreich angewendet (Stensballe et al., 2001; Geyer et al., 2004; Kühn-Hölsken et al., 2007), wobei stringente Bedingungen mit einem niedrigen pH Grundvoraussetzung für die effiziente Bindung der Phosphatgruppen an die Fe³⁺-Ionen zu sein scheinen. Um die Präzipitation der zu reinigenden Proteine auf der Säule zu vermeiden, erfordert die Anwendung dieser sauren Bedingungen jedoch eine vorangehende Proteolyse der Proteine. Da der Nachweis und die Identifizierung eines bestimmten, an die HCV-RNA gebundenen Proteins aus einem Gemisch von RNA-Peptid-Heterokonjugaten jedoch nicht möglich ist, konnte eine proteolytische Spaltung der mit der HCV-RNA interagierenden Proteine zur effizienten Bindung von RNA-Peptid-Heterokonjugaten an die Fe³⁺-Ionen nicht durchgeführt werden. Aus diesen Gründen wurde die Methode der Fe(III)-IMAC zur Aufreinigung und Anreicherung der an die HCV-RNA kovalent gebundenen Proteine für die massenspektrometrische Analyse und Identifizierung des 68 kDa-Proteins als nicht geeignet eingestuft und nicht weiter verfolgt.

2.5.2 Auftrennung der Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und anschließende MALDI-TOF-MS-Analyse der isolierten Proteine

Da die Methode der Fe(III)-IMAC für die Anreicherung der RNA-Protein-Crosslinks nicht geeignet ist, sollten die an radioaktiv markierte HCV-RNA fixierten Proteine innerhalb des komplexen Proteingemisches eines HeLa- oder Huh7-Zellysates über eine hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und die radioaktiven Proteinspots über Autoradiographie für die anschließende massenspektrometrische Analyse nachgewiesen werden.

Da die Empfindlichkeit der Autoradiographie eines nassen Gels durch die starke Absorption der Strahlung durch Wasser („Quenchen“) enorm herabgesetzt wird und ein Trocknen des 2D-Gels aufgrund der nachfolgenden Proteinidentifizierung nicht möglich war, wurden die aufgetrennten Proteine zunächst auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran transferiert und die radioaktiven Proteinspots anschließend durch Exposition gegen einen Röntgenfilm sichtbar gemacht. Dabei war darauf zu achten, dass der Film genau auf die Membran ausgerichtet wurde, um später „blind“ und nur unter Zuhilfenahme der Autoradiographie die Proteinspots aus der Membran auszustechen. Zur leichteren Detektion des an die HCV-RNA gebundenen 68 kDa-Proteins sollte das Protein von radioaktiven Spots des Polypyrimidintrakt-Bindeproteins (57 kDa) freigestellt werden. Zu diesem Zweck wurde in den UV-Crosslink-Experimenten eine intern radioaktiv markierte RNA mit authentischer HCV-IRES und einem offenen Leserahmen von 96 Nukleotiden eingesetzt, in der die HCV-3'-UTR und somit die Bindungsstelle des PTB nicht enthalten war.

Die isolierten Proteinspots wurden mittels der MALDI-TOF-MS-Analyse identifiziert. Dazu wurden die Proteine innerhalb der Gel- oder Membranmatrix tryptisch gespalten und die Massen entstandener Peptidfragmente in einem Flugzeit-Massenspektrometer bestimmt. Die Gesamtheit aller erhaltenen Peptidmassen lieferte so für jedes Protein einen sogenannten Peptidmassen-Fingerabdruck, durch den das Protein mit Hilfe der Mascot-Software (Matrix Science) durch den Vergleich mit *in silico* verdauten Proteinen in der NCBI-nr-Datenbank identifiziert werden konnte. Für die Übereinstimmung von experimentell und theoretisch ermittelten Daten berechnet das Programm einen sogenannten „Mowse Score“ ($-10 \cdot \log(P)$) der die Wahrscheinlichkeit (P) angibt, mit der die Übereinstimmung der Massen ein zufälliges Ereignis ist. Ist der „Mowse Score“ einer Protein-Identifizierung größer als der für diese Identifizierung berechnete Signifikanz-Grenzwert ($p < 0,05$), wird die Identifizierung als signifikant betrachtet. Die 2D-Gelelektrophorese und die MS-Analyse der isolierten Proteine wurden von der Proteinanalytik-Abteilung des Biochemischen Instituts Gießen (Dr. G. Lochnit) durchgeführt.

Versuch 1: Auftrennung und Analyse der RNA-Protein-Crosslinks aus HeLa-Extrakt

In einem ersten Versuch konnte durch die Autoradiographie der über eine 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten und auf eine PVDF-Membran übertragenen Proteine eines UV-Crosslink-Experimentes der radioaktiv markierten HCV-RNA in HeLa-Extrakt eine Kette aus sieben radioaktiv markierten Proteinspots detektiert werden, die im SDS-Gel im Bereich von 69 kDa migrierten und wahrscheinlich das an die HCV-RNA kovalent gebundene 68 kDa-Protein darstellten (Abb. 2.23). Eine solche Serie von Proteinspots, sogenannte „trains of spots“, findet man häufig bei der Analyse von Proteinen mittels der 2D-Elektrophorese (2DE) (Anderson und Anderson, 1991). Dabei kann die Serie von Spots einem einzigen Protein mit unterschiedlicher Nettoladung oder Masse zugeordnet werden, die sich in Verschiebungen des isoelektrischen Punktes oder des Molekulargewichtes äußern. Diese Heterogenitäten in den 2DE-Mustern lassen sich häufig auf post-translationale Molekülmodifikationen wie Phosphorylierung, Glykosylierung oder Ausbildung von Disulfidbrücken zurückführen. Bei der zweidimensionalen Auftrennung UV-fixierter RNA-Protein-Komplexe ist die Ursache einer solchen Serie von Proteinspots wahrscheinlich auch in der zusätzlichen Ladung kovalent gebundener RNA-Oligonukleotide unterschiedlicher Länge begründet.

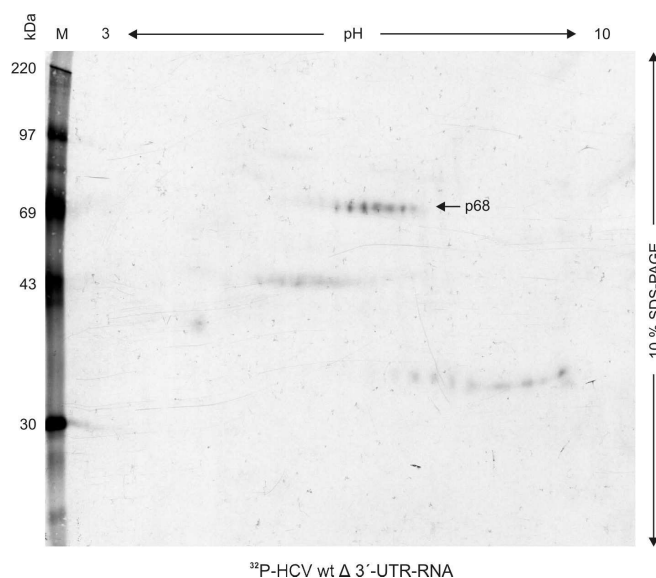


Abb. 2.23: Auftrennung der RNA-Protein-Crosslinks mittels 2D-Gelelektrophorese. Die Autoradiographie (5 Tage, -70°C) zeigt die durch eine 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten und auf eine PVDF-Membran übertragenen radioaktiv markierten Proteine eines UV-Crosslink-Experimentes einer radioaktiv markierten RNA mit authentischer HCV-5'-UTR und einem offenen Leserahmen von 96 Nukleotiden in HeLa-Zellextrakt. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte über einen pH-Gradienten von pH 3 – pH 10 und die Auftrennung der Proteine auf einem 10 % SDS-Gel. Der Pfeil kennzeichnet die für die MS-Analyse isolierten Proteinspots. M = ¹⁴C-Proteinmarker.

Die massenspektrometrische Analyse der durch den Verdau mit Trypsin erhaltenen Peptidfragmente zeigte, dass die Ionisierbarkeit und damit die Detektion von Peptidmassen im Bereich von 800-3000 Da effizient war (Abb. 2.24). Durch die Mascot-Datenbankanalyse der ermittelten Massen konnte jeder der sieben Proteinspots als Kupfer-transportierende ATPase 1 (ATP7A Isoform 3, human) identifiziert werden.

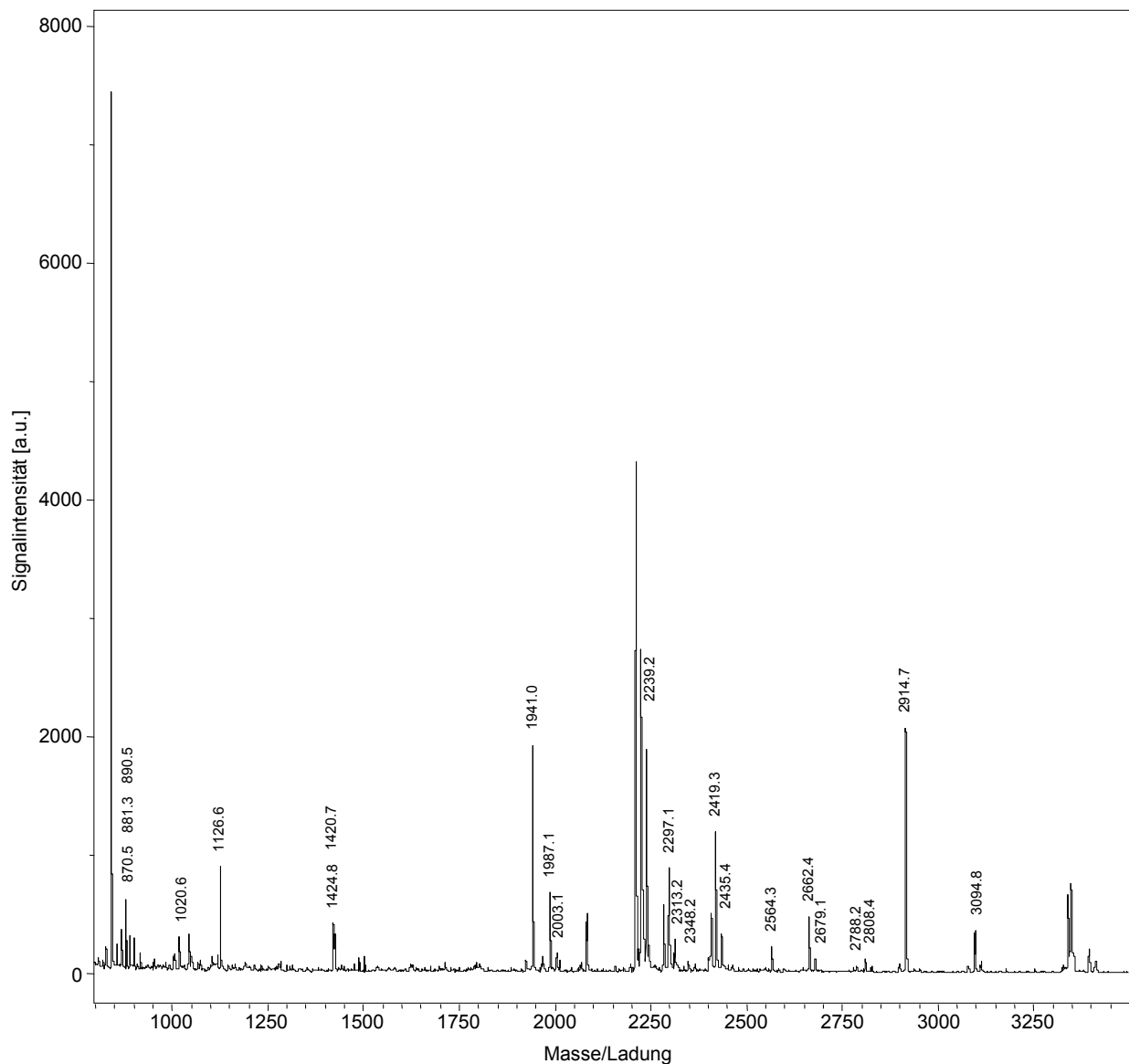


Abb. 2.24: Analyse des 68 kDa-Proteins mittels MALDI-TOF-MS aus HeLa-Extrakt. Spektrum der durch MALDI-TOF-MS-Analyse ermittelten Peptidmassen eines Proteinspots des 68 kDa-Proteins, nach Auftrennung durch eine zweidimensionale Gelelektrophorese (Abb. 2.23). Aufgetragen sind die Signalintensitäten in a.u. (*arbitrary units*, willkürliche Einheiten) gegen den Masse/Ladungs-Quotienten.

In Abbildung 2.25 ist beispielhaft eine Mascot-Datenbankanalyse der experimentell ermittelten Massen für einen der sieben Proteinspots gezeigt. Der „Mowse Score“ dieser Identifizierung lag mit 64,8 über dem für diese Identifizierung berechneten Signifikanz-Grenzwert von 62 ($p < 0,05$). Somit wurde das Ergebnis dieser Proteinidentifizierung als signifikant betrachtet. In diesem Fall konnten 50 % der experimentell ermittelten Peptidmassen dem Protein ATP7A zugeordnet und 16,3 % der Aminosäuresequenz abgedeckt werden (Tab. 2.1).

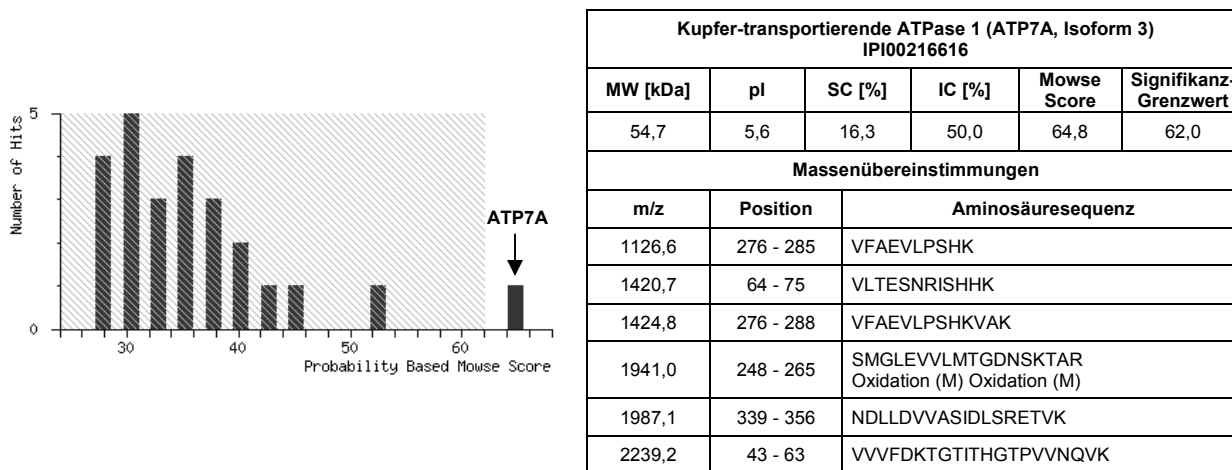


Abb. 2.25/ Tab. 2.1: Proteinidentifizierung mittels Mascot-Datenbankanalyse. Abbildung links: Gezeigt ist die Häufigkeitsverteilung der Datenbankeinträge mit einem bestimmten „Mowse Score“ ($-10 \cdot \log(P)$), wobei P die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Übereinstimmung der Peptidmassen angibt. Die Identifizierung lag mit einem „Mowse Score“ von 64,8 über dem Signifikanz-Grenzwert ($p < 0,05$) von 62 (vergl. Tab. 2.1). Der nicht signifikante Bereich ist grau schraffiert. **Tabelle rechts:** Die mittels Mascot-Datenbankanalyse ermittelten Peptidtreffer mit ihrer zugeordneten Position in der Aminosäuresequenz des Proteins ergaben die Identifizierung der Isoform 3 der Kupfer-transportierenden ATPase 1 mit einer Sequenzabdeckung von 16,3 % (SC). Dem Protein konnten 50 % (IC) der Peptide zugeordnet werden.

Die Kupfer-transportierende ATPase 1 (ATP7A) ist an der Regulation des intrazellulären Kupferhaushaltes beteiligt. ATP7A gehört zu den ATPasen der P-Klasse, die unter ATP-Verbrauch die Translokation von Kationen durch die Lipid-Doppelschicht katalysieren. Das Protein ist hauptsächlich im *trans*-Golgi-Netzwerk lokalisiert, wo es Kupfer-abhängige Proteine innerhalb des sekretorischen Wegs mit Kupfer beliefert. Es konnte beobachtet werden, dass eine Erhöhung der intrazellulären Kupferkonzentration den ATP7A-vermittelten Efflux von Kupfer durch exocytotische Vesikel induziert (Petris und Mercer, 1999). Mutationen des ATP7A-Gens führen zu einer Fehlsteuerung der intrazellulären Kupferverteilung, welche neurologische Symptome und mentale Retardierung zur Folge hat. Dieser X-chromosomal vererbbarer Gendefekt ist auch als Menkes-Syndrom bekannt (Menkes et al., 1962), weshalb ATP7A auch als Menkes-Protein bezeichnet wird.

Das Menkes-Protein wurde in der Literatur bisher noch nicht im Zusammenhang mit HCV beschrieben. Über eine Bedeutung dieses Proteins für den Replikationszyklus des HCV konnte deshalb nur spekuliert werden. In den folgenden Experimenten konnte das Ergebnis dieser Identifizierung nicht noch einmal bestätigt werden und es stellte sich heraus, dass es sich bei der Identifizierung des Menkes-Proteins aufgrund der ungenauen Korrelation der Positionen der Proteinspots des Autoradiogramms und der PVDF-Membran wahrscheinlich um ein falsch positives Ergebnis handelt.

Versuch 2: Auftrennung und Analyse der RNA-Protein-Crosslinks aus Huh7-Extrakt

Da HCV sich vorwiegend in Hepatocyten vermehrt und effizient in Zellen der Hepatomazelllinie Huh7 translatiert, in der die leberspezifische miR-122 detektierbar ist (Lagos-Quintana et al., 2002), sollte das Ergebnis aus der massenspektrometrischen Analyse des 68 kDa-Proteins aus HeLa-Zellextrakt auch in einem cytolasmatischen Extrakt der Hepatomazelllinie Huh7 verifiziert werden.

Die Auftrennung der Proteine eines UV-Crosslink-Experimentes mit radioaktiv markierter HCV-RNA in Huh7-Extrakt erfolgte wieder über eine 2D-Gelelektrophorese. Da der isoelektrische Punkt der analysierten Proteinspots in dem vorangehenden Experiment bei pI 5,6, also im mittleren Bereich des pH-Gradienten lag (Tab. 2.1), wurde die isoelektrische Fokussierung in diesem Experiment mit einem pH-Gradienten von pH 5 bis pH 8 durchgeführt. Durch die Spreizung des pH-Bereiches sollte die Trennung der Proteine noch weiter verbessert werden. Zur Autoradiographie wurden die aufgetrennten Proteine anschließend wieder auf eine PVDF-Membran übertragen.

Das Ergebnis der Autoradiographie zeigt, dass im Bereich von 69 kDa drei untereinander migrierende Ketten radioaktiv markierter Proteinspots detektiert werden konnten (Abb. 2.26). Die Proteinspots wurden unter Zuhilfenahme des Autoradiogramms aus der PVDF-Membran ausgestochen, in drei Ansätzen zusammengefasst und mit Trypsin verdaut. Die anschließende MS-Analyse der Peptidfragmente ergab jedoch kein Ergebnis, es konnten keine Peptidmassen bestimmt werden (Daten sind nicht gezeigt). Über die Ursache dafür kann nur spekuliert werden. Zum Einen könnte die Menge der isolierten Proteine nicht ausreichend genug gewesen sein, um eine zur Bestimmung der Peptidmassen notwendige Signalintensität zu erwirken. Zum Anderen könnten die Schwierigkeiten bei der Detektion von Peptidmassen in der Suppression der molekularen Ionisation begründet sein. Die Unterdrückung der Ionisation von Peptiden durch andere Peptide ist häufig in komplexen Proteingemischen zu beobachten.

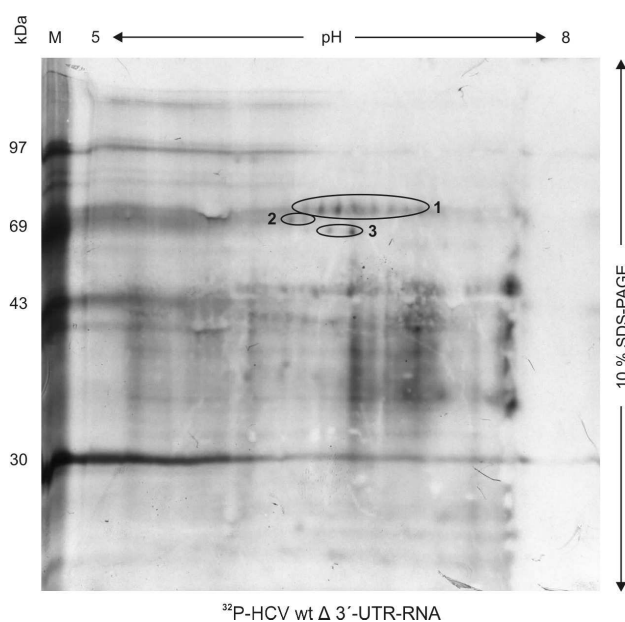


Abb. 2.26: Auftrennung der RNA-Protein-Crosslinks mittels 2D-Gelelektrophorese. Die Autoradiographie (11 Tage, -70°C) zeigt die durch eine 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten und auf eine PVDF-Membran übertragenen radioaktiv markierten Proteine eines UV-Crosslink-Experimentes einer radioaktiv markierten RNA mit authentischer HCV-5'-UTR und einem offenen Leserahmen von 96 Nukleotiden in Huh7-Zellextrakt. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte über einen pH-Gradienten von pH 5 – pH 8 und die Auftrennung der Proteine auf einem 10 % SDS-Gel. Die für die MS-Analyse isolierten und anschließend zusammengefassten Proteinspots sind markiert. M = ¹⁴C-Proteinmarker.

Im Rahmen dieses Versuches wurde ein Teil des UV-Crosslink-Ansatzes auf einem separaten 2D-Gel aufgetrennt (Abb. 2.27 A). Die Lokalisation der radioaktiv markierten Proteinspots des 68 kDa-Proteins auf dem Coomassie-Blau-gefärbten 2D-Gel erfolgte durch ein indirektes Verfahren. Dabei wurden zunächst die Proteinspots der mit Ponceau-Färbung behandelten PVDF-Membran (Abb. 2.27 B), die Grundlage der Autoradiographie war, mit den Coomassie-Blau-gefärbten Proteinspots des 2D-Gels (Abb. 2.27 A) abgeglichen. Anschließend wurden die mit den radioaktiv markierten Proteinspots korrelierenden Bereiche des 2D-Gels anhand des Autoradiogramms (Abb. 2.26) ausgestochen. Die isolierten Proteine der Spotreihen wurden in drei Ansätzen zusammengefasst, mit Trypsin gespalten und die Massen der Peptidfragmente mittels Massenspektrometrie bestimmt.

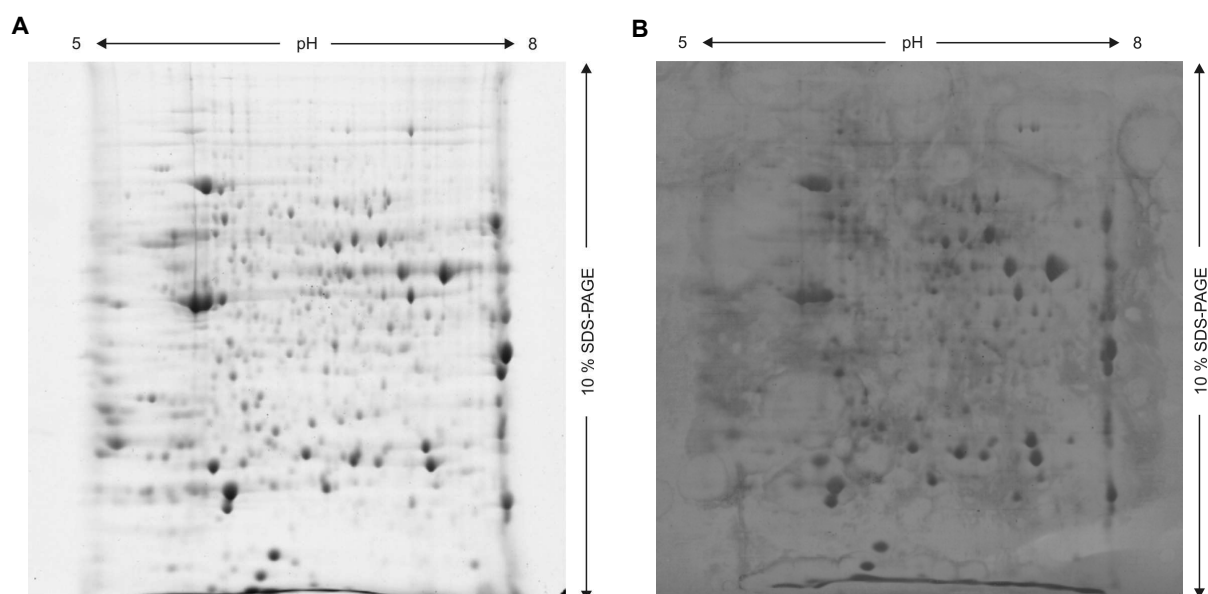


Abb. 2.27: Isolierung der aufgetrennten Proteine eines UV-Crosslink-Experimentes aus einem SDS-Gel. Abgleich der über eine 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinspots eines Coomassie-Blau-gefärbten SDS-Gels (A) mit denen einer Ponceau-gefärbten PVDF-Membran (B) zum Ausschneiden der mit der PVDF-Membran korrelierenden, über Autoradiographie nachgewiesenen radioaktiv markierten Proteinspots eines UV-Crosslink-Experimentes in Huh7-Zellextrakt (Vergleich Abb. 2.26).

Im Hinblick auf die Ionisierbarkeit und damit die Detektion der in jedem der drei Ansätze enthaltenen Peptide war die massenspektrometrische Analyse sehr effizient (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnten in jeder der drei Spotreihen andere Proteine identifiziert werden. Die Ergebnisse der Mascot-Datenbankanalysen sind im Anhang gezeigt.

Mittels der Mascot-Datenbankanalyse konnten die Peptidfragmente des Ansatzes der Spotreihe 1 (Abb. 2.26) einer Proteinmischung aus dem humanen Serumalbumin und dem Heat Shock 70 kDa Protein 8 Isoform 2 zugeordnet werden. Da Albumin ausschließlich in Leberzellen synthetisiert wird, ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich hierbei um das mit der HCV-RNA interagierende Protein von etwa 68 kDa handelt, ist jedoch sehr gering. In Kapitel 2.3.3

konnte durch ein UV-Crosslink-Experiment gezeigt werden, dass bovines Serumalbumin nicht an die HCV-RNA bindet. Da die Albumine der verschiedenen Spezies eine sehr starke Homologie zueinander aufweisen, ist ein ähnliches Ergebnis für das humane Serumalbumin zu erwarten. Weiterhin ist in der Autoradiographie des 2D-Gels zu erkennen, dass die Banden des ^{14}C -Proteinmarkers stark in den Bereich der aufgetrennten Proteine schmieren (Abb. 2.26). Aufgrund dieser Beobachtung kann nicht zweifelsfrei davon ausgegangen werden, dass es sich hier um Albumin des Huh-Zellextraktes des UV-Crosslink-Experimentes handelt und nicht etwa um das Albumin des ^{14}C -Proteinmarkers. In den folgenden Experimenten konnte allerdings die Identifizierung des Heat Shock 70 kDa Protein 8 Isoform 2 mehrfach bestätigt werden.

Die Mascot-Datenbankanalyse der für die zusammengefassten Proteinspots der Reihe 2 (Abb. 2.26) experimentell ermittelten Peptidmassen ergab die Identifizierung der humanen Phosphoglucomutase 3. Dieses Protein, auch bekannt als Phosphoacetylglucosamin-Mutase, ist eines der vier Schlüsselenzyme der Synthese von UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) und katalysiert die Umwandlung von N-Acetylglucosamin-6-Phosphat zu N-Acetylglucosamin-1-Phosphat (Pang et al., 2002). Da die Bedeutung dieses Proteins für den Replikationszyklus des HCV in Leberzellen sehr fraglich ist und es in der Literatur bisher noch nicht im Zusammenhang mit HCV beschrieben wurde, wurde es als unwahrscheinlich betrachtet, dass es sich bei der Phosphoglucomutase 3 um das mit der HCV-RNA interagierende 68 kDa-Protein handelt. Da dieses Proteins in Leberzellen in großem Maße exprimiert wird, wurde es vielmehr als Kontamination interpretiert und daher in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Die Mascot-Datenbankanalyse der experimentell bestimmten Massen der Peptidfragmente der Spotreihe 3 (Abb. 2.26) ergab die Identifizierung einer Proteinmischung aus der Phosphoglucomutase 1 und dem bifunktionalen Purin-Biosynthese Protein PurH. Die Phosphoglucomutase 1 hat eine wichtige Funktion in der Glycolyse und Gluconegonese und katalysiert den Transfer der Phosphatgruppe zwischen den Positionen 1 und 6 der Glucose. Wie auch bei der Phosphoglucomutase 3 ist eine Funktion dieses Enzyms im Replikationszyklus des HCV zweifelhaft und wurde daher nicht in weiteren experimentellen Ansätzen verfolgt.

Durch die Isolierung der radioaktiv markierten Proteine im Bereich von 69 kDa aus einem Coomassie-Blau-gefärbten SDS-Gel durch den Abgleich mit einer Ponceau-gefärbten PVDF-Membran, die zur Detektion der radioaktiv markierten Proteine mittels Autoradiographie diente, konnte also das Ergebnis der vorhergehenden Proteinidentifizierung (Menkes-Protein) aus einem Crosslink-Experiment in HeLa-Zellysate nicht bestätigt werden. Wahrscheinlich ist diese Methode nicht genau genug, um die genaue Position der radioaktiven Spots im Gel bestimmen zu können. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass nicht mit den radioaktiven Proteinspots korrelierende Bereiche aus dem Gel isoliert werden. Anhand der Ergebnisse wird auch deutlich, dass die

Auftrennung eines komplexen Proteingemisches mittels hochauflösender 2D-Gelelektrophorese keine ausreichende Trennung der Proteine zur Identifizierung des durch UV-Induktion an die HCV-RNA fixierten und somit radioaktiv markierten 68 kDa-Proteins erlaubt. Hinter den an die HCV-RNA fixierten Proteinen migrieren im SDS-Gel auch nach der isoelektrischen Fokussierung anscheinend noch viele andere Proteinspezies, wodurch die Identifizierung des mit der HCV-RNA interagierenden 68 kDa-Proteins zusätzlich erschwert wird.

2.5.3 Reinigung des 68 kDa-Proteins durch eine Kombination von Reversed Phase-Chromatographie und gelelektrophoretischer Auftrennung mit anschließender MALDI-TOF-MS-Analyse

Da die Auftrennung der Proteine der für die UV-Crosslink-Experimente verwendeten Zellysate mittels 2D-Gelelektrophorese zur Isolierung des mit der HCV-RNA interagierenden 68 kDa-Proteins nicht ausreichend war, wurde in diesem Teil der Arbeit eine aus Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (*reversed phase high performance liquid chromatography*, rpHPLC) und 2D-Gelelektrophorese kombinierte Reinigungsstrategie verfolgt, um eine bessere Abtrennung des radioaktiv markierten 68 kDa-Proteins von anderen Proteinen zu erreichen.

In einem ersten Schritt sollte das 68 kDa-Protein durch eine fraktionierte Vorreinigung systematisch angereichert und von unerwünschten Proteinspezies mittels rpHPLC effizient abgetrennt werden, um in einem zweiten Schritt eine Feinreinigung verbleibender Proteinkomponenten durch eindimensionale oder zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung anzuschließen. Die Auftrennung der Proteingemische mittels rpHPLC und präparativer Gelelektrophorese sowie die massenspektrometrische Analyse der isolierten Proteine wurden von der Proteinanalytik-Abteilung des Biochemischen Instituts Gießen (Dr. G. Lochnit) durchgeführt.

Analytische rpHPLC zur Optimierung der Gradiententrennung

Bei der rpHPLC findet eine hydrophobe Wechselwirkung der Proteine mit der unpolaren stationären Phase in einer polaren mobilen Phase statt. Die Elution erfolgt dann mit ansteigenden Konzentrationen eines unpolaren, organischen Lösungsmittels (hier: Acetonitril, ACN). Um das Auflösungsvermögen und die Trennkapazität der rpHPLC zu optimieren, sollte bei der Auftrennung des komplexen Proteingemisches eines UV-Crosslink-Ansatzes keine isokratische Trennung, sondern eine Gradiententrennung durchgeführt werden. Um die Separationseffizienz in Abhängigkeit der Zusammensetzung des Eluenten zu untersuchen, wurden zunächst analytische Trennungen von UV-Crosslink-Ansätzen mit der kurzen radioaktiv markierten HCV wt $\Delta 3'$ -UTR-RNA und Huh7-Zellextrakt durchgeführt.

In einem ersten Experiment wurde zur Trennung des Proteingemisches ein linearer Lösungsmittelgradient angewendet, der sich durch einen steilen Anstieg des Acetonitril-Gehaltes auszeichnete (Abb. 2.28). Um die Effizienz der Auftrennung des Proteingemisches zu überprüfen und die Retentionszeit des 68 kDa-Proteins zu bestimmen, wurden die Fraktionen 13 bis 22 mittels eindimensionaler SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert und radioaktiv markierte Proteine anschließend durch Autoradiographie detektiert.

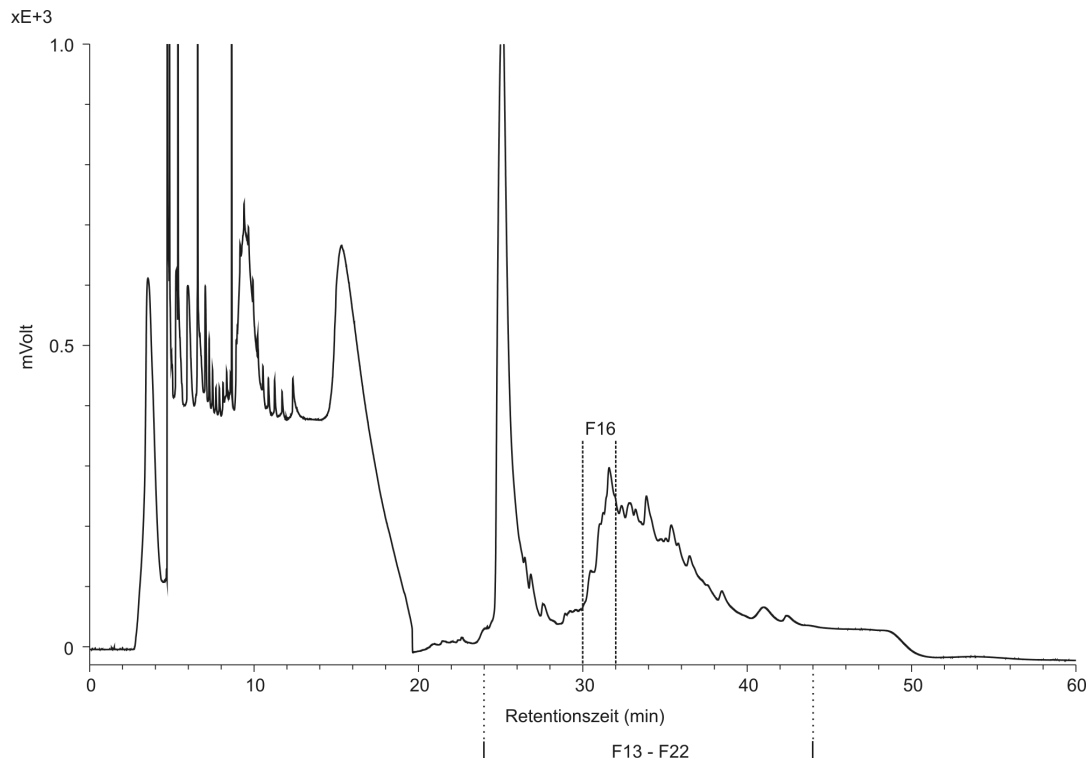


Abb. 2.28: Elutionsprofil der rpHPLC des UV-Crosslink-Ansatzes aus Huh7-Zellextrakt. Die Probe wurde auf eine Acclaim C₁₈-Säule (Porengröße 300 µm, 2,1 mm x 150 mm) aufgetragen und mit einem steilen linearen Lösungsmittelgradienten bestehend aus Solvens A (0,1 % TFA, 5 % ACN) und Solvens B (0,085 % TFA, 80 % ACN) eluiert. Der Gradientenanstieg war wie folgt: 1) 0 – 5 min 5 % Solvens B; 2) 5 – 35 min 95 % Solvens B; 3) 35-40 min 95 % Solvens B; 4) 40 – 60 min 5 % Solvens B. Die Elution erfolgte bei 40 °C mit einer Flussrate von 0,2 ml/min. Eine Fraktion entsprach 0,4 ml. Die UV-Detektion der Proteine erfolgte bei 220 nm. Die zur analytischen SDS-PAGE verwendeten Fraktionen 13 - 22 sind markiert. Das mit der radioaktiv markierten HCV-RNA interagierende Protein von 68 kDa konnte in Fraktion 16 eluiert werden (vergl. Abb. 2.29). TFA, Trifluoressigsäure. ACN, Acetonitril.

Durch den Vergleich mit einem nicht aufgereinigten UV-Crosslink-Ansatz lässt sich im Coomassie-Blau-gefärbten SDS-Gel erkennen, dass die Trennung der Proteinkomponenten erfolgreich war und ein Großteil der Proteine in den Fraktionen 17 bis 19 eluiert werden konnte (Abb. 2.29 A). Das Autoradiogramm des getrockneten SDS-Gels zeigt, dass das an die HCV-RNA kovalent geknüpfte 68 kDa-Protein besonders in Fraktion 16 angereichert wurde (Abb. 2.29 B), was einer Retentionszeit von 30 bis 32 min entsprach.

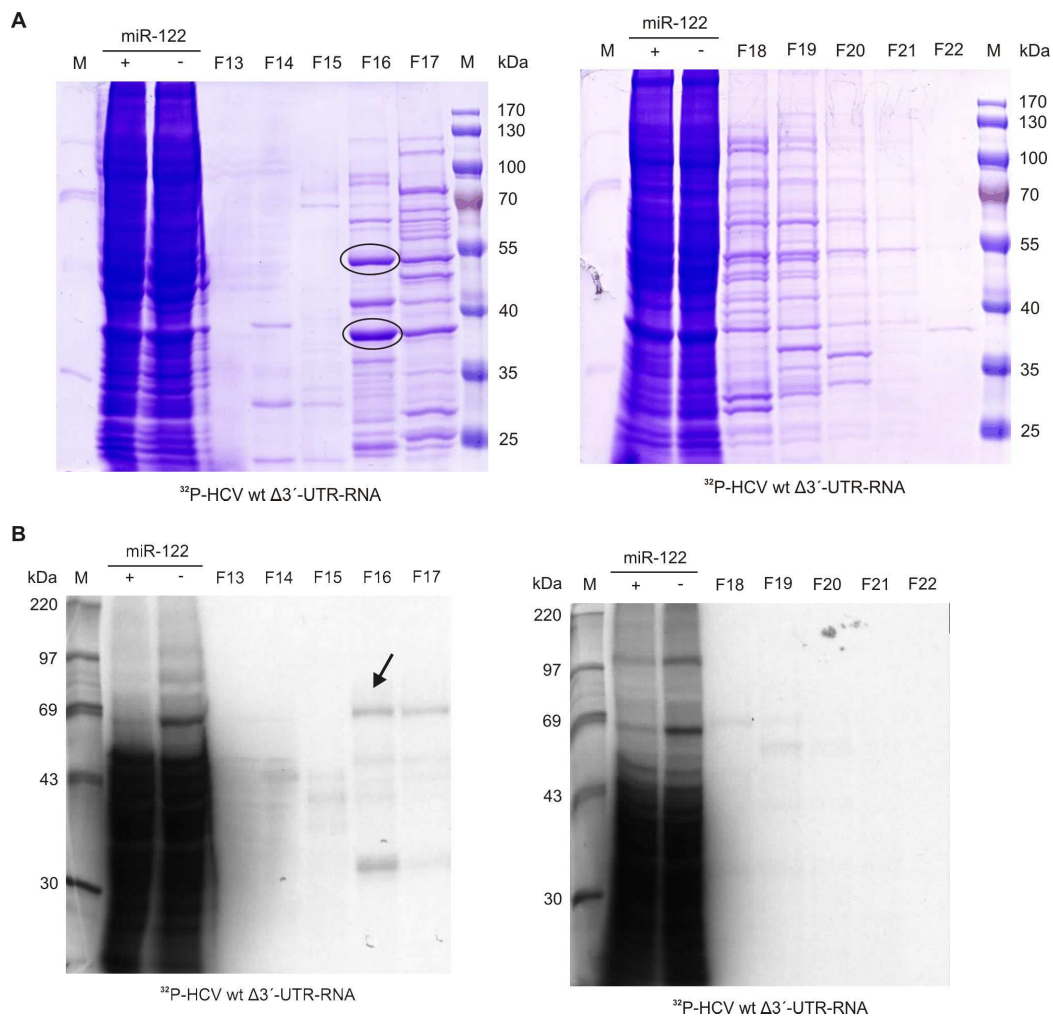


Abb. 2.29: Analyse der durch rpHPLC fraktionierten Reinigung des analytischen UV-Crosslink-Ansatzes aus Huh7-Zellextrakt mittels SDS-PAGE. Coomassie-Blau-Färbung (A) und Autoradiographie (B, 4 Tage, -70°C) der durch ein 10 % SDS-Gel aufgetrennten Proteine der Fraktionen 13 – 22 der rpHPLC aus Abb. 2.28. Die Identifizierung des 68 kDa-Proteins erfolgte über einen UV-Crosslink der kurzen radioaktiv markierten HCV wt $\Delta 3'$ -UTR-RNA in Zellextrakt in Abwesenheit oder Anwesenheit der miR-122 (Spuren 2 und 3). Das 68 kDa-Protein konnte in Fraktion 16 detektiert werden und ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (B). Die mit dem 68 kDa-Protein ko-fraktionierten prominenten Proteine im Bereich von 38 kDa und 53 kDa sind markiert (A). M, Proteinmarker PAGE-Ruler (Fermentas) beziehungsweise ^{14}C -Proteinmarker.

Da in der Fraktion des 68 kDa-Proteins auch andere Proteine im Bereich von 70 kDa eluiert wurden, sollte in einem zweiten Trennungsversuch im analytischen Maßstab dieser Bereich weiter gespreizt und somit das Auflösungsvermögen verbessert werden. Dazu wurde eine lineare Gradiententrennung durchgeführt, bei der der Acetonitril-Gehalt des Eluenten flach anstieg. Das UV-Spektrum der rpHPLC zeigt, dass die im Bereich von 30 min eluierten Proteinkomponenten durch die Anwendung eines flachen Elutionsgradienten weiter voneinander getrennt werden konnten, was durch die gelelektrophoretische Analyse der Fraktionen 28 bis 37 bestätigt werden konnte (Abb. 2.30 und Abb. 2.31 A). Durch die Autoradiographie des getrockneten SDS-Gels konnte das an die radioaktiv markierte HCV-RNA gebundene 68 kDa-Protein in der Fraktion 29 detektiert werden (Abb. 2.31 B), was einer Retentionszeit von 28 min entspricht. Im Vergleich zu der Trennung mit dem steil

ansteigenden Lösungsmittelgradienten wurden in dieser Fraktion deutlich weniger andere Proteine im Bereich von 70 kDa eluiert.

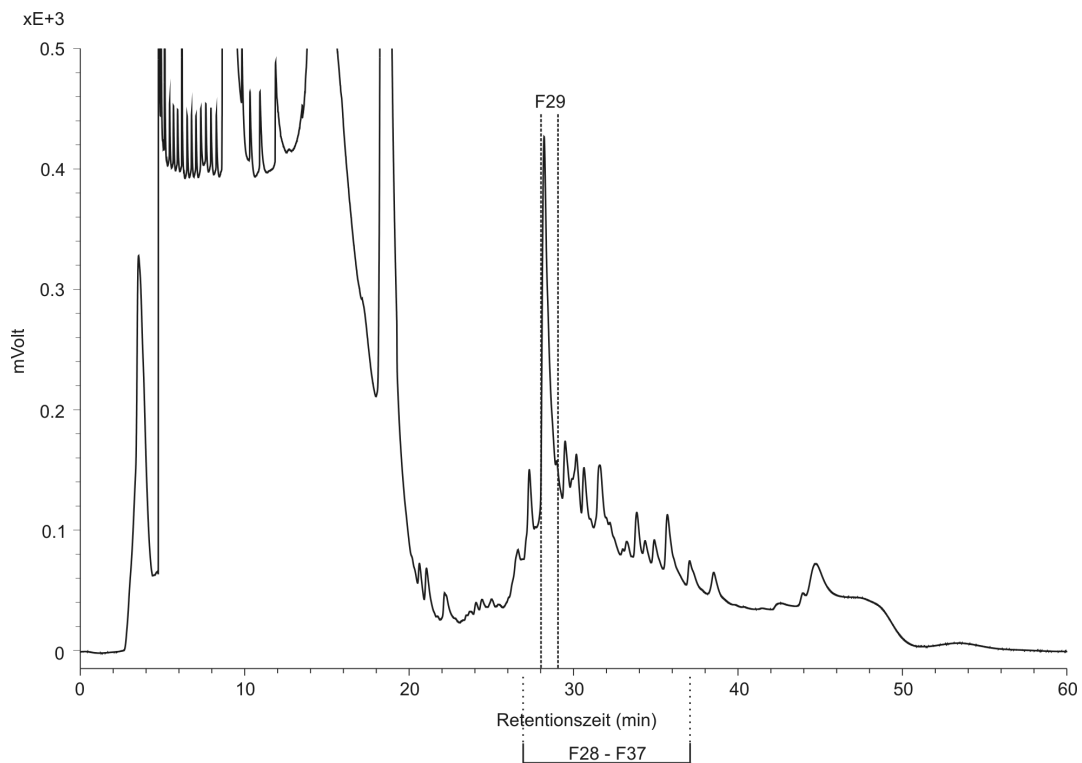


Abb. 2.30: Elutionsprofil der rpHPLC des UV-Crosslink-Ansatzes aus Huh7-Zellextrakt. Die Probe wurde auf eine Acclaim C₁₈-Säule (Porengröße 300 µm, 2,1 mm x 150 mm) aufgetragen und mit einem flachen linearen Lösungsmittelgradienten bestehend aus Solvens A (0,1 % TFA, 5 % ACN) und Solvens B (0,085 % TFA, 80 % ACN) eluiert. Der Gradientenanstieg war wie folgt: 1) 0 – 5 min 5 – 25 % Solvens B; 2) 5 – 35 min 25 - 85 % Solvens B; 3) 35 – 40 min 85 - 95 % Solvens B; 4) 40 – 60 min 5 % Solvens B. Die Elution erfolgte bei 40 °C mit einer Flussrate von 0,2 ml/min. Eine Fraktion entsprach 0,2 ml. Die UV-Detektion der Proteine erfolgte bei 220 nm. Die zur analytischen SDS-PAGE verwendeten Fraktionen 28 - 37 sind markiert. Das mit der radioaktiv markierten HCV-RNA interagierende Protein von 68 kDa konnte in Fraktion 29 eluiert werden (vergl. Abb. 2.31). TFA, Trifluoressigsäure. ACN, Acetonitril.

Auffallend ist, dass in beiden analytischen Aufreinigungen zwei dominante Proteine im Bereich von 38 kDa und 53 kDa mit dem an die HCV-RNA gebundenen 68 kDa-Protein ko-fraktioniert werden konnten, was auf vergleichbare hydrophobe Eigenschaften zurückzuführen ist. Diese beiden Proteine dienten deshalb in der folgenden präparativen Trennung zur Identifizierung der Fraktion des 68 kDa-Proteins, wodurch eine Verzögerung der weiteren Aufreinigung des 68 kDa-Proteins mittels ein- oder zweidimensionaler Gelelektrophorese durch ein ausstehendes Autoradiographie-Ergebnis umgangen werden konnte.

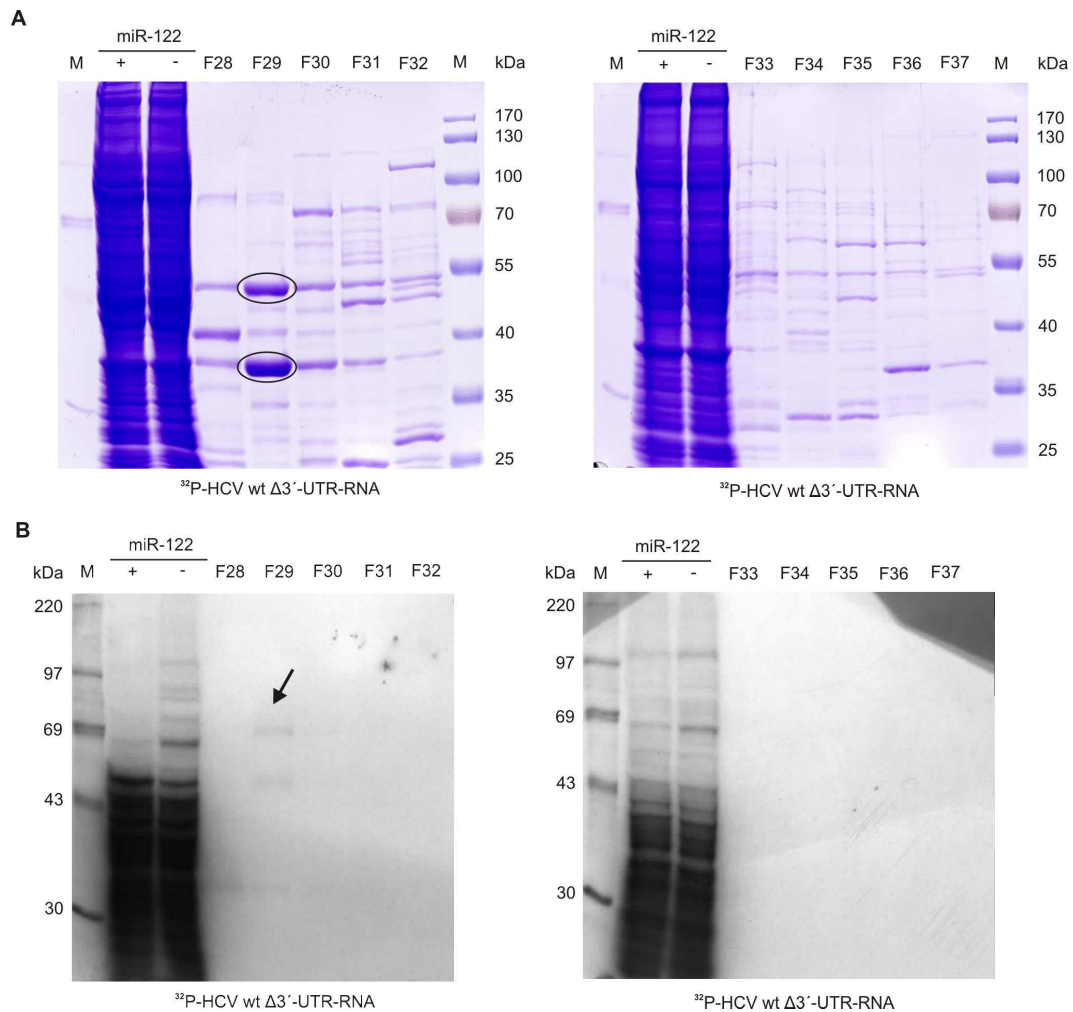


Abb.2.31: Analyse der durch rpHPLC fraktionierten Reinigung des analytischen UV-Crosslink-Ansatzes aus Huh7-Zellextrakt mittels SDS-PAGE. Coomassie-Blau-Färbung (A) und Autoradiographie (B, 4 Tage -70°C) der durch ein 10 % SDS-Gel aufgetrennten Proteine der Fraktionen 28 – 37 der rpHPLC aus Abb. 2.30. Die Identifizierung des 68 kDa-Proteins erfolgte über einen Crosslink der kurzen radioaktiv markierten HCV wt Δ3'-UTR-RNA in Zellextrakt in Abwesenheit oder Anwesenheit der miR-122 (Spuren 2 und 3). Das 68 kDa-Protein konnte in Fraktion 29 detektiert werden und ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (B). Die mit dem 68 kDa-Protein ko-fractionierten prominenten Proteine im Bereich von 38 kDa und 53 kDa sind markiert (A). M, Proteinmarker PAGE-Ruler (Fermentas) beziehungsweise ¹⁴C-Proteinmarker.

Anreicherung des 68 kDa-Proteins mittels präparativer rpHPLC und 2D-Gelelektrophorese zur Identifizierung durch MALDI-TOF-MS

Die Auftrennung der Proteine des präparativen UV-Crosslink-Ansatzes mit radioaktiv markierter HCV wt Δ3'-UTR-RNA in Huh7-Zellextrakt durch die rpHPLC erfolgte in drei Ansätzen mittels eines flachen Acetonitril-Gradienten, um eine gute Auflösung der Proteinpeaks mit Retentionszeiten von 20 bis 40 min zu erhalten. Die UV-Spektren dieser drei Ansätze zeigen, dass die Trennungen reproduzierbar und mit dem Ergebnis der analytischen rpHPLC vergleichbar sind (Abb. 2.32). Auch hier konnte der bereits in der analytischen Auftrennung detektierte hohe Protein-Peak mit einer Retentionszeit von 27 min beziehungsweise 28 min aufgezeichnet werden (vergl. Abb. 2.30). Da für das mit der HCV-RNA interagierende 68 kDa-Protein eine zu dieser unbekanntene Proteinspezies

ähnliche Retentionszeit ermittelt werden konnte, wurden die Proteine von jeweils fünf Fraktionen dieses Bereiches durch Auftrennung auf einem SDS-Gel analysiert.

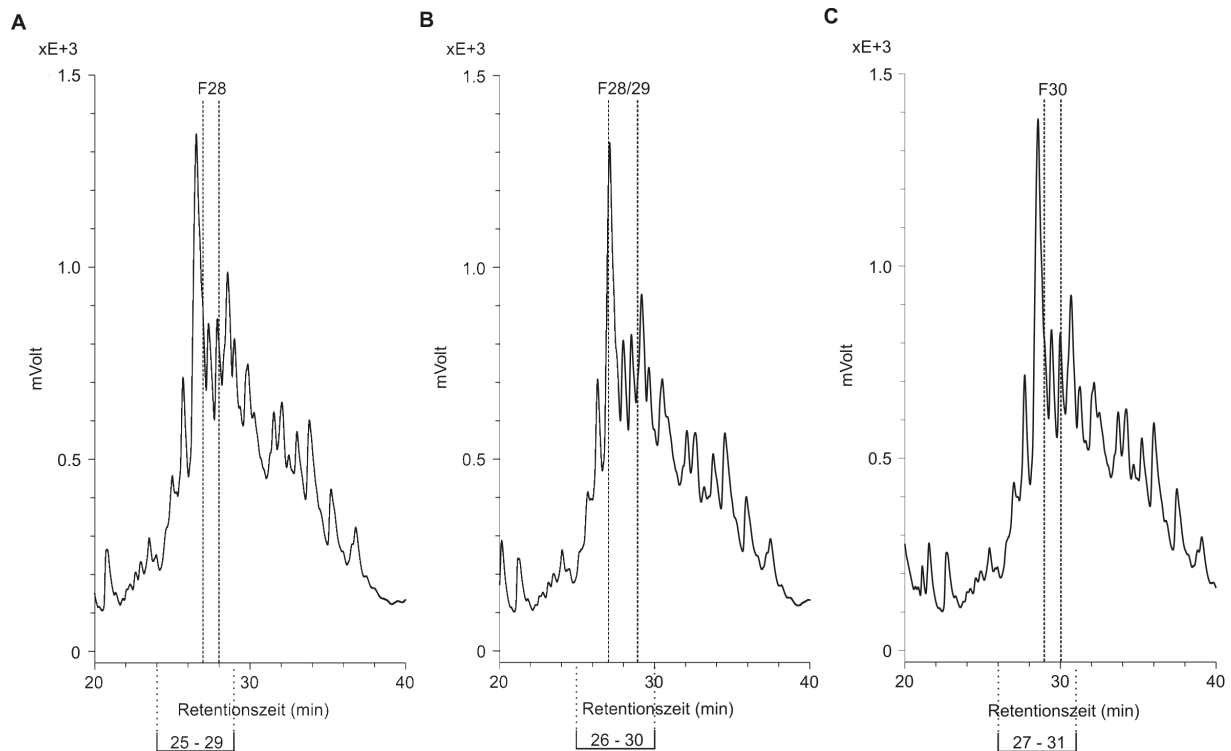


Abb. 2.32: Aufreinigung eines präparativen UV-Crosslink-Ansatzes mittels rpHPLC. Gezeigt sind Ausschnitte der Elutionsprofile der rpHPLC des präparativen UV-Crosslink-Ansatzes. Der Ansatz wurde geteilt und in drei Chromatographieansätzen gereinigt (A, B und C). Die Proben wurden auf eine Acclaim C₁₈-Säule (Porengröße 300 µm, 2,1 mm x 150 mm) aufgetragen und mit einem flachen linearen Lösungsmittelgradienten bestehend aus Solvens A (0,1 % TFA, 5 % ACN) und Solvens B (0,085 % TFA, 80 % ACN) eluiert. Der Gradientenanstieg war wie folgt: 1) 0 – 5 min 5 – 25 % Solvens B; 2) 5 – 35 min 25 – 85 % Solvens B; 3) 35 – 40 min 85 – 95 % Solvens B; 4) 40 – 60 min 5 % Solvens B. Die Elution erfolgte bei 40 °C mit einer Flussrate von 0,2 ml/min. Eine Fraktion entsprach 0,2 ml. Die UV-Detektion der Proteine erfolgte bei 220 nm. Die zur analytischen SDS-PAGE verwendeten Fraktionen sind markiert. Das mit der radioaktiv markierten HCV-RNA interagierende Protein von 68 kDa konnte in den Fraktionen 28 (A), 28 und 29 (B) sowie 30 (C) eluiert werden (vergl. Abb. 2.33). TFA, Trifluoressigsäure. ACN, Acetonitril.

Bei der gelelektrophoretischen Analyse zeigte sich, dass die Auftrennung des Proteingemisches in drei Ansätzen gut reproduzierbar war. In jedem Ansatz konnten die in den analytischen Trennungen bereits registrierten und mit dem 68 kDa-Protein ko-fraktionierten Proteine im Bereich von 38 kDa und 53 kDa detektiert werden (Abb. 2.33 A). Um eine Verzögerung der weiteren Aufreinigung des vorfraktionierten 68 kDa-Proteins und die daraus resultierende Abschwächung der radioaktiven Markierung zu umgehen, wurden die Fraktionen 27 (Ansatz A), 28 (Ansatz B) und 29 (Ansatz C) mit den prominenten Proteinbanden im Bereich von 38 kDa und 53 kDa zur Auftrennung durch die 2D-Gelelektrophorese unabhängig von dem Ergebnis der Autoradiographie verwendet. Das Autoradiogramm zeigt jedoch, dass das 68 kDa-Protein in den Fraktionen 28 (Ansatz A), 28/29 (Ansatz B) und 30 (Ansatz C) verstärkt angereichert werden konnte (Abb. 2.33 B) und somit nicht

nur mit den Proteinen im Bereich von 38 kDa und 53 kDa, sondern auch mit einem weiteren prominenten Protein im Bereich von etwa 60 kDa ko-eluiert wurde (Abb.2.33 A).

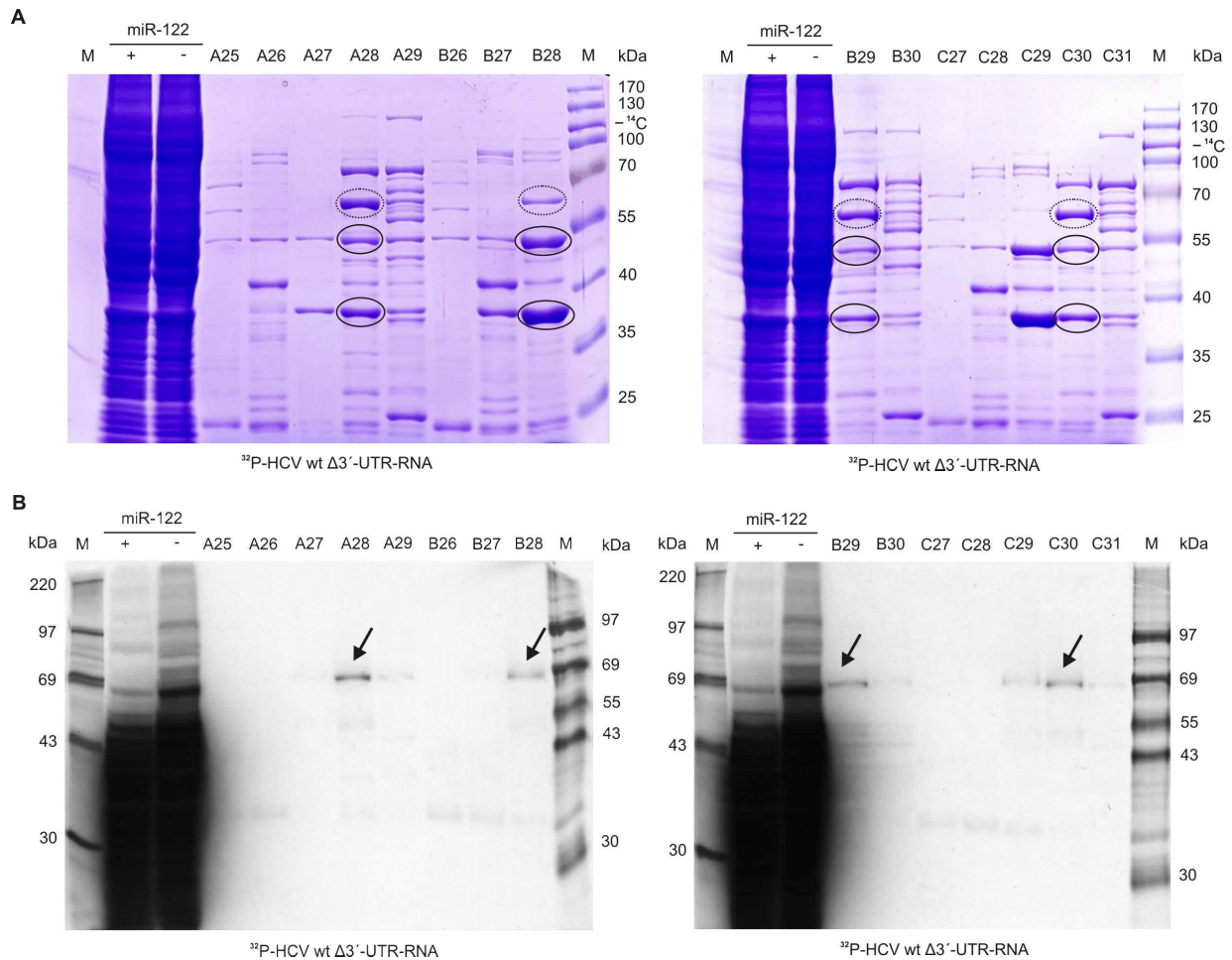


Abb. 2.33: Analyse der durch rpHPLC fraktionierten Reinigung des präparativen UV-Crosslink-Ansatzes aus Huh7-Zellextrakt mittels SDS-PAGE. Coomassie-Blau-Färbung (A) und Autoradiographie (B, 11 Tage -70°C) der durch ein 10 % SDS-Gel aufgetrennten Proteine der Fraktionen 25 – 29 (Ansatz A), 26 – 30 (Ansatz B) und 27 – 31 (Ansatz C) der rpHPLC aus Abb. 2.32. Die Identifizierung des 68 kDa-Proteins erfolgte über einen Crosslink der kurzen radioaktiv markierten HCV wt $\Delta 3'$ -UTR-RNA in Zellextrakt in Abwesenheit oder Anwesenheit der miR-122 (Spuren 2 und 3). Das 68 kDa-Protein konnte in Faktion 28 (Ansatz A), 28/29 (Ansatz B) und 30 (Ansatz C) detektiert werden und ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (B). Die mit dem 68 kDa-Protein ko-fractionierten prominenten Proteine im Bereich von etwa 38 kDa, 53 kDa und 60 kDa sind markiert (A). M, Proteinmarker PAGE-Ruler (Fermentas) beziehungsweise ^{14}C -Proteinmarker.

Durch die Autoradiographie der über eine 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten und anschließend auf eine PVDF-Membran transferierten Proteine der ausgewählten Fraktionen des vorgereinigten UV-Crosslink-Ansatzes konnte eine Kette aus sechs radioaktiv markierten Proteinspots detektiert werden, die im SDS-Gel im Bereich von 69 kDa migrierten und somit mit einer durch die Voreinigung bedingten hohen Wahrscheinlichkeit als das an die HCV-RNA kovalent gebundene 68 kDa-Protein determiniert wurden (Abb. 2.34).

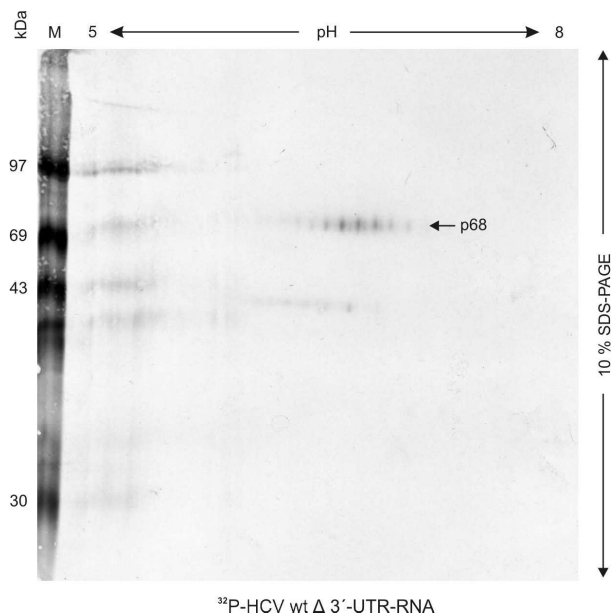


Abb. 2.34: Auftrennung der vorgereinigten RNA-Protein-Crosslinks mittels 2D-Gelelektrophorese. Die Autoradiographie (11 Tage, -70 C) zeigt die durch eine 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten und auf eine PVDF-Membran übertragenen radioaktiv markierten Proteine der durch die SDS-PAGE aus Abb. 2.33 A identifizierten Fraktionen 27, 28 und 29 (Ansatz A-C). Zuvor wurde der UV-Crosslink-Ansatz einer radioaktiv markierten RNA mit authentischer HCV-5'-UTR und einem offenen Leserahmen von 96 Nukleotiden in Huh7-Zellextrakt, mittels einer präparativen rpHPLC gereinigt. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte über einen pH-Gradienten von pH 5 – pH 8 und die Auftrennung der Proteine auf einem 10 % SDS-Gel. Der Pfeil kennzeichnet die für die MS-Analyse isolierten Proteinspots. M = ^{14}C -Proteinmarker.

Bei der massenspektrometrischen Analyse der aus der Membran isolierten und mit Trypsin verdauten Proteine konnten einige Massen experimentell ermittelt werden, die in der Mascot-Datenbankanalyse dem Protein Keratin zugeordnet werden konnten (Daten sind nicht gezeigt). Da Keratin eine häufig auftretende Kontamination bei der Analyse von Proteinen ist, wurde dieses Ergebnis als eben solche betrachtet und als nicht relevant eingestuft.

Anreicherung des 68 kDa-Proteins mittels präparativer rpHPLC und Isolierung über präparative 1D-Gelelektrophorese zur Identifizierung durch MALDI-TOF-MS

Die vorangehenden Untersuchungen sprechen dafür, dass die spezifische Anreicherung des 68 kDa-Proteins aus einem UV-Crosslink-Ansatz mittels präparativer rpHPLC effizient und gut reproduzierbar ist und dass die falsch positiven Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse wahrscheinlich in der zweidimensionalen Auftrennung verbleibender Proteinkomponenten begründet sind. Durch die Notwendigkeit des Proteintransfers auf eine PVDF-Membran wird die Kontaminationsgefahr erhöht und die für die MS-Analyse verwendbare Proteinmenge reduziert. Durch die indirekte Identifizierung der Proteinspots über die radioaktive Markierung wird die Wahrscheinlichkeit eines falsch positiven Ergebnisses zusätzlich erhöht. Um diese Probleme zu umgehen, wurde ein experimenteller Ansatz konzipiert, in dem die Vorreinigung der Proteine eines präparativen UV-Crosslink-Ansatzes über eine rpHPLC mit der weiteren Auftrennung über eine präparative eindimensionale Gelelektrophorese kombiniert werden sollte. Anhand der Coomassie-Blau-gefärbten Proteinbanden sollten dann im Bereich des 68 kDa-Proteins möglichst schmale Gelstücke ausgeschnitten, die isolierten Proteine im Gel verdaut und die Radioaktivität nachgewiesen werden. Der Ansatz mit dem stärksten radioaktiven Signal sollte das gesuchte 68 kDa-Protein enthalten, welches dann mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert werden kann.

Die fraktionierte Vorreinigung der Proteine des UV-Crosslink-Ansatzes mit der kurzen radioaktiv markierten HCV wt $\Delta 3'$ -UTR-RNA in Huh7-Zellextrakt durch die rpHPLC erfolgte in drei Ansätzen mittels eines flachen Acetonitril-Gradienten (Abb. 2.35).

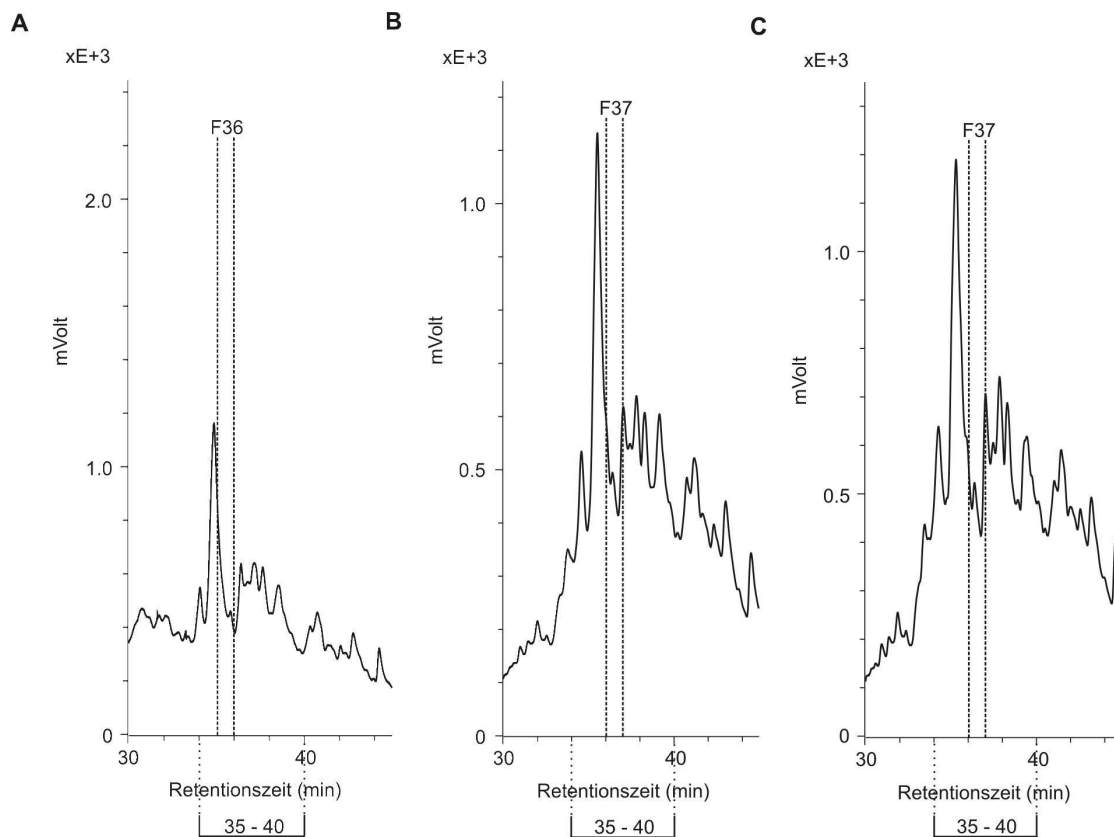


Abb. 2.35: Aufreinigung eines präparativen UV-Crosslink-Ansatzes mittels rpHPLC. Gezeigt sind Ausschnitte der Elutionsprofile der rpHPLC des präparativen UV-Crosslink-Ansatzes. Der Ansatz wurde geteilt und in drei Chromatographieansätzen gereinigt (A, B und C). Die Proben wurden auf eine Acclaim C_{18} -Säule (Porengröße 300 μm , 2,1 mm x 150 mm) aufgetragen und mit einem flachen linearen Lösungsmittelgradienten bestehend aus Solvens A (0,1 % TFA, 5 % ACN) und Solvens B (0,085 % TFA, 80 % ACN) eluiert. Der Gradientenanstieg war wie folgt: 1) 0 – 5 min 5 – 25 % Solvens B; 2) 5 – 35 min 25 – 85 % Solvens B; 3) 35 – 40 min 85 – 95 % Solvens B; 4) 40 – 60 min 5 % Solvens B. Die Elution erfolgte bei 40 °C mit einer Flussrate von 0,2 ml/min. Eine Fraktion entsprach 0,2 ml. Die UV-Detektion der Proteine erfolgte bei 220 nm. Die zur analytischen SDS-PAGE verwendeten Fraktionen sind markiert. Das mit der radioaktiv markierten HCV-RNA interagierende Protein von 68 kDa konnte in den Fraktionen 36 (A) und 37 (B und C) eluiert werden (vergl. Abb. 2.36). TFA, Trifluoressigsäure. ACN, Acetonitril.

Das Muster der UV-Spektren ist mit den vorangehenden Experimenten vergleichbar. Es konnte jedoch im Vergleich zu den vorherigen Chromatographien eine verzögerte Elution der Proteine beobachtet werden, was zu der Verschiebung der Retentionszeiten führte. Der zuvor detektierte Protein-Peak mit einer Retentionszeit von 27 min beziehungsweise 28 min wurde hier erst nach 35 min aufgezeichnet. Durch die Analyse der Fraktionen dieses Bereiches durch Auftrennung der Proteine über SDS-Gele konnten die mit dem 68 kDa-Protein ko-eluierenden Proteine von etwa 60 kDa und 53 kDa in den Fraktionen 36 (Ansatz A) und 37 (Ansatz B und C) detektiert werden (Abb. 2.36 A). Weiterhin ist in diesen Fraktionen ein Protein zu erkennen, das oberhalb der

Markerbande von 70 kDa migriert. Durch den Vergleich des Proteinmusters dieser Fraktionen mit den vorherigen analytischen Gelen wurden diese als die Fraktionen des 68 kDa-Proteins identifiziert und für die Auftrennung durch präparative SDS-PAGE verwendet. Das Autoradiogramm der analytischen Gele bestätigt dieses Vorgehen, denn der größte Anteil des radioaktiv markierten 68 kDa-Proteins konnte in den Fraktionen 36 (Ansatz A) und 37 (Ansatz B und C) detektiert werden (Abb. 2.36 B).

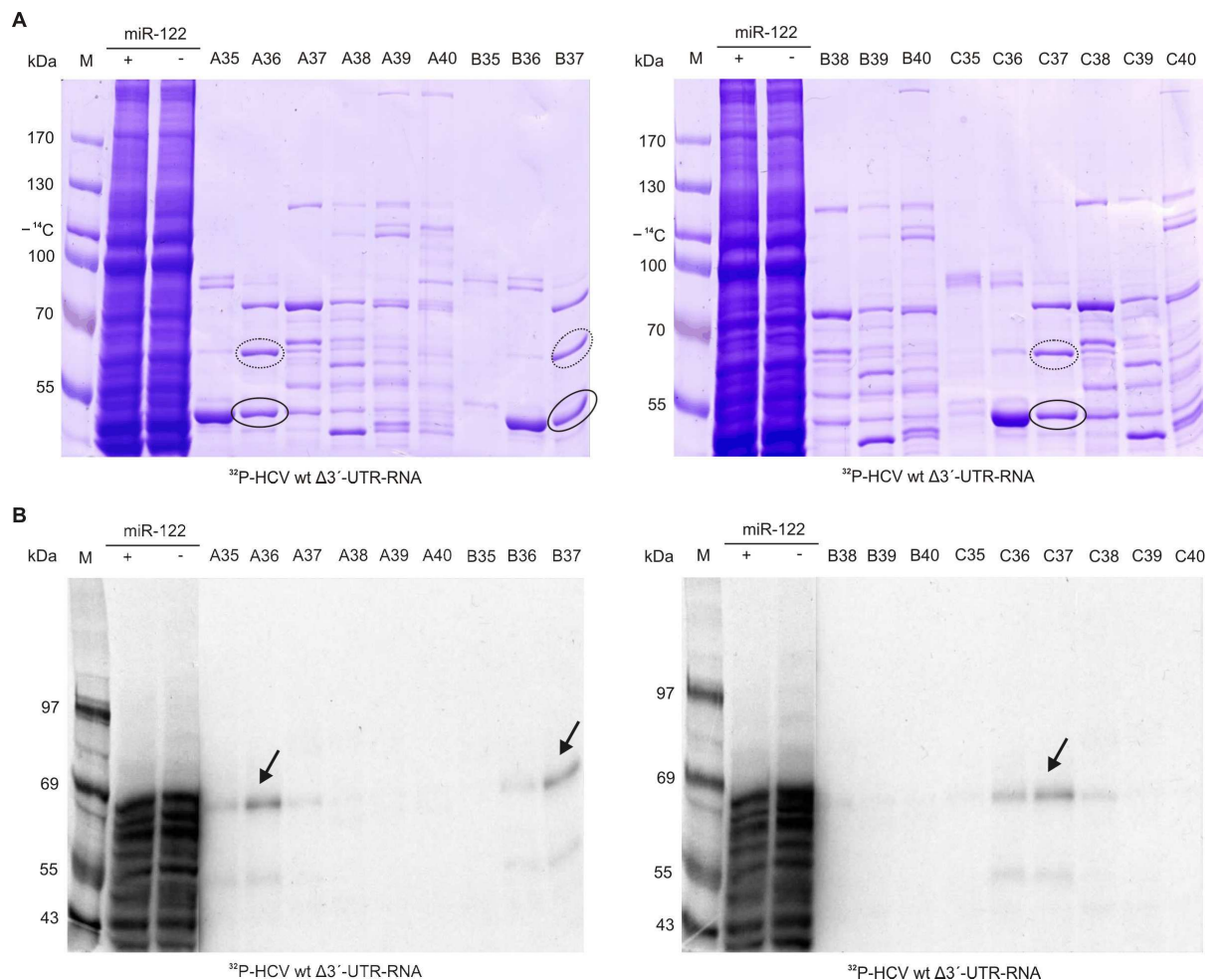
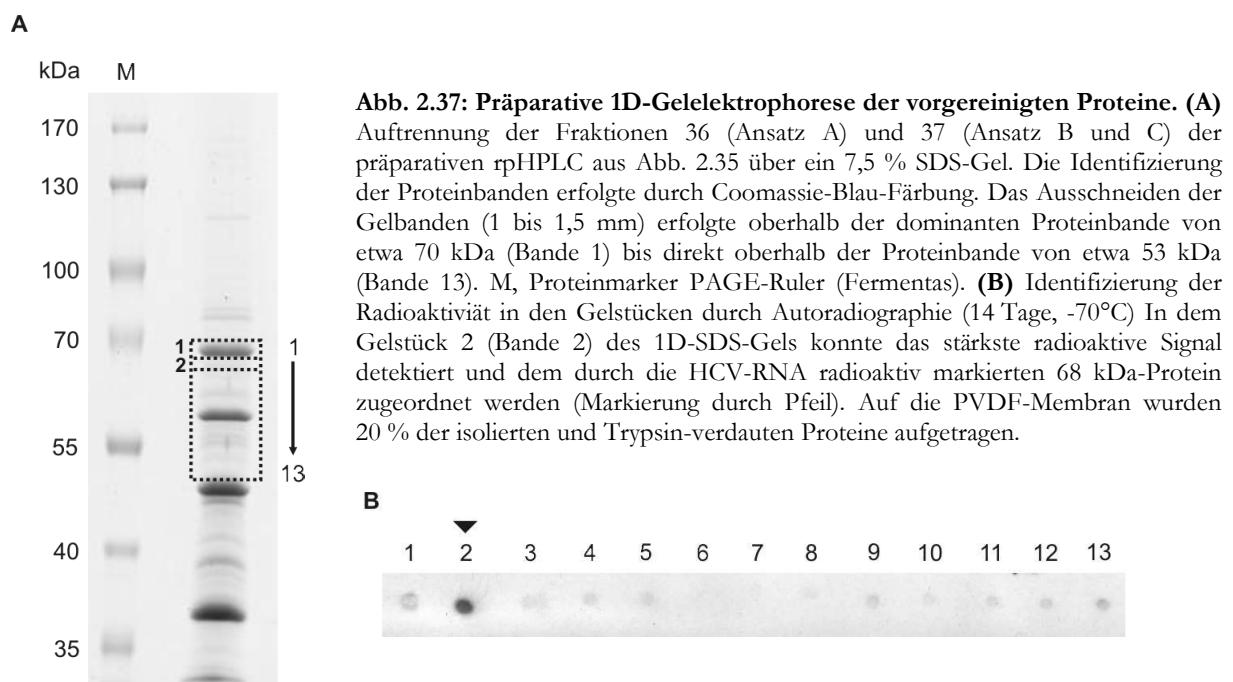


Abb. 2.36: Analyse der durch rpHPLC fraktionierten Reinigung des präparativen UV-Crosslink-Ansatzes aus Huh7-Zellextrakt mittels SDS-PAGE. Coomassie-Blau-Färbung (A) und Autoradiographie (B, Spur 1-3 1 Tag Raumtemperatur; Spur 4-12 4 Tage -70°C) der durch ein 7,5 % SDS-Gel aufgetrennten Proteine der Fraktionen 35 – 40 (Ansatz A, B und C) der rpHPLC aus Abb. 2.35. Die Identifizierung des 68 kDa-Proteins erfolgte über einen Crosslink der kurzen radioaktiv markierten HCV wt Δ3'-UTR-RNA in Zellextrakt in Abwesenheit oder Anwesenheit der miR-122 (Spuren 2 und 3). Das 68 kDa-Protein konnte in Faktion 36 (Ansatz A), 37 (Ansatz B) und 37 (Ansatz C) detektiert werden und ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (B). Die mit dem 68 kDa-Protein ko-fraktionierten prominenten Proteine von etwa 53 kDa und 60 kDa sind markiert (A). M, Proteinmarker PAGE-Ruler (Fermentas) beziehungsweise ¹⁴C-Proteinmarker.

Nach der eindimensionalen gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine aus diesen Fraktionen wurden aus dem Bereich zwischen den dominanten Proteinbanden von etwa 70 kDa (Bande 1) und 53 kDa (Bande 13) dreizehn schmale Gelstücke ausgeschnitten und die isolierten Proteine im Gel mit Trypsin verdaut (Abb. 2.37 A). Zur Detektion des radioaktiv markierten 68 kDa-Proteins wurden jeweils 20 % des Trypsin-Verdaus auf eine PVDF-Membran übertragen und gegen einen Röntgenfilm exponiert. Das Autoradiogramm zeigt, dass in Bande 2 der größte Anteil der Radioaktivität detektiert werden konnte (Abb. 2.37 B). Auch in Bande 1 war im Vergleich zu allen anderen Banden mehr radioaktiv markiertes Protein enthalten. Da auf den analytischen Gelen oberhalb des radioaktiv markierten 68 kDa-Proteins kein weiteres radioaktiv markiertes Protein nachgewiesen werden konnte, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass es sich in Bande 2 um das Signal des gesuchten 68 kDa-Proteins handelt. Die geringen radioaktiven Signale in den Banden 9 bis 13 sind auf das an die radioaktiv markierte HCV-RNA bindende und mit dem 68 kDa-Protein ko-fractionierte Protein im Bereich von 55 kDa zurückzuführen.



Die isolierten und durch den Verdau mit Trypsin erhaltenen Peptidfragmente wurden mittels der MALDI-TOF-MS analysiert. Der Fokus der Analyse wurde auf die in Bande 1 und 2 enthaltenen Peptidfragmente gelegt, da hier die stärksten radioaktiven Signale detektiert werden konnten. Die Spektren der massenspektrometrischen Analyse der Peptidfragmente dieser Banden zeigen, dass die Ionisierbarkeit und damit die Detektion von Peptidmassen im Bereich von 800-3000 Da effizient war, was dafür spricht, dass eine ausreichende Proteinmenge vorhanden war (Abb. 2.38 und 2.40).

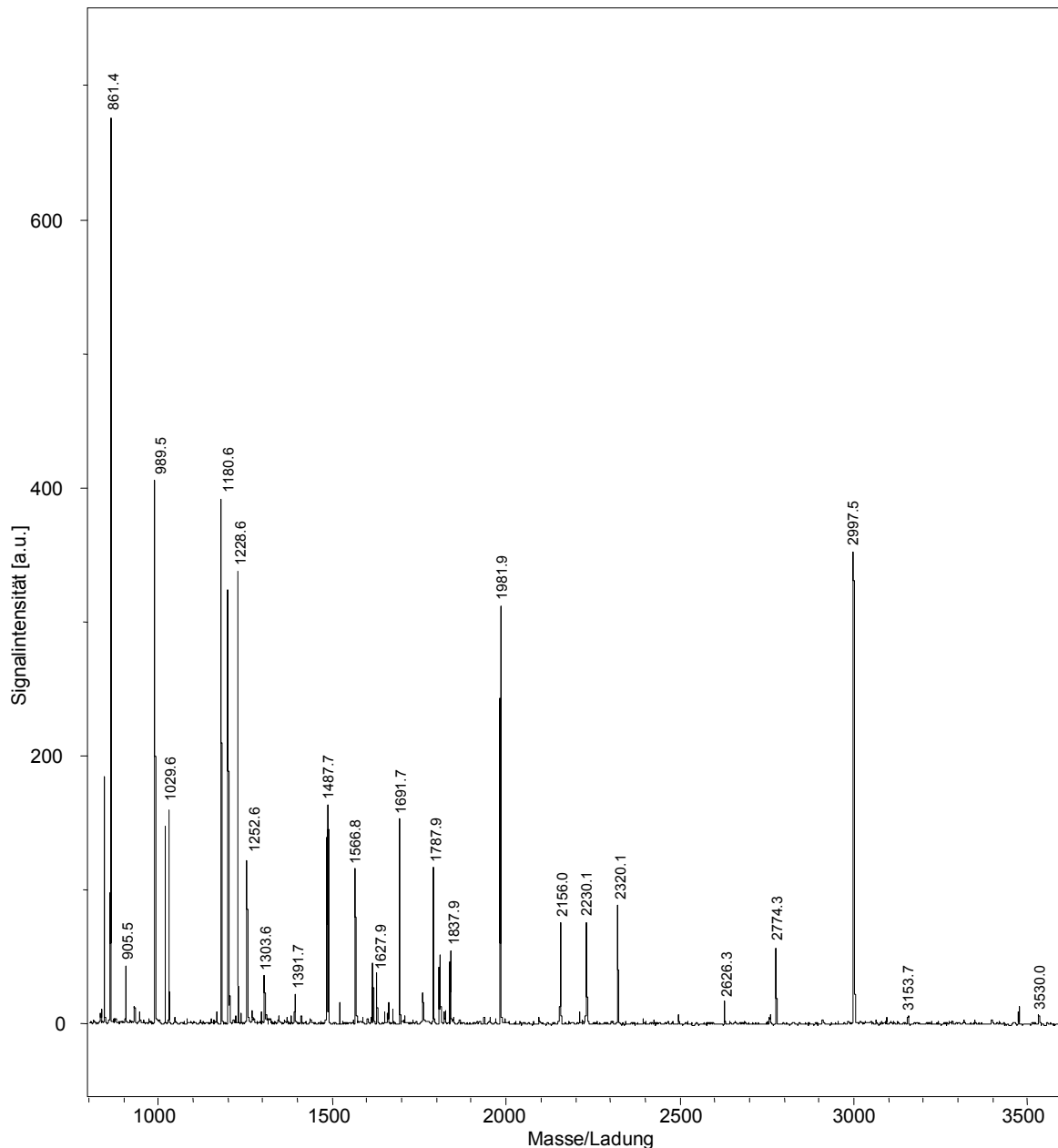


Abb. 2.38: Analyse des Proteins der Bande 1 aus dem präparativen 1D-SDS-Gel mittels MALDI-TOF-MS. Spektrum der durch MALDI-TOF-MS-Analyse ermittelten Peptidmassen des in Bande 1 isolierten Proteins, aufgetrennt durch eindimensionale Gelelektrophorese (Abb. 2.37 A). Aufgetragen sind die Signalintensitäten in a.u. (*arbitrary units*, willkürliche Einheiten) gegen den Masse/Ladungs-Quotienten.

Die Mascot-Datenbankanalyse der in Bande 1 ermittelten Peptidmassen ergab die Identifizierung der Isoform 1 des humanen Heat Shock Cognate 71 kDa Proteins (Hsc70), dessen alternativer Name auch Heat Shock 70 kDa Protein 8 ist. Dem Protein konnten 90,4 % (IC) der ermittelten Peptidmassen mit einer Sequenzabdeckung von 47,8 % (SC) zugeordnet werden (Abb. 2.39, Tab. 2.2). Da der für diese Identifizierung berechnete „Mowse Score“ von 326 weit über dem Signifikanz-Grenzwert von 64 ($p < 0,05$) lag, ist die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übereinstimmung der Peptidmassen sehr gering.

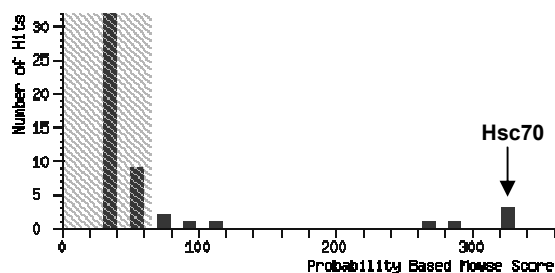


Abb. 2.39/Tab. 2.2: Identifizierung des Proteins der Bande 1 der präparativen 1D-SDS-PAGE mittels Mascot-Datenbankanalyse. Abbildung links: Gezeigt ist die Häufigkeitsverteilung der Datenbankeinträge mit einem bestimmten „Mowse Score“ ($-10 \cdot \log(P)$), wobei P die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Übereinstimmung der Peptidmassen angibt. Die Identifizierung lag mit einem „Mowse Score“ von 326 über dem Signifikanz-Grenzwert ($p < 0,05$) von 64 (vergl. Tab. 2.2) Der nicht signifikante Bereich ist grau schraffiert. **Tabelle unten:** Die mittels Mascot-Datenbankanalyse ermittelten Peptidtreffer mit ihrer zugeordneten Position in der Aminosäuresequenz des Proteins ergaben die Identifizierung des humanen Heat Shock Cognate 71 kDa Proteins Isoform 1 mit einer Sequenzabdeckung von 47,8 % (SC). Dem Protein konnten 79,3 % (IC) der Peptide zugeordnet werden.

Heat Shock Cognate 71 kDa Protein Isoform 1 (human) A27077					
MW [kDa]	pI	SC [%]	IC [%]	Mowse Score	Signifikanz-Grenzwert
71,1	5,2	47,8	90,4	326	64
Massenübereinstimmungen					
m/z	Position	Aminosäuresequenz	m/z	Position	Aminosäuresequenz
858,4	312 - 319	GTLDPVEK	1519,8	237 - 248	MVNHFAIEFKRK
861,4	252 - 258	DISENKR	1616,7	113 - 126	SFYPEEVSSMVLTK
905,5	263 - 269	LRTACER Carbamidomethyl (C)	1627,9	156 - 171	QATKDAGTIAGLNVLRL
989,5	562 - 569	INDEDKQK	1659,9	172 - 187	IINEPTAAAIAYGLDK
1017,5	501 - 509	ITITNDKGR	1691,7	221 - 236	STAGDTHLGGEDFDNR
1029,6	320 - 328	ALRDAKLDK	1787,9	172 - 188	IINEPTAAAIAYGLDKK
1180,6	103 - 112	VQVEYKGETK	1805,8	57 - 72	NQVAMNPTNTVFDKAKR
1199,6	160 - 171	DAGTIAGLNVLRL	1837,9	326 - 342	LDKSQIHDIVLVGGSTR
1204,6	448 - 458	AMTKDNNLLGK	1981,9	138 - 155	TVTNAVVTVPAYFNDSQR
1228,6	26 - 36	VEIIANDQGMR	2152,1	323 - 342	DAKLDKSQIHDIVLVGGSTR
1252,6	127 - 137	MKEIAEAYLGK	2156,0	37 - 56	TTPSYVAFTDTERLIGDAAK
1303,6	540 - 550	NSLESYAFNMK	2320,1	300 - 319	ARFEELNADLFRGTLDPVEK
1391,7	237 - 247	MVNHFAIEFKR	2774,3	424 - 447	QTQFTTYSNQPGLIQVYEGER
1480,7	300 - 311	ARFEELNADLFR	2997,5	273 - 299	TLSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITR
1481,8	329 - 342	SQIHDIVLVGGSTR	3153,7	272 - 299	RTLSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITR
1487,7	37 - 49	TTPSYVAFTDTER			

Durch die Mascot-Datenbankanalyse konnten 79,3 % (IC) der ermittelten Peptidmassen der Bande 2 mit einer Sequenzabdeckung von 33,1 % (SC) einer Variante des humanen Heat Shock 70 kDa Proteins 8 Isoform 2 zugeordnet werden (Abb. 2.41, Tab. 2.3). Der „Mowse Score“ der Identifizierung lag mit 157 über dem berechneten Signifikanz-Grenzwert von 64. Interessanterweise konnte dieses Protein schon in Kapitel 2.5.2 aus einem Crosslink-Ansatz mit radioaktiv markierter HCV-RNA in Huh7-Lysat, allerdings in einer Proteinmischung mit humanem Serumalbumin identifiziert werden.

Dass in beiden Banden ein sehr großer Teil der bei der Massenspektrometrie detektierten Signale den identifizierten Proteinen zugeordnet werden konnte, zeigt, dass es sich bei den Peptidfragmenten in den Banden nicht um Proteinmischungen handelte. Die massenspektrometrische Analyse der Peptidfragmente der Banden 3 und 4 ergab keine Ergebnisse und somit auch keine Proteinidentifizierungen, was darauf schließen lässt, dass die Proteinmengen in diesen Banden zu gering waren. Zusammengefasst verringern diese Resultate die Wahrscheinlichkeit einer falsch positiven Proteinidentifizierung in den Banden 1 und 2 und bestätigen zudem die Wahl der Reinigungsstrategie des UV-Crosslink-Ansatzes.

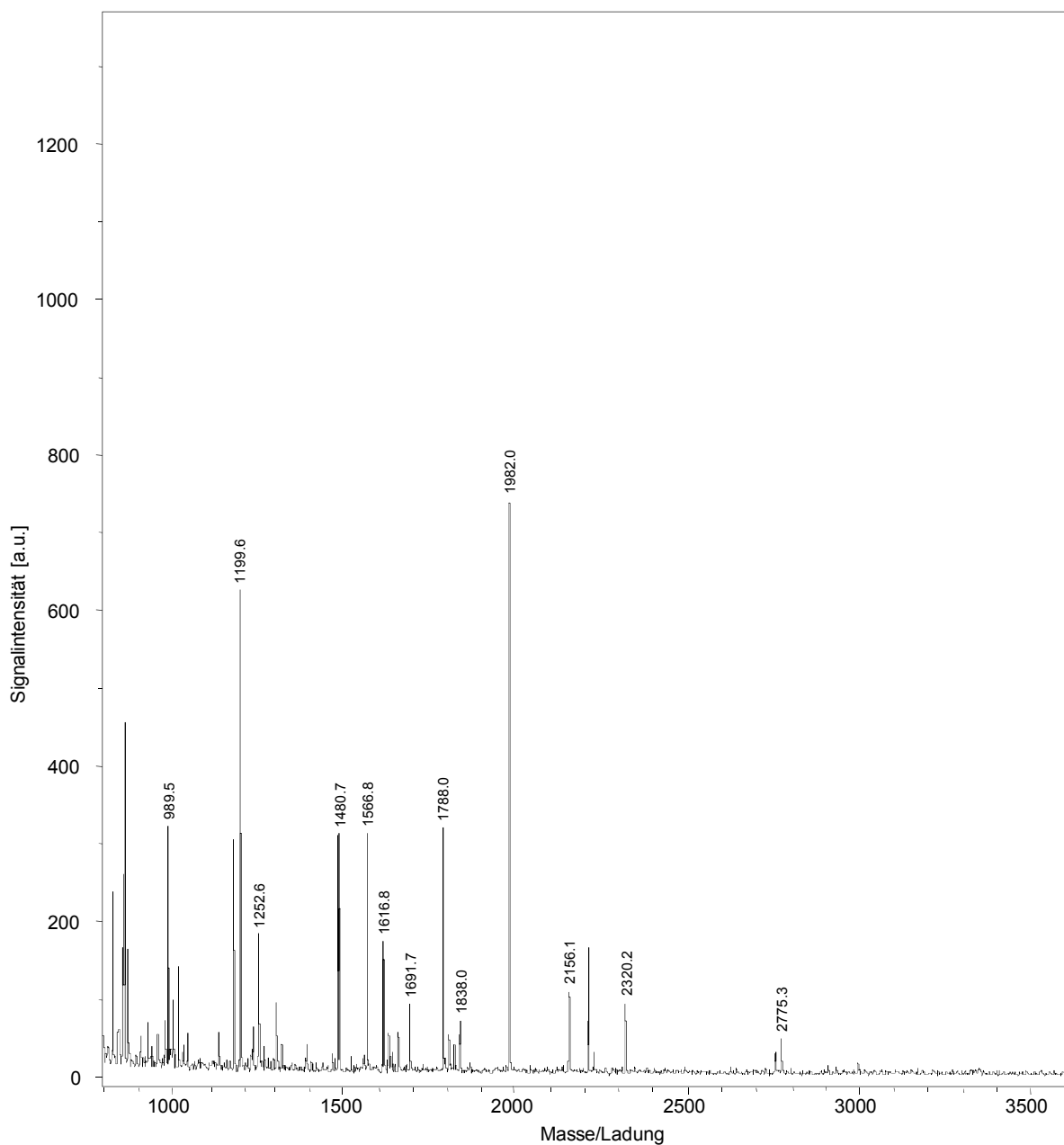


Abb. 2.40: Analyse des Proteins der Bande 2 aus dem präparativen 1D-SDS-Gel mittels MALDI-TOF-MS. Spektrum der durch MALDI-TOF-MS-Analyse ermittelten Peptidmassen des in Bande 2 isolierten Proteins, aufgetrennt durch eindimensionale Gelelektrophorese (Abb. 2.37 A). Aufgetragen sind die Signalintensitäten in a.u. (*arbitrary units*, willkürliche Einheiten) gegen den Masse/Ladungs-Quotienten.

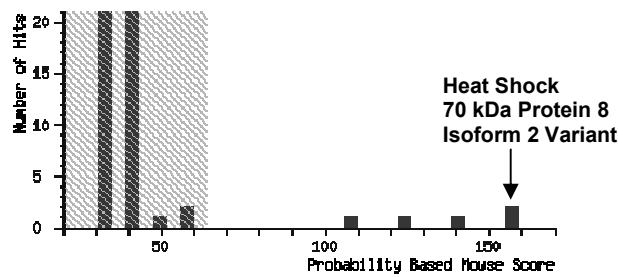


Abb. 2.41/ Tab. 2.3: Identifizierung des Proteins der Bande 2 der präparativen 1D-SDS-PAGE mittels Mascot-Datenbankanalyse. Abbildung oben: Gezeigt ist die Häufigkeitsverteilung der Datenbankeinträge mit einem bestimmten „Mowse Score“ ($-10 \cdot \log(P)$), wobei P die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Übereinstimmung der Peptidmassen angibt. Die Identifizierung lag mit einem „Mowse Score“ von 157 über dem Signifikanz-Grenzwert ($p < 0,05$) von 64 (vergl. Tab. 2.3). Der nicht signifikante Bereich ist grau schraffiert. **Tabelle rechts:** Die mittels Mascot-Datenbankanalyse ermittelten Peptidtreffer mit ihrer zugeordneten Position in der Aminosäuresequenz des Proteins ergaben die Identifizierung des humanen Heat Shock 70 kDa Proteins 8 Isoform 2 mit einer Sequenzabdeckung von 33,1 % (SC). Dem Protein konnten 79,3 % (IC) der Peptide zugeordnet werden.

Heat Shock 70 kDa Protein 8 Isoform 2 Variant (human) Q53HF2					
MW [kDa]	pI	SC [%]	IC [%]	Mowse Score	Signifikanz-Grenzwert
53,6	5,5	33,1	79,3	157	64
Massenübereinstimmungen					
m/z	Position	Aminosäuresequenz			
861,4	252 - 258	DISENKR			
989,5	251 - 258	KDISENKR			
1180,6	103 - 112	VQVEYKGETK			
1199,6	160 - 171	DAGTIAGLNVLR			
1252,6	127 - 137	MKEIAEAYLGK			
1480,7	300 - 311	ARFEELNADLFR			
1487,7	37 - 49	TTPSYVAFDTER			
1616,8	113 - 126	SFYPEEVSSMLTK			
1691,7	221 - 236	STAGDTHLGGEDFDNR			
1788,0	172 - 188	IINEPTAAAIYGLDKK			
1838,0	326 - 342	LDKSIHQHDIIVLGGSTR			
1982,0	138 - 155	TVTNAVVTVPAYFNDSQR			
2156,1	37 - 56	TTPSYVAFDTERLIGDAAK			
2320,2	300 - 319	ARFEELNADLFRGTLDPVEK			

Auf den ersten Blick deuten die Ergebnisse der Datenbankanalyse darauf hin, dass in den Banden 1 und 2 verschiedene Proteine identifiziert wurden. Bei der genaueren Analyse der Aminosäuresequenzen beider Proteinspezies konnte jedoch festgestellt werden, dass die in Bande 2 identifizierte Variante des Heat Shock 70 kDa Proteins 8 Isoform 2 eine verkürzte Form der in Bande 1 identifizierten Isoform 1 Hsc70 (Isoform 1) ist und beide Proteine am aminoterminalen Ende sowie in großen Teilen des mittleren Bereiches der Aminosäuresequenz eine starke Homologie zueinander aufweisen (Abb. 2.42 A). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des in Bande 2 identifizierten Heat Shock 70 kDa Proteins 8 Isoform 2 Variant mit Sequenzen einer Proteindatenbank mittels BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) zeigte, dass diese zu 98 % mit der Sequenz der Isoform 2 des Hsc70 identisch ist (Abb. 2.42 B) und sich die Sequenzen nur in zwei Aminosäurevariationen an den Positionen 410 und 422 unterscheiden (Abb. 2.42 A). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass es sich bei dem in Bande 2 identifizierten Protein um eine Variante des Hsc70 handelt, unterstützt durch die Tatsache, dass Hsc70 alternativ auch als Heat Shock 70 kDa Protein 8 benannt wird. Durch die konservative Durchführung der Reinigungsstrategie konnte in einem zweiten Experiment die Identifizierung der Isoform 1 des Hsc70 in Bande 1 und des Heat Shock 70 kDa Proteins 8 Isoform 2 Variant in Bande 2, in der auch das radioaktive Signal detektiert werden konnte, des 1D-Gels verifiziert werden (Daten siehe Anhang). Mit einer sehr großen Wahrscheinlichkeit handelt es sich daher bei dem mit der HCV-RNA interagierenden 68 kDa-Protein um das Heat Shock Cognate 71 kDa Protein (Hsc70). Im Folgenden wird daher das Heat Shock 70 kDa Protein 8 Isoform 2 Variant als Variante der Isoform 2 des Hsc70 bezeichnet.

A

```

Q53HF2-1 MSKGPVAVGIDLGTYSVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVA 60
P11142-2 MSKGPVAVGIDLGTYSVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVA 60
P11142-1 MSKGPVAVGIDLGTYSVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVA 60
*****
Q53HF2-1 MNPTNTVFDARLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFMVVNDAGRPKVQVEYKGETKSFYPPEEVS 120
P11142-2 MNPTNTVFDARLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFMVVNDAGRPKVQVEYKGETKSFYPPEEVS 120
P11142-1 MNPTNTVFDARLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFMVVNDAGRPKVQVEYKGETKSFYPPEEVS 120
*****
Q53HF2-1 SMVLTMKKEIAEAYLGKTVTNNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNVLRINEPTAAA 180
P11142-2 SMVLTMKKEIAEAYLGKTVTNNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNVLRINEPTAAA 180
P11142-1 SMVLTMKKEIAEAYLGKTVTNNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNVLRINEPTAAA 180
*****
Q53HF2-1 IAYGLDKKVGAERNVLI FDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNH 240
P11142-2 IAYGLDKKVGAERNVLI FDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNH 240
P11142-1 IAYGLDKKVGAERNVLI FDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNH 240
*****
Q53HF2-1 FIAEFKRKHKKDISENKRARRLR TACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRA 300
P11142-2 FIAEFKRKHKKDISENKRARRLR TACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRA 300
P11142-1 FIAEFKRKHKKDISENKRARRLR TACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRA 300
*****
Q53HF2-1 RFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSIHDIIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFNKGKELN 360
P11142-2 RFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSIHDIIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFNKGKELN 360
P11142-1 RFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSIHDIIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFNKGKELN 360
*****
Q53HF2-1 KSINPDEAVAYGAAVQAAILSGDKSENVQDLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTI 420
P11142-2 KSINPDEAVAYGAAVQAAILSGDKSENVQDLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTI 420
P11142-1 KSINPDEAVAYGAAVQAAILSGDKSENVQDLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTI 420
*****
Q53HF2-1 PIKQTQTFTTYS DNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELT----- 462
P11142-2 PTKQTQTFTTYS DNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELT----- 462
P11142-1 PTKQTQTFTTYS DNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPAPRGVPQIEVTFDI 480
* *****
Q53HF2-1 ----- 462
P11142-2 ----- 462
P11142-1 DANGILNVS AVDKSTGKENKITITNDKGRLSKEDIERMVQEA EK YKAEDEKQRDKVSSKN 540
*****
Q53HF2-1 ----- 462
P11142-2 ----- 462
P11142-1 SLESYAFNMKATVEDEKLQ GKINDEDKQKILD KCNEIINWLDKNQTAEKEEF EHQKLE 600
*****
Q53HF2-1 -----GMPGGMPGGFPGGGAPPSGGASSGPTIEEVD 493
P11142-2 -----GMPGGMPGGFPGGGAPPSGGASSGPTIEEVD 493
P11142-1 KVCNPIITKLYQSAGGMPGGMPGGFPGGGAPPSGGASSGPTIEEVD 646
*****

```

B

Entry name	Protein names [†]	Organism [†]	Length [†]	Identity (%) [‡]	Score [‡]
Q53HF2_HUMAN	Heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 variant	Homo sapiens (Human).	493	100	971
HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8)	Homo sapiens (Human).	646	98	907
Q53GZ6_HUMAN	Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 variant	Homo sapiens (Human).	646	98	905
Q96IS6_HUMAN	HSPA8 protein	Homo sapiens (Human).	587	98	789
B4E1Q1_HUMAN	cDNA FLJ55485, highly similar to Heat shock cognate 71 kDa protein	Homo sapiens (Human).	501	96	615
A8K7Q2_HUMAN	cDNA FLJ77848	Homo sapiens (Human).	410	96	441
B4DTX2_HUMAN	cDNA FLJ59163, highly similar to Heat shock cognate 71 kDa protein	Homo sapiens (Human).	210	100	377
Q96BE0_HUMAN	Putative uncharacterized protein	Homo sapiens (Human).	269	91	169
Q96H53_HUMAN	HSPA8 protein	Homo sapiens (Human).	219	86	81
Q9NZ87_HUMAN	Uncharacterized bone marrow protein BM034	Homo sapiens (Human).	129	100	71

Abb. 2.42: Analyse der Aminosäuresequenzen der identifizierten Proteine Heat Shock Cognate 71 kDa Protein Isoform 1 und Heat Shock 70 kDa Protein 8 Isoform 2. **(A)** Abgleich der Aminosäuresequenzen. Der Abgleich der Aminosäuresequenzen der beiden Isoformen des Hsc70 und der Variante der Isoform 2 des Hsc70 erfolgte mittels der UniProt (*Universal Protein Resource*)-Datenbank (<http://www.uniprot.org/>). Q53HF2-1, Heat Shock 70 kDa Protein 8 Isoform 2 Variant; P11142-1, Heat Shock Cognate 71 kDa Protein Isoform 1; P11142-2, Heat Shock Cognate 71 kDa Protein Isoform 2. **(B)** Vergleich der Aminosäuresequenz des Heat Shock 70 kDa Protein 8 Isoform 2 Variante gegen eine Proteinsequenzdatenbank mittels BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Der Abgleich der Aminosäuresequenz des Heat Shock 70 kDa Protein 8 Isoform 2 Variant (Q53HF2_human) erfolgte mittels der UniProt (*Universal Protein Resource*)-Datenbank (<http://www.uniprot.org/>).

Aus den oben geschilderten Ergebnissen ergeben sich jedoch einige Fragen, die nachfolgend zu beantworten versucht werden sollen.

Warum konnte in beiden Experimenten in Bande 2 eine Variante der Isoform 2 des Hsc70 identifiziert werden? Die genauere Betrachtung der Peptidfragmente, die der Variante zugeordnet werden konnten, zeigt, dass mit dem Bereich der Aminosäurevariationen, also Position 410 und 422, keine Peptidfragmente übereinstimmen. Diese Variationen wurden bei der Analyse und Zuordnung der ermittelten Peptide durch die Macot-Software offensichtlich nicht berücksichtigt. Aus den zugeordneten Peptidmassen geht also nicht hervor, dass es sich bei dem in Bande 2 identifizierten Protein um eine Variante der Isoform 2 des Hsc70 handelt.

Warum wurden in beiden Experimenten die Peptidfragmente der Bande 2 mit dem stärksten radioaktiven Signal der Isoform 2 des Hsc70 und nicht der Isoform 1 des Hsc70 zugeordnet? Die Isoform 2 des Hsc70 hat nach aktuellem Stand ein kalkuliertes Molekulargewicht von etwa 53 kDa. Da die durch einen UV-Crosslink an das Protein gebundene radioaktiv HCV-RNA wahrscheinlich eher die Nettoladung des Proteins als dessen Molekulargewicht beeinflusst, ist es relativ unwahrscheinlich, dass es sich bei dem HCV-RNA-bindenden Protein von etwa 68 kDa um diese Isoform des Hsc70 handelt. Dass bei der Proteinanalyse dem carboxyterminalen Teil der Isoform 1 des Hsc70 keine Peptidmassen zugeordnet werden konnten, könnte darin begründet sein, dass die HCV-RNA in diesem Bereich das Protein bindet und durch den tryptischen Verdau entstehende RNA-Peptid-Heterokonjugate durch das Massenspektrometer nicht detektiert werden können, beziehungsweise durch ein verändertes Masse/Ladungs-Verhältnis der Isoform 1 des Hsc70 nicht mehr zugeordnet werden können. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei der in Bande 2 identifizierten Variante des Hsc70 um die Isoform 1 handelt.

Über die Ursachen der differierenden Migration des Hsc70 im SDS-Gel kann hier ebenfalls nur spekuliert werden (Abb. 2.37). Im Anschluss an die in einem Crosslink-Experiment UV-induzierte kovalente Bindung der radioaktiv markierten HCV-RNA an interagierende Proteine folgt die endonukleolytische Degradation der nicht durch das Protein geschützten RNA-Anteile. Dadurch bleiben verschieden lange HCV-Oligoribonukleotide an die Proteinmoleküle fixiert. Da unterschiedlich getrimmte radioaktiv markierte HCV-RNAs die Nettoladung des Protein-Oligoribonukleotid-Konjugates verändern, ergeben sich daraus wahrscheinlich die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten des Proteins im elektrischen Feld.

Die oben aufgestellten Hypothesen werden durch die Tatsache unterstützt, dass nur etwa 5 % bis 10 % der RNA-Protein-Interaktionen durch UV-Induktion fixiert werden (Song et al., 2005). Da das stärkste radioaktive Signal in den Banden 2 detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass der Großteil der RNA-Protein-Konjugate in diesem Bereich des SDS-Gels migrierten und aufgrund der gebundenen HCV-RNA-Oligonukleotide der verkürzten Variante des Hsc70 zugeordnet wurden. Die

geringe Effizienz des UV-Crosslinks ist vermutlich auch Ursache der fehlgeschlagenen Proteinidentifizierung in den Banden 3 und 4, in denen ein schwaches radioaktives Signal detektiert werden konnte (Abb. 2.37). Wahrscheinlich war der Proteingehalt in diesen Ansätzen zu gering, um bei der massenspektrometrischen Analyse ausreichend hohe Signalintensitäten zu erhalten.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der beiden voneinander unabhängigen Proteinidentifizierungen den Schluss zu, dass es sich bei dem hier in Huh7-Zelllysat identifizierten HCV-RNA-bindenden 68 kDa-Protein um Hsc70 handelt. Um eine falsche Interpretation dieser Ergebnisse auszuschließen müssen diese jedoch durch andere Identifizierungsmethoden nachfolgend verifiziert werden.

Einen Hinweis auf die Zuverlässigkeit dieser Proteinidentifizierung liefert eine Studie, in der Hsc70 als ein sowohl mit der HCV-IRES als auch mit der FMDV-IRES interagierendes Protein identifiziert werden konnte (Pacheco et al., 2008). Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ein Protein von etwa 68 kDa an die FMDV-IRES bindet und diese Bindung spezifisch durch die miR-122 unterbunden wird (Kapitel 2.33 Abb. 2.18). Durch den Vergleich mit Ergebnissen aus UV-Crosslink-Experimenten mit der HCV-RNA wurde daraus geschlossen, dass es sich bei dem FMDV-IRES-bindenden Protein wahrscheinlich um das gesuchte 68 kDa-Protein handelt.

Hsc70 wurde in der Literatur bereits im Zusammenhang mit HCV beschrieben. In einer Studie aus 2009 konnte die Assoziation von Hsc70 mit infektiösen HCV-Partikeln gezeigt werden (Parent et al., 2009). Da Hsc70 zusammen mit dem HCV-E2-Glykoprotein und Core-Protein in sogenannten „Lipid Droplets“ als Orte der Viruszusammensetzung und –freisetzung ko-lokalisiert werden konnte, kamen die Autoren zu dem Schluss, dass Hsc70 für den Zusammenbau und die Freisetzung infektiöser HCV-Partikel essentiell ist. Das konstitutiv exprimierte Hsc70 wird der Hsp70 (Heat Shock Protein 70 kDa)-Familie zugeordnet, einer Familie von Chaperonen, die in verschiedenen biologischen Prozessen involviert ist. Auch prokaryotische und eukaryotische Viren rekrutieren für die Etablierung eines erfolgreichen Infektionszykluses Hsp70-Chaperone als zentrale Komponenten des zellulären Chaperon-Netzwerkes (Sullivan und Pipas, 2001). So ist die Hsp70-Maschinerie zum Beispiel für die DNA-Replikation des humanen Papillomavirus oder des Herpes Simplex Virus essentiell (Mayer, 2005). Dabei unterstützt der Chaperon-Komplex den Auf- und Abbau viraler Replikations-Initiationskomplexe sowie die Stabilisierung und Aktivierung von Helikasen und Polymerasen. Da Chaperone offensichtlich die biologische Aktivität und Stabilität regulatorischer Proteine modulieren, ist die Rekrutierung des Chaperons Hsc70 zur Regulation der IRES-vermittelten Translation der HCV-RNA vorstellbar.

2.5.4 Fazit

In diesem Teil der Arbeit konnte eine Methode zur Aufreinigung und Identifizierung des mit der HCV-RNA interagierenden 68 kDa-Proteins entwickelt werden. Zunächst wurde versucht, die Proteinkomponenten eines UV-Crosslink-Ansatzes der radioaktiv markierten HCV-RNA in HeLa- oder Huh7-Zellextrakt durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufzutrennen und das 68 kDa-Protein durch die radioaktive Markierung zu identifizieren. Aufgrund der starken Absorption der radioaktiven Strahlung durch Wasser mussten die aufgetrennten Proteine für die Autoradiographie auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Die Problematik dieses experimentellen Ansatzes bestand darin, dass das 68 kDa-Protein zur Identifizierung mittels Massenspektrometrie nur durch die Korrelation mit dem Autoradiogramm aus der PVDF-Membran isoliert werden konnte. Dieses indirekte Verfahren erhöhte jedoch die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Proteinidentifizierungen, zusätzlich zu der Kontaminationsquelle des Proteintransfers auf die PVDF-Membran. Außerdem war die Trennung der Proteine nicht ausreichend, um eventuell überlagerte Proteinbanden voneinander zu isolieren. Durch die massenspektrometrische Analyse des über eine 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten 68 kDa-Proteins wurden verschiedene Proteine wie das Menkes-Protein, humanes Serumalbumin oder die Phosphoglucomutasen 1 und 3 identifiziert. Durch die Entwicklung einer kombinierten Reinigungsstrategie aus Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und präparativer eindimensionaler SDS-PAGE konnten das radioaktiv markierte 68 kDa-Protein dann aber effizient und reproduzierbar angereichert und kontaminierende Proteinspezies abgetrennt werden. Die Analyse des auf diese Art gereinigten Proteins ergab die Identifizierung des humanen Heat Shock Cognate 71 kDa Proteins (Hsc70). Alle anderen zuvor identifizierten Proteine wurden nicht bestätigt. Da hier jedoch keine Proteinmischungen identifiziert werden konnten und kontaminierende Proteinspezies offensichtlich effizient abgetrennt wurden, ist die Wahrscheinlichkeit einer fehlerhaften Identifizierung gering. Fortführende Versuche erfordern jedoch die Bestätigung dieses Ergebnisses durch alternative Identifizierungsmethoden, wie der Immunpräzipitation. Anschließend könnte die Funktion des Hsc70 bei der Translationsregulation an der HCV-IRES im Zusammenhang mit der leberspezifischen miR-122 durch siRNA-„knock down“-Experimente in der Hepatomazelllinie Huh7 und der Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa genauer untersucht werden.

3. Diskussion

Die IRES-gesteuerte Translation der HCV-RNA wird durch die leberspezifische microRNA-122 (miR-122) *in vivo* und *in vitro* stimuliert. Die untranslatierten Regionen (UTRs) des HCV-RNA-Genoms weisen für die leberspezifische miR-122 drei potentielle und zwischen allen HCV-Isolaten konservierte Bindungsstellen auf. Zwei dieser Sequenzen befinden sich in der Region zwischen dem ersten und zweiten Stem-Loop der HCV-5'-UTR (Nukleotide 22 – 28 und 38 – 43), die dritte liegt in der variablen Region der HCV-3'-UTR. Durch Mutation der Sequenz in der HCV-3'-UTR konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der HCV-Translation nicht durch die Bindung der miR-122 an die Zielsequenz in der HCV-3'-UTR erfolgt (Diplomarbeit J.I. Henke; Henke, Goergen et al., 2008).

In dieser Arbeit sollte die Notwendigkeit der potentiellen miR-122-Bindungsstellen in der HCV-5'-UTR für den positiven Einfluss der miR-122 auf die HCV-Translation und der diesem Effekt zugrundeliegende molekulare Mechanismus näher untersucht werden. Dabei konnte die Bindung der miR-122 an ihre Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR und die Bedeutsamkeit *beider* Bindungsstellen bei der Translationsstimulation verifiziert werden. Eine zu Mutationen in beiden miR-122-Zielsequenzen der HCV-5'-UTR kompensatorisch mutierte miR-122 konnte die Stimulation der HCV-Translation sowohl in der Hepatomazelllinie Huh7 als auch in HeLa-Zellen, die keine miR-122 exprimieren, wieder herstellen. Dadurch wurde die direkte Interaktion der miR-122 mit ihren beiden Zielsequenzen bestätigt. Genauere Untersuchungen der Abläufe bei der Translations-Initiation an der HCV-IRES zeigten, dass die Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 auf dem Stadium der Bildung ribosomaler 48S-Initiationskomplexe stattfindet. Sowohl die HCV-RNA als auch die miR-122 konnten in den Fraktionen der 48S-Komplexe, identifiziert durch den Stadien-spezifischen Translationsinhibitor GMP-PNP, detektiert werden. Anscheinend beschleunigt die miR-122 die Assoziation der HCV-RNA mit der 40S-Untereinheit innerhalb der ersten zwei Minuten des Initiationsvorgangs, was sich im zeitlichen Verlauf auch verstärkend auf die Bildung von 80S-Ribosomen auswirkte.

Durch die Analyse von RNA-Protein-Interaktionen zur Untersuchung der Mitwirkung von Proteinen an der Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 konnte ein Protein von etwa 68 kDa detektiert werden, dessen Interaktion mit der HCV-5'-UTR durch die miR-122 spezifisch vermindert wird. Offenbar kompetiert die miR-122 mit der HCV-RNA um die Bindung dieses Proteins, was zu einer veränderten Proteinbindung an die HCV-IRES führt. Mittels massenspektrometrischer Analysen konnte das 68 kDa-Protein als Heat Shock Cognate 71 kDa Protein (Hsc70) identifiziert werden. Eine Verifizierung dieses Ergebnisses durch alternative Identifizierungsmethoden war im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich, ebenso wie die Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen der Stimulation der Translation der HCV-RNA und der Inhibition ihrer Bindung an das 68 kDa-Protein durch die miR-122.

3.1 Aktivierung des Hepatitis C Virus durch die leberspezifische microRNA-122

Den ausschlaggebenden Hinweis auf die Bedeutung der leberspezifischen miR-122 für den Vermehrungszyklus des HCV lieferte eine Studie aus dem Jahr 2005, in der die Sequenz-spezifische Inhibition der endogenen miR-122 in Huh7-Zellen mittels 2'-O-methylierter Gegenstrang-Oligoribonukleotide zu einer verminderten Anreicherung transfizierter HCV-Replikon-RNA führte, was im Umkehrschluss von den Autoren als stimulierender Effekt der miR-122 interpretiert wurde (Jopling et al., 2005). Jopling und Ko-Autoren konnten inzwischen durch ortsspezifische Mutagenese zeigen, dass die verstärkte Akkumulation der HCV-RNA auf der Interaktion der miR-122 mit beiden Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR beruht (Jopling et al., 2008). Allerdings wurde der Gehalt der HCV-Replikon-RNA in transfizierten Zellen erst nach 48 Stunden gemessen. Da in dieser Zeit mehrere Runden der HCV-Genomamplifikation aus zunächst Translation der viralen Replikationsproteine gefolgt von der Synthese von Minus- und Plusstrang HCV-RNA-Genomen stattfinden konnten, war eine klare Abgrenzung von RNA-Translation und RNA-Replikation nicht möglich. Durch separate Translationsstudien wurde allerdings ein Einfluss der miR-122 auf die Translation der HCV-RNA von den Autoren nachfolgend ausgeschlossen und die Stimulation der HCV-RNA-Replikation durch die miR-122 propagiert. Der stimulierende Effekt der miR-122 auf die HCV-RNA-Replikation konnte durch unabhängige Studien unter anderem auch in Nicht-Leberzellen bestätigt werden (Randall et al., 2007; Chang et al., 2008).

Die für Jopling und Ko-Autoren entscheidenden Ergebnisse der Untersuchung eines Einflusses der miR-122 auf die HCV-Translation wurden jedoch mit einem sehr komplizierten experimentellen Ansatz durch Verwendung eines dicistronischen Replikon-Konstruktes erzielt (Yi et al., 2002) (Abb. 3.1). Zur effizienten Amplifikation der Replikon-RNA enthält diese außer der HCV-5'-UTR auch die HCV-3'-UTR. Die HCV-IRES steuert die Translation des HIV (humanes Immundefizienzvirus)-Tat (*transactivator of transcription*)-Proteins und eines Resistenzgens, wohingegen die Expression der HCV-Nichtstrukturproteine unter der Kontrolle eines picornaviralen IRES-Elements steht. Das exprimierte Tat-Protein initiiert die TAR (*transactivation responsive element*)-regulierte Expression eines separaten SEAP (sezernierte alkalische Phosphatase)-Reporterproteins, dessen Aktivität im Überstand als Maß für die Aktivität der HCV-IRES gemessen werden kann. Neben der Tatsache, dass es sich hierbei um eine sehr indirekte Methode zur Untersuchung der Translationseffizienz eines HCV-IRES-gesteuerten Reporters handelt, konnte in einer Studie unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass picornavirale IRES-Elemente die Translation eines stromaufwärts gelegenen Gens in einer dicistronischen RNA durch die Weitergabe von Translations-Initiationsfaktoren und/oder Ribosomen verstärken können (Jünemann et al., 2007). Im Gegensatz zu monocistronischen Systemen, in denen sich Mutationen in der HCV-IRES direkt auf die Translation des zu messenden Reporter gens auswirken, können in dicistronischen Replikon-Konstrukten Translationsdifferenzen eines unter Kontrolle der HCV-IRES translatierten

Reportergens durch Verwendung einer picornaviralen IRES nivelliert werden. Für die Ergebnisse der Jopling-Studie bedeutet das, dass den Autoren möglicherweise ein Effekt einer Mutation in der miR-122-Zielsequenz der HCV-5'-UTR auf die Translation der HCV-Replikon-RNA entgangen ist.

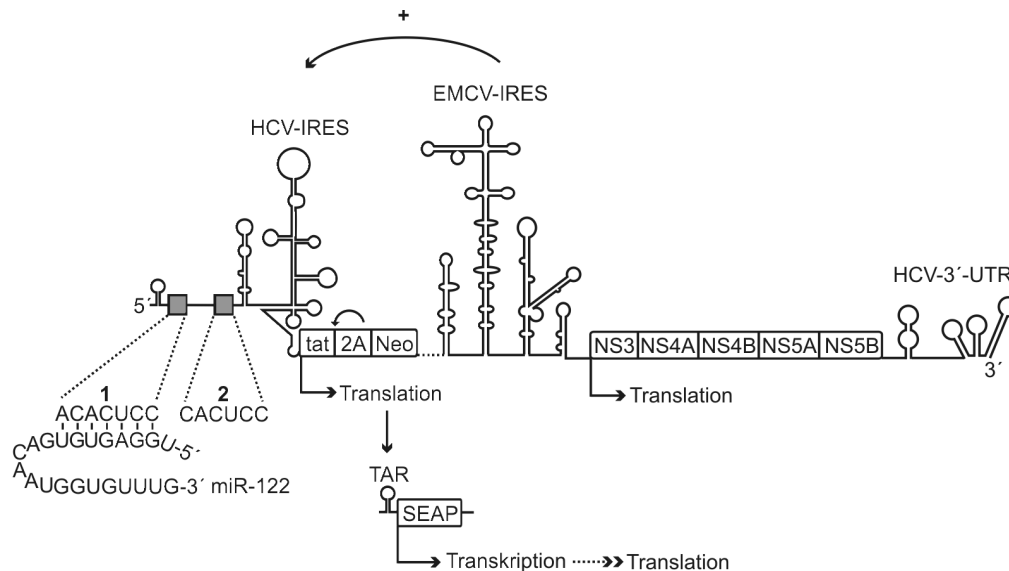


Abb. 3.1: Picornvirale IRES-Elemente können die Translation eines stromaufwärts gelegenen Gens verstärken. Schematische Darstellung des von Jopling und Ko-Autoren verwendeten dicistronischen HCV-Replikons (Jopling et al., 2005). Zur Amplifikation der Replikon-RNA enthält diese die authentische HCV-5'- und 3'-UTR. Die HCV-IRES vermittelt die Translation des Tat-2A-Neo-Fusionsproteins, die Translation der HCV-Nichtstrukturproteine (NS3 – NS5B) steht dagegen unter der Kontrolle einer EMCV (Encephalomyocarditisvirus)-IRES. Die EMCV-IRES stimuliert dabei möglicherweise die von der HCV-IRES-regulierte Translation des Fusionsproteins. Das durch die autolytische Spaltung der Poliovirus Protease 2A freigesetzte Tat-Protein bindet an das TAR-Element des Promotors eines separat exprimierten SEAP-Reporterproteins und induziert dessen Transkription. Durch die Messung der Aktivität des Translationsproduktes des SEAP-Transkriptes können Rückschlüsse auf die Aktivität der HCV-IRES gezogen werden. Tat, *transactivator of transcription*; SEAP, sezernierte alkalische Phosphatase; TAR, *transactivation responsive element*; Neo, Neomycin-Phosphotransferasegen. Verändert nach Yi et al., 2002.

In der vorliegenden Arbeit konnte hingegen die Stimulation der HCV-Translation durch die physikalische Interaktion der miR-122 mit beiden Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR und die dadurch beschleunigte Assoziation der HCV-RNA mit der 40S-ribosomalen Untereinheit gezeigt werden. Durch die Verwendung monocistronischer HCV-Reporter-RNAs konnten Aktivitätsunterschiede der HCV-IRES direkt anhand der Expression des Firefly-Luziferase-Reporterproteins detektiert werden. Damit wurden die Ergebnisse der Translationsstudien von Jopling und Ko-Autoren widerlegt.

3.2 Einfluss der Positionierung eines microRNA-Protein-Komplexes auf seine Funktion

Die post-transkriptionelle eukaryotische Genregulation durch microRNAs (miRNAs) als Komponente eines Ribonukleoprotein-Komplexes (miRNP-Komplex) erfolgt nach aktuellem Verständnis durch den endonukleolytischen Abbau der mRNA bei perfekter Komplementarität der miRNA zu der Ziel-mRNA oder durch Repression ihrer Translation beziehungsweise ihrer Deadenylierung bei partieller Komplementarität (Pillai et al., 2007). In Pflanzenzellen erfolgt ein Großteil der negativen Regulation der Proteinexpression durch einen siRNA-verwandten Vorgang, bei dem die vollständige Paarung der miRNA an ihre Ziel-mRNA zum endonukleolytischen Abbau der mRNA führt (Vaucheret, 2006). Im Gegensatz dazu paart in Tierzellen die Mehrheit der miRNAs unvollständig an ihre Ziel-mRNAs, wodurch aufgrund unzureichender Basenpaarungen die RNAi-ähnliche Degradation der mRNA ausbleibt und die Bindung des miRNA-Effektorkomplexes in der Deadenylierung der mRNA und ihres schnellen Abbaus (Wu et al., 2006) oder in der Inhibition ihrer Translation resultiert. Es gibt Hinweise darauf, dass die Inhibition der Translation auf Ebene der Initiation durch Beeinträchtigung der Erkennung der m⁷G-Kappe (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005; Mathonnet et al., 2007; Thermann und Hentze, 2007) beziehungsweise der Anlagerung der 60S-ribosomalen Untereinheit (Chendrimada et al., 2007; Wang et al., 2008a) oder in der post-initialen Phase durch eine verlangsamte oder frühzeitig abgebrochene Translations-Elongation (Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006) stattfindet.

Abweichend von den oben beschriebenen Mechanismen konnte die leberspezifische miR-122 als positiver Regulator der Translation (Henke, Goergen et al., 2008) und der Akkumulation der HCV-RNA in der Zelle (Jopling et al., 2005) identifiziert werden. Von einer Modulation der miRNA-Funktion wurde auch in anderen Studien berichtet, in denen miRNAs vielmehr die Aktivierung ihrer Ziel-mRNAs als deren Repression herbeiführen (Vasudevan und Steitz, 2007; Vasudevan et al., 2007; Orom et al., 2008). Vasudevan und Ko-Autoren konnten die miRNA-vermittelte Translationsstimulation von mRNAs als Folge einer durch Serumangel oder Kontakt-Inhibition induzierten zellulären Stresssituation und den Übergang in einen ruhenden Zustand der Zellen zeigen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass miRNAs die Translation von mRNAs in einer Zellzyklus-abhängigen Weise regulieren und in ruhenden, in der G₀-Phase verharrenden Zellen die Aktivierung der Translation, in proliferierenden Zellen dagegen ihre Repression vermitteln (Vasudevan et al., 2008). Diese Hypothese wird von zwei aktuellen Studien unterstützt, in denen die Suppression der globalen miRNA-Funktion in murinen Oocyten, die ein natürliches System ruhender Zellen darstellen, gezeigt werden konnte (Ma et al., 2010; Suh et al., 2010). Es wird angenommen, dass mit der Suppression der miRNA-Funktion in der Phase des Oocyten-Wachstums die Fähigkeit zur De-Differenzierung einhergeht, also die Re-Programmierung einer differenzierten Oocyte in pluripotente Zellen des Embryos erlaubt wird. Die miRNA-vermittelte post-transkriptionelle Genregulation ist somit wahrscheinlich erst in späteren Entwicklungs- und Differenzierungsstadien von Bedeutung.

Es gibt Hinweise darauf, dass proliferierende Zellen der negativen Regulation durch miRNAs entgehen können und dadurch ihre post-transkriptionelle Genexpression modulieren. In einer Studie von Sandberg und Ko-Autoren konnte gezeigt werden, dass die 3'-UTRs vieler mRNAs in aktivierten T-Lymphozyten durch alternatives Spleißen oder alternative Polyadenylierung verkürzt werden, was zur Eliminierung von miRNA-Zielsequenzen führt und in einer verstärkten Proteinexpression resultiert (Sandberg et al., 2008). Die Modellierung von 3'-UTRs ist somit Teil eines regulatorischen Netzwerkes und stellt wahrscheinlich eine wichtige Funktion bei der Regulation der Genexpression in Abhängigkeit zur Wachstums- und Vermehrungsaktivität somatischer Zellen dar.

Die Tatsache, dass die Interaktion der miR-122 nach den allgemein gültigen Regeln der miRNA-mRNA-Interaktion unter Einbeziehung der miRNA „seed“-Nukleotide mit Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR erfolgt, ist ebenso neu wie ungewöhnlich. Bisher wurden bei pflanzlichen mRNAs die Interaktionsstellen für miRNAs vorwiegend in der codierenden Region und bei tierischen mRNAs in der 3'-UTR gefunden (Rhoades et al., 2002; Lewis et al., 2003). Die Tatsache, dass pflanzliche miRNAs durch die perfekte Komplementarität mit ihren Ziel-mRNAs eine siRNA-ähnliche Repression herbei führen und dass die einzige bekannte tierische miRNA mit Zielsequenzen in der Protein-codierenden Region ebenfalls durch perfekte Paarung zum endonukleolytischen Abbau ihrer Ziel-mRNA führt (Yekta et al., 2004), lässt vermuten, dass die Lokalisierung der miRNA-Zielsequenzen einen funktionellen Grund haben muss und wirft die Frage auf, warum verhältnismäßig wenig miRNA-Zielsequenzen in den 5'-UTRs gefunden wurden.

Das entscheidende Kriterium für die Lokalisation der miRNA-Zielsequenzen in der 3'-UTR von mRNAs scheint in der Interferenz eines Ribosoms mit dem an die RNA gebundenen miRNP-Komplex zu sein (Abb. 3.2). Gu und Ko-Autoren konnten zeigen, dass die Modifikation des Translation-terminierenden Stop-Codons und die dadurch in den Bereich von miRNA-Zielsequenzen erweiterte codierende Region eine miRNA-vermittelte Repression der Translation unterbinden kann (Gu et al., 2009). Die verzögerte Translations-Elongation durch den Einbau seltener Codons in diesem Bereich konnte den Effekt der miRNA jedoch wieder herstellen. Anscheinend schützt die Verlagerung der miRNA-Zielsequenzen in den 3'-nicht codierenden Bereich einer mRNA den miRNP-Komplex vor seiner Verdrängung durch ein translatierendes 80S-Ribosom (Abb. 3.2 B). Die Bindung von miRNAs an Sequenzen in dem 5'-untranslatierten Bereich einer mRNA könnte also dazu führen, dass eine nach einem Start-AUG suchende 40S-ribosomale Untereinheit mit dem miRNP-Komplex kollidiert und ihn von der mRNA verdrängt.

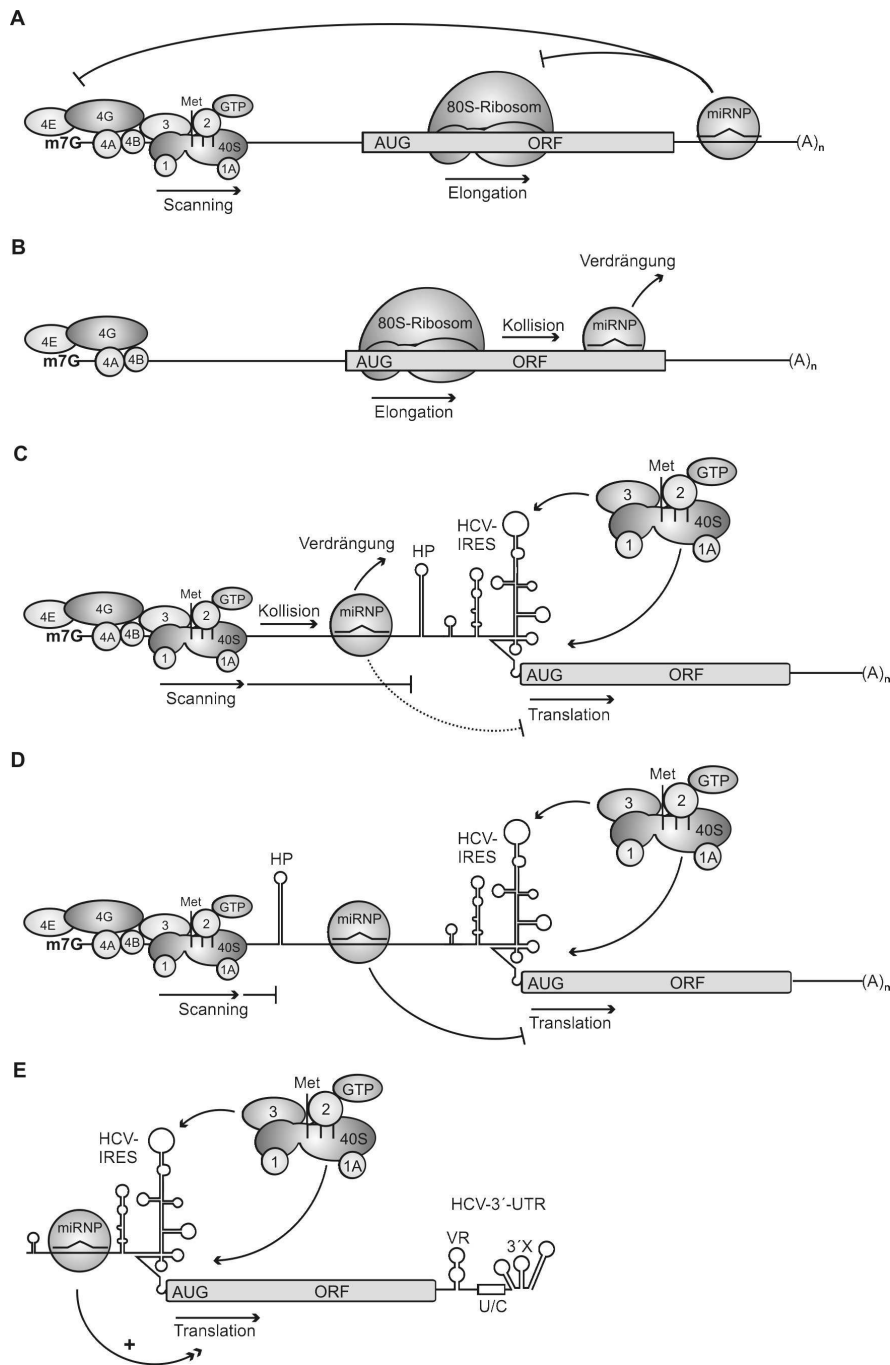


Abb. 3.2: Restriktion von miRNA-Zielsequenzen auf die 3'-untranslatierte Region tierischer mRNAs. (A) Die unvollständige Paarung von miRNAs an Sequenzen in der 3'-UTR führt zur Inhibition der Translation ihrer Ziel-mRNAs auf Ebene der Translations-Initiation oder einer post-initialen Phase (Chekulaeva und Filipowicz, 2009). (B) Die Verlagerung der miRNA-Zielsequenzen in den offenen Leserahmen einer mRNA führt zur Kollision des miRNP-Komplexes mit einem sich in der Elongation befindenden 80S-Ribosom. Durch die daraus resultierende Verdrängung des miRNP-Komplexes wird die mRNA-vermittelte Repression der mRNA-Translation aufgehoben (Gu et al., 2009). (C) Ein mit 5'-UTR-Zielsequenzen interagierender miRNP-Komplex wird durch eine nach einem geeigneten Start-AUG suchende („scannende“) 40S-ribosomale Untereinheit von der mRNA verdrängt und kann die Repression der Translation nicht mehr effizient ausüben. (D) Wird das „Scanning“ ausgehend von einer m⁷G-Kappe durch eine Haarnadelstruktur (*hairpin*, HP) unterbunden, kann die Repression der HCV-IRES-vermittelten Translation einer mRNA durch den miRNP-Komplex wieder hergestellt werden. Durch die direkte Bindung der 43S-Initiationskomplexes an die HCV-IRES wird der miRNP-Komplex nicht von der HCV-RNA verdrängt (Lytle et al., 2007). (E) Die Interaktion der miR-122 mit Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR führt zur Stimulation der HCV-Translation. Die Distanz des miRNP-Komplexes zur Ribosomen-Bindungsstelle ist im Gegensatz zu einem reprimierenden miRNP-Komplex deutlich vermindert (vergl. E mit C und D) (Henke, Goergen et al., 2008).

Diese Theorie wird durch die Ergebnisse von Lytle und Ko-Autoren unterstützt, die eine reduzierte Repressionsaktivität von miRNP-Komplexen durch Interaktion mit Sequenzen in der 5'-UTR einer RNA zeigen konnten (Lytle et al., 2007). Zur Untersuchung der Repressionsfähigkeit von miRNP-Komplexen verwendeten die Autoren Reporter-mRNAs mit 5'-terminaler m⁷G-Kappe und einem 3'-poly(A)-Ende; die Initiation der Translation des offenen Leserahmens erfolgte jedoch intern an einer HCV-IRES. Die miRNA-Zielsequenzen lagen stromaufwärts der HCV-IRES, entweder stromaufwärts oder stromabwärts einer Haarnadelstruktur (54 bp), die das Absuchen der RNA-Sequenz durch eine 40S-ribosomale Untereinheit ausgehend von der m⁷G-Kappe unterbindet. Liegen die miRNA-Zielsequenzen stromaufwärts der Haarnadelstruktur, wurde die Repression der IRES-vermittelten Translation im Vergleich zu der Reporter-RNA mit miRNA-Zielsequenzen stromabwärts der Haarnadelstruktur um etwa 50 % vermindert (Abb. 3.2 C). Eine nach einem Start-AUG suchende 40S-Untereinheit verdrängt also offensichtlich einen miRNP-Komplex und vermindert dadurch seine Repressionsfähigkeit. Durch die Verlagerung der miRNA-Zielsequenzen stromabwärts der Haarnadelstruktur konnte dieser Effekt aufgehoben und eine mit Zielsequenzen in der 3'-UTR vergleichbare Repression der Translation erzielt werden (Abb. 3.2 D). Da die kleine ribosomale Untereinheit zur Initiation der Translation an der HCV-IRES direkt an das Start-AUG herangeführt wird, entfällt hier die Kollision eines miRNP-Komplexes mit der nach einem Start-AUG suchenden 40S-Untereinheit.

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Stimulation der HCV-Translation durch Interaktion mit beiden Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR (Henke, Goergen et al., 2008) ist ein seltenes natürliches Beispiel, in dem Zielsequenzen in der 5'-UTR für die miRNA-Funktion von Bedeutung sind. Da die Translation der HCV-RNA nicht durch eine m⁷G-Kappe sondern intern durch die IRES eingeleitet wird, kann ein zwischen dem 5'-Ende und der IRES bindender miRNP-Komplex seine Funktion ausüben, ohne durch ein „scannendes“ Ribosom von der RNA verdrängt zu werden (Abb. 3.2 E).

Die Studie von Lytle zeigt aber auch, dass allein die Verlagerung der miRNA-Zielsequenzen nach stromaufwärts eines IRES-Elements nicht ausschlaggebend für die Modulation der miRNA-Funktion ist. Anscheinend ist auch die Distanz eines mit der mRNA interagierenden miRNP-Komplexes zu der Eintrittsstelle der 40S-ribosomalen Untereinheit bestimmend. Im Gegensatz zu der Anordnung der miRNA-Zielsequenzen in den Konstrukten der Lytle-Studie sind die Zielsequenzen der miR-122 zwischen den Stem-Loops I und II der HCV-5'-UTR in einem geringen und definiertem Abstand zu den 40S-Untereinheit-bindenden Domänen II und III lokalisiert. Diese direkte Nähe des miRNP-Komplexes zu der ribosomalen Untereinheit könnte zu der Modulation der miR-122-Funktion führen. Da Argonaute (Ago) 2 auch als eukaryotischer Initiationsfaktor eIF2C beschrieben wurde, der eine starke Affinität zu Ribosomen aufweist und die Translations-Initiation aktiviert (Roy et al., 1988), könnte die direkte Nähe eines miRNP-Komplexes zum Ribosom die Stimulation der HCV-Translation herbei führen. Die duale Funktion von miRNAs könnte somit durch die Ausstattung des

jeweiligen nicht codierenden Bereiches mit Proteinbindungsstellen und anderen regulatorischen Elementen und mit seiner Position relativ zur Ribosomen-Bindungsstelle erklärbar sein.

Gegen die weiter oben aufgeführte Hypothese für die stark präferierte Lokalisation von miRNA-Zielsequenzen in den 3'-UTRs von mRNAs sprechen die Ergebnisse einer Studie von Orom und Ko-Autoren. Hier konnte gezeigt werden, dass die miR-10a mit Sequenzen in der 5'-UTR unterhalb des 5'-TOP (terminaler Oligopyrimidin-Trakt)-Motifs von mRNAs ribosomaler Proteine paart und ihre Translation stimuliert (Orom et al., 2008). Die hier beschriebene Stimulation der Translation ist jedoch wahrscheinlich ein sehr spezieller Fall, da die miRNA-mRNA-Interaktion nicht auf den Regeln der miRNA-mRNA-Basenpaarung unter Beteiligung der 5'-terminalen „seed“-Sequenz beruht und die Voraussetzung für die Translationsstimulation das Vorhandensein eines 5'-TOP-Motifs ist. Die Autoren favorisieren einen Mechanismus, in dem die miR-10a mit einem stromabwärts des 5'-TOP-Motifs bindenden negativ regulierenden Faktor kompetiert und dadurch die Translation der reprimierten mRNAs stimuliert. Auch in dieser Studie führte die Interaktion der miR-10a mit entsprechenden Zielsequenzen in der 3'-UTR einer Reporter-RNA zur Repression ihrer Translation, was die Positionsabhängigkeit eines miRNA-Effektes unterstreicht.

3.3 Molekularer Mechanismus der Stimulation der Translation des Hepatitis C Virus

Über einen möglichen Mechanismus der Translationsstimulation durch miRNAs kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Die verstärkte Translation der HCV-RNA in Zellen durch die Auflösung einer translationsinhibierenden RNA-RNA-Interaktion zwischen Nukleotiden der HCV-5'-UTR und der codierenden Region (Kim et al., 2003) durch eine Chaperon-ähnliche Funktion der miR-122 konnte in der vorliegenden Arbeit widerlegt werden. Dagegen wurde eine solche Funktion der miR-122 bei der Translation der HCV-RNA in dem *in vitro*-Translationssystem Kaninchen-Retikulozytenlysat bestätigt (Goergen und Niepmann, unpublizierte Daten).

Im Allgemeinen vermitteln miRNAs in einem Komplex mit einem Argonaute-Protein und dem „P-body“-Protein GW182 die Repression ihrer Ziel-mRNAs. Interessanterweise sind Anzahl und Größe der „P-bodies“ und auch die Expression von GW182 in proliferierenden Zellen im Vergleich zu ruhenden Zellen erhöht, was mit dem Verlust der Translationsrepression in ruhenden Zellen korreliert (Yang et al., 2004). In dem Zusammenhang konnten Vasudevan und Steitz zeigen, dass die durch eine zelluläre Stresssituation induzierte Translationsstimulation der miRNA-regulierten mRNA des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α) von der Rekrutierung der miRNP-assoziierten Faktoren Argonaute (Ago) 2 und FXR1 (*fragile-X-mental-retardation-related protein 1*) zu AU-reichen Elementen (ARE) der 3'-UTR der mRNA abhängig ist (Vasudevan und Steitz, 2007; Vasudevan et al., 2007). In diesem Fall ist also anscheinend die Re-Organisation eines miRNP-Komplexes durch die Änderung der Proteinzusammensetzung für den positiven Effekt der miRNA auf die Translationseffizienz verantwortlich.

Im Fall der Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 müsste also untersucht werden, aus welchen Komponenten ein mit der HCV-5'-UTR interagierender miRNP-Komplex besteht und ob das Zusammenwirken von Ago-Proteinen mit anderen Komponenten für diesen Effekt verantwortlich ist. Da Ago 2 (eIF2C) ursprünglich als Aktivator der Translations-Initiation durch Stimulation der Bildung ternärer Komplexe identifiziert werden konnte (Roy et al., 1988), ist die Modulation der bisher bekannten miRNA-Funktion unter Beteiligung eines Argonaute-Proteins nicht auszuschließen und könnte Ursache für die in dieser Arbeit beobachtete verstärkte Bildung von 48S-Initiationskomplexen mit der HCV-RNA sein.

Im Gegensatz zu der m⁷G-Kappen-abhängigen Initiation der Translation einer mRNA erfolgt die Bindung der kleinen 40S-ribosomalen Untereinheit an die HCV-IRES unabhängig von dem Kappen-Bindekomplex eIF4F, bestehend aus den eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF4E, eIF4G und eIF4A (Lukavsky, 2009). Eine Studie aus 2001 konnte zeigen, dass die 40S-Untereinheit durch die HCV-IRES mit sehr hoher Affinität gebunden wird und dieser Komplex eine Dissoziationskonstante von $K_D = 2$ nM aufweist (Kieft et al., 2001). Dieses Ergebnis führt zu der Frage, wie die 40S-Untereinheit zum Start der Translations-Elongation von der IRES freigesetzt wird. Die miR-122 könnte einen zellulären Faktor darstellen, der durch Bindung an Zielsequenzen stromaufwärts der HCV-IRES möglicherweise im Komplex mit Proteinen die Affinität der HCV-IRES zur 40S-Untereinheit vermindert oder eine Konformationsänderung hervorruft. Dadurch könnten die Anlagerung der 60S-Untereinheit und der Übergang des 80S-Ribosoms in die Elongation beschleunigt und das IRES-Element für die Rekrutierung ribosomaler Untereinheiten schneller wieder verfügbar gemacht werden (Abb. 3.3). Diese Hypothese passt mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten kinetischen Analyse der Bildung von Translations-Initiationskomplexen mit der HCV-RNA zusammen. Innerhalb der ersten zwei Minuten des Initiationsvorganges konnte eine verstärkte Bildung von 48S-Komplexen mit der HCV-RNA in Anwesenheit der miR-122 demonstriert und im weiteren Zeitverlauf auch eine vermehrte Bildung von 80S-Ribosomen gezeigt werden.

Dass nicht nur die Bildung und Bindung eines Proteinkomplexes („ON“), sondern auch sein Loslösen von der Bindungsstelle („OFF“) und damit der Übergang zur Elongation entscheidend für die effiziente Initiation eines solchen Prozesses ist, bestätigt der Mechanismus der Initiation der Transkription eukaryotischer mRNA durch die RNA-Polymerase II (Dvir et al., 2001). Hier ist die Effizienz der Transkriptions-Initiation nicht nur abhängig von der Bildung eines Initiationskomplexes bestehend aus Polymerase und Transkriptions-Initiationsfaktoren an einer Erkennungssequenz auf der DNA, sondern auch die strukturelle Umwandlung dieses Komplexes, der das Verlassen des Promotors und den Übergang in die Elongation ermöglicht. Dieser auch als „Promoter escape“ bekannte Prozess stellt den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt bei der Initiation der Transkription dar.

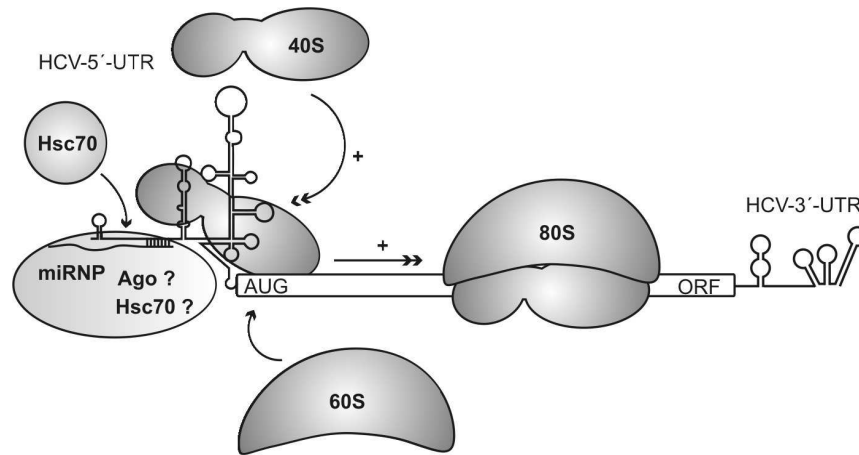


Abb. 3.3: Modell des Wirkmechanismus der miR-122 als positiver Regulator der HCV-Translation. Die miR-122 fördert durch Bindung an Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR das Loslösen der 40S-ribosomalen Untereinheit von der HCV-IRES und beschleunigt dadurch den Start der Translations-Elongation. Das schnellere Freiwerden der Initiationsstelle führt zur schnelleren Rekrutierung weiterer 40S-Untereinheiten, was in einer erhöhten Translationseffizienz der HCV-RNA resultiert. Unklar ist jedoch, ob an der Funktion der miR-122 Argonaute-Proteine (Ago) oder das mit der miR-122 interagierende Chaperon Hsc70 beteiligt sind. Die miR-122 könnte Hsc70 auch zur Re-Organisation des miRNP-Effektorkomplexes zur Stimulation der HCV-Translation rekrutieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bindung eines Proteins von etwa 68 kDa an die HCV-5'-UTR spezifisch durch die miR-122 inhibiert wird. Die verminderte Bindung des Proteins an die HCV-IRES beruht wahrscheinlich nicht auf der Verdrängung des Proteins durch die mit den beiden Zielsequenzen interagierende miR-122, da die Wildtyp-miR-122 auch die Bindung des Proteins an die HCV-RNA mit Mutationen in beiden miR-122-Zielsequenzen signifikant verminderte, wohingegen nur ein schwacher Effekt mit der mutierten miR-122 erreicht werden konnte. Wahrscheinlich bindet das Protein direkt an die miRNA mit leichter Sequenz-Präferenz für die Wildtyp-miR-122.

Das 68 kDa-Protein konnte mehrfach als Heat Shock Cognate 71 kDa Protein (Hsc70) identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit waren jedoch eine Verifizierung dieses Ergebnisses durch andere Identifizierungsmethoden sowie eine weitere Charakterisierung der Funktion dieses Proteins im Zusammenhang mit der Translationsstimulation der HCV-RNA durch die miR-122 aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich. Nach einer zuverlässigen Identifizierung dieses Proteins als Hsc70 müsste untersucht werden, ob die Bindung des Hsc70 an die miR-122 eine funktionelle Bedeutung hat und ob sie im Zusammenhang mit der miR-122-vermittelten Stimulation der HCV-Translation steht.

In einer Studie aus 2008 konnte die Interaktion des Chaperons Hsc70 mit der Domäne III der HCV-IRES in cytoplasmatischem Extrakt der Nicht-Leberzelllinien HeLa oder BHK-21 gezeigt werden (Pacheco et al., 2008). Die Domäne III vermittelt die Interaktion des 43S-Initiationskomplexes mit

der HCV-IRES durch direkte Bindung der 40S-ribosomalen Untereinheit, unterstützt durch die Bindung von eIF3. Die Bindung des Hsc70 findet also an einer für die Translations-Initiation an der HCV-IRES absolut notwendigen Domäne statt. Es ist also vorstellbar, dass Hsc70 durch Interaktion mit der miR-122 an der HCV-IRES zu der in dieser Arbeit detektierten verstärkten und beschleunigten Bildung von 48S-Initiationskomplexen führt (Abb. 3.3). Die miR-122 könnte die Interaktion mit Hsc70 aber auch zur Re-Modellierung/Re-Organisation eines miRNP-Effektorkomplexes an der HCV-IRES nutzen, die anstatt der Repression der HCV-RNA ihre verstärkte Translation herbeiführt. Die Theorie von einer funktionellen Relevanz des Hsc70 bei der Stimulation der HCV-Translation wird durch Studien unterstützt, in denen die Rekrutierung von Komponenten des zellulären Chaperon-Netzwerkes zur effizienten Virusvermehrung gezeigt werden konnte (zusammengefasst in Mayer, 2005). So ist zum Beispiel ein Hsp70-Chaperon-Komplex für die Genom-Replikation des humanen Papillomavirus essentiell, indem der Chaperon-Komplex durch Re-Modellierung der Proteinkomponenten des Replikations-Komplexes die effiziente Initiation der viralen Genom-Replikation ermöglicht.

3.4 Beitrag der microRNA-122 zur Gewebespezifität des Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus hat eine enge Wirts- und Gewebespezifität und repliziert vorwiegend in humanen Hepatocyten (Lauer und Walker, 2001). Die Anpassung eines Virus an eine Zellspezies resultiert aus der zellulären Ausstattung. Der erste Schritt einer Infektion ist die Adsorption des Virus an die Zelle und ihre anschließende Penetration. Daher beruht das Infektionsspektrum eines Virus meist auf dem Vorhandensein bestimmter Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Im Falle des HCV ist die Expression mehrerer Rezeptoren auf der Zelloberfläche für eine erfolgreiche Infektion notwendig. Es konnten CD81, SR-B1 (Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1) Claudin1, Occludin und der LDL (*low density lipoprotein*)-Rezeptor als potentielle Rezeptoren identifiziert werden (Poumbourios und Drummer, 2007) (Abb. 3.4). Da diese Rezeptoren jedoch von Zellen verschiedener Gewebe exprimiert werden, kann der Gewebetropismus des HCV nicht ausschließlich auf dem Vorhandensein bestimmter Rezeptoren beruhen (Perrault und Pécheur, 2009). Da HCV-Virionen außerhalb der Zelle mit Lipoprotein-Partikeln assoziiert sind und die Bildung und Freisetzung infektiöser Viren von der hepatocytären Bildung und Sekretion von Cholesterin in Form von VLDL (*very low density lipoprotein*) und LDL abhängig ist (Huang et al., 2007a), leistet der Lipidmetabolismus der Leber wahrscheinlich einen wichtigen Beitrag zur Gewebespezifität des HCV. Da HCV oft zu einer lang anhaltenden persistierenden Infektion führt, ist die Leberspezifität des Virus wahrscheinlich auch von der spezifischen Protein- beziehungsweise miRNA-Ausstattung von Hepatocyten abhängig.

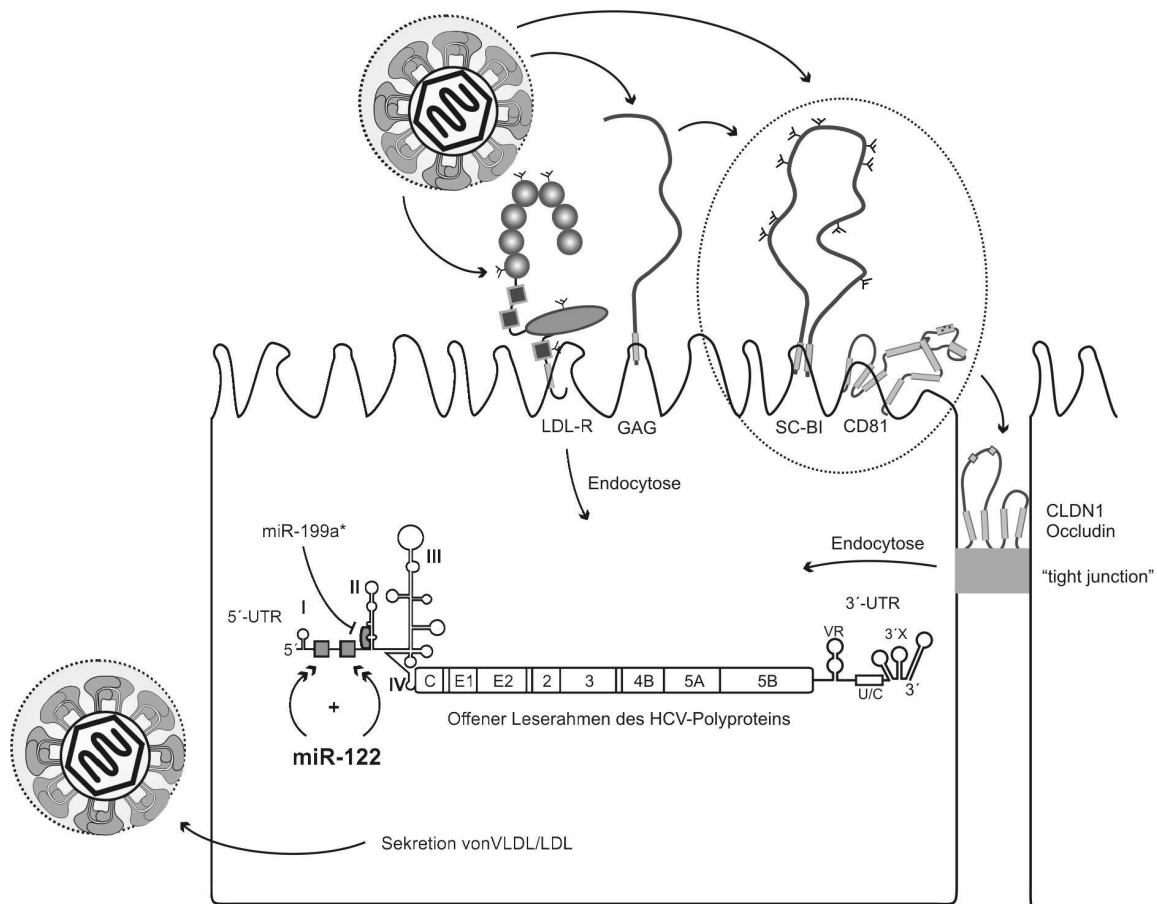


Abb. 3.4: Faktoren, die zum Gewebetropismus des HCV beitragen. Die Adsorption des HCV-Partikels an die Oberfläche der polaren Hepatocyte erfolgt durch Interaktion mit dem LDL (*low density lipoprotein*)-Rezeptor, dem Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I (SC-BI) oder mit Glucosaminoglycanen (GAG). Die Aufnahme erfolgt durch Rezeptor-vermittelte Endozytose direkt über den LDL-Rezeptor oder durch Weitergabe an CD81 und der „tight junction“-Proteine Claudin 1 (CLDN1) beziehungsweise Occludin. Die IRES-vermittelte Translation und Replikation der viralen RNA wird durch die spezifisch in Hepatocyten stark exprimierte miRNA-122 verstärkt. Gleichzeitig wird die Amplifikation des HCV-Genoms durch die miRNA-199a* reprimiert. Da die miR-199a* im Vergleich zu anderen Geweben in nur sehr geringem Maße exprimiert wird, könnte sie dadurch indirekt zur Leberspezifität des HCV beitragen. Der Zusammenbau und die Freisetzung des Virus ist von der hepatocytären Bildung und Sekretion von Lipoprotein-Partikeln (*very low density lipoprotein*, VLDL; *low density lipoprotein*, LDL) abhängig. Modifiziert nach Burlone und Budkowska, 2009; Niepmann, 2009b, Pombourios und Drummer, 2007.

Da die miR-122 in hohem Maße in der Leber exprimiert wird (Landgraf et al., 2007) und die Translation und dadurch auch die Akkumulation der HCV-RNA stimuliert, könnte sie zum Gewebetropismus des HCV einen entscheidenden Beitrag leisten. Die Analyse verschiedener Zelllinien ergab, dass die miR-122 etwa 70 % der miRNA-Population in ausdifferenzierten humanen Hepatocyten ausmacht (135.000 Kopien/Zelle) und auch in der humanen Hepatomazelllinie Huh7 in verhältnismäßig großer, wenn auch stark reduzierter Menge detektierbar ist (Lagos-Quintana et al., 2002; Chang et al., 2004). In der humanen Hepatomazelllinie HepG2 hingegen ist die miR-122 in nur sehr geringen Mengen (< 140 Kopien/Zelle) nachweisbar. Im Zusammenhang mit dem Beitrag der miR-122 zum Gewebetropismus des HCV stimmt die Expressionsstärke der miR-122 in den verschiedenen Zelllinien mit der Beobachtung überein, dass die Amplifikation des HCV-Genoms und auch die Aktivität der HCV-IRES in HepG2-Zellen im Vergleich zu Huh7-Zellen stark reduziert war

(Date et al., 2004; Song et al., 2006) und erst die Fusion einer HepG2-Zelle mit einer primären Hepatocyte eine effiziente Replikation möglich machte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Translations- und Replikationseffizienz des HCV in der Zelllinie HeLa, die keine endogene miR-122 enthält, stark reduziert war (Zhu et al., 2003; Song et al., 2006). Die beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Abwesenheit der miR-122 in bestimmten Zelllinien die Translation und Replikation der HCV-RNA anscheinend erheblich einschränkt. Damit einhergehend konnte in zwei voneinander unabhängigen Studien die HCV-RNA-Replikation in HEK-293-Zellen und die HCV-Translation in HeLa-Zellen durch von außen zugeführte synthetische miR-122 stimuliert werden (Chang et al., 2008; Henke, Goergen et al., 2008). Diese Daten untermauern die Hypothese, dass die leberspezifische miR-122 einen entscheidenden Beitrag zur Leberspezifität des HCV leistet.

Im obigen Zusammenhang konnten Murakami und Ko-Autoren zeigen, dass die Amplifikation des HCV-Genoms durch Interaktion der miR-199a* mit konservierten, komplementären Sequenzen im Stem-Loop II der HCV-5'-UTR negativ reguliert wird (Murakami et al., 2009). Ein möglicher Einfluss der miR-199a* auf die HCV-Translation wurde in dieser Studie nicht untersucht. Da der Stem-Loop II der HCV-5'-UTR sowohl für die Translation als auch für die Replikation der viralen RNA notwendig ist (Friebe et al., 2001; Rijnbrand et al., 1995), ist die Regulation der HCV-Translation durch die miR-199a* allerdings nicht auszuschließen. Auffallend ist, dass die miR-199a* in vielen Geweben exprimiert wird, in der Leber dagegen nur in besonders geringem Maße (Barad et al., 2004; Liang et al., 2007). Die miR-199a* könnte somit durch die verhältnismäßig geringe Repression der HCV-RNA-Replikation in Hepatocyten im Vergleich zu anderen Zelltypen indirekt zum Gewebetropismus des HCV beitragen (Pietschmann, 2009).

3.5 Ansätze zur Therapie der Hepatitis C Virus-Infektion durch Inhibition der microRNA-122

Eine Infektion mit HCV ist weltweit die Hauptursache einer chronischen Hepatitis, einer Leberzirrhose oder eines hepatozellulären Karzinoms. Die zurzeit verfügbare Therapie mit pegyliertem Interferon- α (pegIFN- α) in Kombination mit Nukleosid-Inhibitoren der viralen RNA-Polymerase (Ribavirin) ist jedoch nur in etwa 50 % der Fälle erfolgreich. Bei den auf die IFN-Therapie nicht ansprechenden Patienten konnte eine schon vorhandene maximale Expression Interferon-regulierter Gene und eine damit einhergehende maximal induzierte IFN-Antwort festgestellt werden (Sarasin-Filipowicz et al., 2009). Bei diesen Patienten war die Anzahl der miR-122-Kopien pro Zelle im Gegensatz zu den auf die IFN-Therapie ansprechenden Patienten signifikant herabgesetzt, was für eine negative Korrelation des miR-122-Levels und der IFN-Expression spricht. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, dass die IFN-gesteuerte Modulation der zellulären miRNA-Expression einen antiviralen Mechanismus darstellt (Pedersen et al., 2007).

In einer Studie aus 2007 konnte durch die Behandlung HCV-infizierter Schimpansen mit Polymerase-Inhibitoren gezeigt werden, dass die Aktivität und die Vermehrung der viralen RNA effizient vermindert wurde, die HCV-Klone jedoch innerhalb von zwei Tagen Resistenzmutationen entwickelten (Chen et al., 2007). Da die miR-122 offensichtlich eine wichtige Rolle bei der HCV-Infektion spielt und ihre Zielsequenzen zwischen allen Isolaten eines sich durch eine hohe Mutationsrate auszeichnenden Virus konserviert sind, stellt die miR-122 einen potentiellen Angriffspunkt im Rahmen einer antiviralen Therapie dar.

Einen ersten erfolgreichen Versuch einer solchen HCV-Therapie chronisch infizierter Schimpansen basierend auf der Sequenz-spezifischen Inhibition der endogenen miR-122 konnte die Gruppe um Henrik Orum erzielen (Lanford et al., 2010). Nach einer zwölfwöchigen Behandlung der Schimpansen mit zu der miR-122 komplementären LNA (*locked nucleic acid*)-Oligonukleotiden (SPC3649) wurde eine Dosis-abhängige signifikante Reduktion des HCV-Titers nachgewiesen, die für etwa zwei Monate nach der letzten Behandlung anhielt. Die Sequenzierung der 5'-untranslatierten Region der HCV-RNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Behandlung ergab, dass die konservierten Sequenzen der miR-122-Zielsequenzen stabil blieben und sich keine adaptiven Mutationen angereichert hatten. Damit ging die Normalisierung der Expression IFN-regulierter Gene einher, woraus geschlossen wurde, dass SPC3649 in Kombination mit IFN- α zur Therapie von Patienten angewendet werden kann, die aufgrund hoher basaler IFN-Level nicht auf eine IFN-basierende Therapie reagieren. Eine Kombinationstherapie basierend auf der Inhibition der endogenen miR-122, die sich durch eine hohe Wirksamkeit und Resistenzbarriere auszeichnet, eröffnet somit neue Möglichkeiten bei der Behandlung von HCV-Infektionen. Die Inhibition der miR-122 durch das Gegenstrang-LNA-Oligonukleotid ging allerdings auch mit der Verminderung der Cholesterolverwerte des Blutplasmas einher. Es konnte ein erheblicher Rückgang von LDL (*low density lipoprotein*)-Partikeln und ihrer Hauptkomponente, dem Apolipoprotein Apo-B, beobachtet werden. Da die Infektion einer Zelle mit HCV und die Freisetzung infektiöser Viruspartikel auch von Lipoprotein-Partikeln abhängig sind, könnte die Reduktion des HCV-Titers auch im Zusammenhang mit der verminderten Synthese von LDL-Partikeln stehen.

Mit diesen Beobachtungen gehen die Ergebnisse zwei unabhängiger Studien einher, in denen bereits gezeigt werden konnte, dass die miR-122 ein wichtiger Regulator des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels der Leber ist (Krützfeld et al., 2005; Esau et al., 2006). Dabei konnten vor allem mRNAs von Komponenten des Leberkatabolismus, zum Beispiel Fructose-1,6-Aldolase A oder Citrat-Synthase identifiziert werden, die durch die miR-122 negativ reguliert werden. Im Gegensatz dazu wurden vor allem Schlüsselenzyme des Cholesterol- und Fettsäuremetabolismus identifiziert, zum Beispiel Fettsäure-Synthase oder Phosphomevalonat-Kinase, deren Expression durch die miR-122 hoch reguliert wird. Daher kam die Überlegung auf, die Inhibition der miR-122 auch für die Therapie von Lebersteatose oder kardiovaskulären Erkrankungen zu nutzen.

Allerdings ist die miR-122 für die Etablierung eines bestimmten Genexpressionsmusters zur Aufrechterhaltung des Phänotyps der adulten Leber notwendig und ist weniger in frühen Differenzierungsstadien involviert (Chang et al., 2004). Mit dem Eingriff in die zelluläre posttranskriptionelle Genregulation durch die therapeutische Inhibition der miR-122 zur Behandlung von HCV-Infektionen oder metabolischer beziehungsweise kardiovaskulärer Erkrankungen sind somit wahrscheinlich auch nicht absehbare Risiken verbunden. So konnte zum Beispiel die reduzierte Expression der miR-122 mit der Disregulation der Expression des Zellzyklus-steuernden Proteins Cyclin G1 in Zusammenhang gebracht werden, die wiederum vermutlich ursächlich an der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms beteiligt ist (Gramantieri et al., 2007). Die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms als Folge einer chronischen HCV-Infektion ist aber vermutlich nicht auf das Abfangen der miR-122 für die effektive Translation der HCV-RNA zurückzuführen. Es scheint relativ unwahrscheinlich, dass etwa 5.000 replizierende HCV-Genome (Dahari et al., 2007) für die Sequestrierung von ungefähr 135.000 Kopien der miR-122 (Chang et al., 2004) und eine dadurch eingeleitete De-Differenzierung der Hepatocyten verantwortlich sein können. Da sich der HCV-Infektionszyklus in vielen Bereichen auf den Metabolismus der Leber auswirkt, zum Beispiel die Ansammlung intrazellulärer Fetttropfen zur effizienten HCV-RNA-Replikation oder die Interaktion von HCV-Proteinen mit Komponenten der intrazellulären Insulin-Signalkaskade (Del Campo und Romero-Gómez, 2009), scheint die bei HCV-Patienten zu beobachtende reduzierte Expression der miR-122 (Sarasin-Filipowicz et al., 2009) und die darauf folgende Entwicklung eines De-Differenzierungsstadiums eher eine indirekte Folge einer HCV-Infektion zu sein.

3.6 Fazit

Die leberspezifische miR-122 ist essentiell für den Replikationszyklus des HCV, indem sie durch direkte Interaktion mit zwei zwischen allen HCV-Genotypen hoch konservierten Sequenzen in der HCV-5'-UTR die Translation und eventuell auch die Replikation der viralen RNA in der Zelle stimuliert. In Kombination mit anderen Faktoren leistet sie dabei wahrscheinlich einen entscheidenden Beitrag zur Gewebespezifität des HCV und macht es zu einem hepatotropen Virus. Durch ein besseres Verständnis der Rolle der miR-122 für die HCV-Infektion eröffnen sich auch neue Möglichkeiten im Bereich ihrer Therapie. Die Tatsache, dass die miR-122 als positiver Regulator auf die 5'-UTR des HCV wirkt, steht im Gegensatz zu den bisher beschriebenen miRNA-Funktionen durch Bindung an Sequenzen in der 3'-UTR der Ziel-mRNAs und zeigt, dass die molekularen Wirkmechanismen von miRNAs weitaus vielfältiger sind als bisher angenommen. Welcher molekulare Mechanismus der Stimulation der HCV-Translation als erstem Schritt der HCV-Vermehrung nach dem Eintritt in die Zelle zugrunde liegt, ist bisher noch unklar und erfordert weitere Studien besonders zur Identifizierung von beteiligten Proteinkomponenten.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Bakterienstamm und Zelllinien

Bakterienstamm

E. coli XL1-blue (Stratagene)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r)]

Die fehlende Endonukleaseaktivität (EndA) ermöglicht die Präparation von Plasmid-DNA mit sehr hoher Qualität. Die fehlende Rekombinationsaktivität (recA) erhöht die Stabilität des Inserts. Die Mutation *hsdR* schützt die einklonierte DNA vor dem Zerschneiden durch das *EcoK*-Endonukleasesystem. Der Bakterienstamm trägt zur Selektion eine Antibiotikaresistenz gegen Tetracyclin.

Zelllinien

naive Huh7 humane Hepatomazellen (R. Bartenschlager, Heidelberg)

HeLa humane negroide cervikale karzinome Zellen (ECACC, No. 93021013)

4.1.2 Zellextrakte

Kaninchen-Retikulozytenlysate (RRL)

Promega, Mannheim

Cytoplasmatisches HeLa-Zellextrakt

B. Kastner, Göttingen; Cilbiotech, Belgien

Cytoplasmatisches Huh7-Zellextrakt

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt.

4.1.3 Materialien für die Zellkultur

DMEM

Invitrogen, Karlsruhe

Phenolrot-freies DMEM

Invitrogen, Karlsruhe

DMSO

Merck, Darmstadt

FBS

Invitrogen, Karlsruhe

100 x Penicillin/Streptomycinlösung

Invitrogen, Karlsruhe

(10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)

10 x Trypsin-EDTA

Invitrogen, Karlsruhe

(0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA)

Gewebekulturflaschen (25 cm², 75 cm²)

Greiner Bio-one, Essen

Zellkulturschalen (150 mm x 25 mm)

Corning, Niederlande

Mikrotiterplatten (6-,12-, 24-, 96-well)

Greiner Bio-one, Essen

Plastikpipetten (Falcon®)

BD Biosciences, Heidelberg

4.1.4 Plasmide

Tab. 4.1: Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide.

Bezeichnung	Eigenschaften	Konstruiert von
pHCV-FLuc-3'-UTR	T7-Promotor, HCV-5'-UTR, HCV-Core-Protein (Nukleotide 342 - 606), Ubiquitin-Sequenz, FLuc-Reportergen, HCV-3'-UTR	Y. Song, (pHCV-CLX-CMV)
pHCV-Δ3b	wie pHCV-FLuc-3'-UTR Deletion der 5'-UTR-Region IIIb	Y. Song
pHCV-FLuc-5mut1	wie pHCV-FLuc-3'-UTR 1. miR-122-Zielsequenz der 5'-UTR ist mutiert ACACUCC → CGCGGAA	C. Jünemann, (pHCV-CLX-CMV 5mut1)
pHCV-FLuc-5mut2	wie pHCV-FLuc-3'-UTR 2. miR-122-Zielsequenz der 5'-UTR ist mutiert CACUCC → GCGGAA	J. I. Henke (pHCV-CLX-CMV 5mut2)
pHCV-FLuc-5mut1,2	wie pHCV-FLuc-3'-UTR beide miR-122-Zielsequenzen der 5'-UTR sind mutiert (s. oben)	J. I. Henke, (pHCV-CLX-CMV 5mut1,2)
pHCV-FL	T7-Promotor, HCV-5'-UTR, HCV-Core-Protein (Nukleotide 342 - 374), FLuc-Reportergen, HCV-3'-UTR	C. Jünemann
pHCV-SIN wt	T7-Promotor, HCV-5'-UTR, HCV-Core-Protein (Nukleotide 342 – 402), 35 Nukleotide des FLuc-Reportergens, HCV-3'-UTR	Y. Song, (pHCV-wt+wt in frame)
pHCV-SIN 5mut1,2	wie pHCV-SIN wt beide miR-122-Zielsequenzen der 5'-UTR sind mutiert (s. oben)	J. I. Henke
pM12	SP6-Promotor, FMDV-IRES, FLuc-Reportergen, reverser T7-Promotor	K. Ochs
pD5	SP6-Promotor, FLuc-Reportergen	M. Niepmann
pmiR-122_BsmAI	T7-Promotor, Sequenz Hammerhead-Ribozym, Sequenz miR-122, Schnittstelle BsmAI, reverser T3-Promotor	J. I. Henke/ ATG-Biosynthetics
pmiR-122mut_BsaI	T7-Promotor, Sequenz Hammerhead-Ribozym, Sequenz mutierte miR-122, Schnittstelle BsaI, reverser T3-Promotor	J. I. Henke/ ATG-Biosynthetics
pmiR-124_BsmAI	T7-Promotor, Sequenz Hammerhead-Ribozym, Sequenz miR-124, Schnittstelle BsmAI, reverser T3-Promotor	J. I. Henke/ ATG-Biosynthetics
ph-anti-GAPDH	T7-Promotor, antisense Sequenz GAPDH (Sonde zur Northern Blot-Analyse von zellulärer GAPDH-RNA)	J. I. Henke
pM12-FLuc	SP6-Promotor, FMDV-IRES, Teil des FLuc-Reportergens, reverser T7-Promotor (Sonde gegen FLuc zur Northern Blot-Analyse der HCV-Reporter-RNAs)	Y. Song
phRL-null	T7-Promotor, RLuc-Reportergen	Promega

4.1.5 Nukleotide

4.1.5.1 Nicht radioaktive Nukleotide

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roth, Karlsruhe
Ribonukleosidtriphosphate (rNTPs)	Roth, Karlsruhe
Ribo m ⁷ G Cap Analog (m ⁷ G (5') ppp (5') G)	Promega, Mannheim
DIG-UTP (Digoxigenin-11-UTP)	Roche, Mannheim

4.1.5.2 Radioaktive Nukleotide

[α- ³² P]-UTP	800 Ci/mmol, 10 mCi/ml	Perkin Elmer, USA
[γ- ³² P]-rATP	3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml	Perkin Elmer, USA

4.1.6 Oligonukleotide

4.1.6.1 DNA-Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide zur Klonierung, Sequenzierung und Generierung kurzer DNA-Matrizen zur *in vitro* Transkription wurden von biomers.net (Ulm) bezogen.

Tab. 4.2: Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Orientierung	Verwendung
HCMV-4986_for	CCA ATA GGC CGA AAT CGG CAA AAT CCC	sense	Generierung von Matrizen der Plasmidreihe pHCV-SIN
wt for	TTA ATA CGA CTC ACT ATA GCC AGC C	sense	Generierung von Matrizen der Plasmidreihe pHCV-FLuc
newmut1	AGC CCC CGA TTG GGG GCG CGC GGA AAC CAT AGA TCA CTC CCC TG	sense	Generierung von Matrizen des Plasmids pHCV-FLuc-3'-UTR durch PCR-Mutagenese (HCV-5mut1)
newmut2	AGC CCC CGA TTG GGG GCG ACA CTC CAC CAT AGA TGC GGA ACC TGT GAG GAA CTA CTG TC	sense	Generierung von Matrizen des Plasmids pHCV-FLuc-3'-UTR durch PCR-Mutagenese (HCV-5mut2)
newmut1,2	AGC CCC CGA TTG GGG GCG CGC GGA AAC CAT AGA TGC GGA ACC TGT GAG GAA CTA CTG TC	sense	Generierung von Matrizen des Plasmids pHCV-FLuc-3'-UTR durch PCR-Mutagenese (HCV-5mut1,2)
T7-HCV	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GCC AGC CCC CGA TTG GGG GCG	sense	Generierung von Matrizen des Plasmids pHCV-FLuc-3'-UTR durch PCR-Mutagenese (HCV-5mut)
3x-rev_5Mut_1	ACA TGA TCT GCA GAG AGG CCA GTA TCA GCA CTC TCT GCA GTC ATG CGG CTC ACG G	antisense	Generierung von Matrizen des Plasmids pHCV-FLuc-3'-UTR durch PCR-Mutagenese (HCV-5mut)
3X-rev	ACA TGA TCT GCA GAG AGG CCA G	antisense	Generierung von Matrizen der Plasmidreihen pHCV-FLuc/pHCV-SIN mit 3'-UTR
HCMV-Luc-rev	TTC ACA ATT TGG ACT TTC CGC CC	antisense	Generierung von Matrizen der Plasmidreihen pHCV-FLuc/pHCV-SIN ohne 3'-UTR
HCV-NdeI-for	GGC AGT ACA TCA AGT GTA TCA TAT GC	sense	Klonierung pHCV-FLuc-5mut1
Mut-seed1-rev	TTC CGC GCG CCC CCA ATC G	antisense	Klonierung pHCV-FLuc-5mut1
Mut-seed1-for	CGC GGA AAC CAT AGA TCA CTC CCC TGT GAG	sense	Klonierung pHCV-FLuc-5mut1
HCV-BlpI-rev	CAA GGG TAC CCG GGC TGA G	antisense	Klonierung pHCV-FLuc-5mut1
HCV-NdeI-for-neu	C TT GGC AGT ACA TCA AGT GTA TCA TAT GCC AAG	sense	Klonierung pHCV-FLuc-5mut2 und pHCV-FLuc-5mut1,2
HCV-590-596-rev	CCA AGG GTA CCC GGG CTG AGC C	antisense	Klonierung pHCV-FLuc-5mut2 und pHCV-FLuc-5mut1,2
Mut-seed2-for-neu	ATG CGG AAC CTG TGA GGA ACT ACT GTC TTC AC	sense	Klonierung pHCV-FLuc-5mut2 und pHCV-FLuc-5mut1,2
HCV-1wt2mut-rev	TTC CGC ATC TAT GGT GGA GTG TCG C	antisense	Klonierung pHCV-FLuc-5mut2
Mut-seed2-rev-neu	GGT TCC GCA TCT ATG GTT TCC GCG CGC CC	antisense	Klonierung pHCV-FLuc-5mut1,2
Seq-HCV-new	GGG ACT TTC CAT TGA CGT C	sense	Sequenzierung pHCV-FLuc

Seq-HCV-rev	CTC GAT GGT GTC ACT GGG CTC	antisense	Sequenzierung pHCV-FLuc
Seq-HCVSIN-mut-for	GGT CGA GGT GCC GTA AAG C	sense	Sequenzierung pHCV-SIN-5mut1,2

Digoxigenin-markierte DNA-Oligonukleotide zur Northern Blot-Analyse wurden von der Firma Thermo Electron (Ulm) bezogen.

Tab. 4.3: Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Digoxigenin-markierten DNA-Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Markierung	Verwendung
mi-122 probe	ACA AAC ACC ATT GTC ACA CTC CA	5' -/ 3' - Digoxigenin	Sonde gegen miR-122
hra-U6 probe	GCA GGG GCC ATG CTA ATC TTC TCT GTA TCG	5' -/ 3' - Digoxigenin	Sonde gegen U6 snRNA

4.1.6.2 RNA-Oligonukleotide

RNA-Oligonukleotide wurden bezogen von biomers.net (Ulm) und Purimex (Greibenstein). Die RNA-Oligonukleotide anti-miR-122, anti-miR-122mu und anti-miR-124 wurden 2'-O-methyliert geliefert. RNA-Duplexe wurden geformt zwischen miR-122-mat und miR-122*, miR-122mu-mat und miR-122mu*, sowie zwischen miR-124-mat und miR-124*. Die RNA-Oligonukleotide waren an ihrem 5'-Ende phosphoryliert.

Tab. 4.4: Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten RNA-Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
anti-miR-122	AGA CAC AAA CAC CAU UGU CAC ACU CCA CAG C
anti-miR-122mu	ACA AAC ACC AUU GUC CGC GGA AA
anti-miR-124	UGG CAU UCA CCG CGU GCC UUA A
miR-122-mat	UGG AGU GUG ACA AUG GUG UUU G (U)
miR-122*	(A) AAC GCC AUU AUC ACA CUA AAU A
miR-122mu-mat	UUU CCG CGG ACA AUG GUG UUU G
miR-122mu*	AAC GCC AUU AUC CGC GGC CAU A
miR-124-mat	UUA AGG CAC GCG GUG AAU GCC A
miR-124*	GUG UUC ACA GCG GAC CUU GAU U

4.1.7 Enzyme

4.1.7.1 Restriktionsendonukleasen

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach) und Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Die Reaktionen wurden entsprechend den Protokollen der Hersteller durchgeführt.

4.1.7.2 Andere Enzyme

Die für die enzymatischen Reaktionen verwendeten Puffer wurden von den enzymliefernden Firmen bezogen.

Enzym	Konzentration	Firma
GoTaq®Flexi DNA-Polymerase	5 U/μl	Promega, Mannheim
T7-RNA-Polymerase	20 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
T3-RNA-Polymerase	20 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
SP6-RNA-Polymerase	20 U/μl	New England Biolabs, Schwalbach
T4-DNA-Ligase	400 U/μl	New England Biolabs, Schwalbach
T4-Polynukleotid-Kinase	10 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
Alkaline Phosphatase, shrimp	1 U/μl	Roche, Mannheim
Proteinase K	10 μg/μl	Merck, Darmstadt
Poly(A)-Polymerase	750 U/μl	USB Corporation, Staufen
RNase A	10 μg/μl	Roche, Mannheim

4.1.8 Größenstandards

4.1.8.1 DNA-Größenstandard

HyperLadder I	Bioline, Luckenwalde 10.000 bp, 8.000 bp, 6.000 bp, 5.000 bp, 4.000 bp, 3.000 bp, 2.500 bp, 2.000 bp, 1.500 bp, 1.000 bp, 800 bp, 600 bp, 400 bp, 200 bp
---------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

4.1.8.2 RNA-Größenstandard

Decade™ Marker System	Ambion, USA 100 nt, 90 nt, 80 nt, 70 nt, 60 nt, 50 nt, 40 nt, 30 nt, 20 nt, 10 nt
-----------------------	--------------------------------------------------------------------------------------

4.1.8.3 Protein-Größenstandards

PAGE Ruler™	Fermentas, St. Leon-Rot 170 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 26 kDa, 17 kDa, 10 kDa (Prestained)
Methyl- ¹⁴ C-Proteinmarker	GE Healthcare, München 220 kDa, 97,4 kDa, 69 kDa, 43 kDa, 30 kDa, 14,3 kDa
Methyl- ¹⁴ C-Proteinmarker	Perkin Elmer, USA 97,4 kDa, 69 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 30 kDa, 12,3 kDa

4.1.9 Kits

GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, München
DIG Luminescent Detection Kit	Roche, Mannheim
Mini Quick RNA Spin Columns	Roche, Mannheim
miRVana™ miRNA Isolation Kit	Ambion, USA
NucleoBond® AX 100	Macherey-Nagel, Düren
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Wizard® Plus SV Minipreps	Promega, Mannheim
Illustra NAP™ – 5 Columns	GE Healthcare, München

4.1.10 Spezielle Chemikalien und Reagenzien

Mono-/Bisacrylamidlösung (29:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Anisomycin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
APS	Serva, Heidelberg
Coelenterazin	Synchem OHG, Felsberg
Coomassie-Brilliant-Blue R-250	Serva, Heidelberg
Cycloheximid	Merck, Darmstadt
GMP-PNP	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Koenzym A	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Luziferin	Promega, Mannheim
Proteaseinhibitor, Complete EDTA-free	Roche, Mannheim
Sephadex G-25	GE Healthcare, München
TEMED	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Transfer-RNA (tRNA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

4.1.11 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Beckmann J2-21, Rotoren JA 14, JA 20	Beckman Instruments, USA
CO ₂ -Inkubator Serie CB	Binder GmbH, Tuttingen
Elektroporator, Easyject Prima	Equibio, England
Elektroporator, GenePulser Xcell	Biorad, München
Geldokumentationssystem, GelDoc XR	Biorad, München
Geltrockner, Gel Dryer 583	Biorad, München
Hera Safe Sterilbank	Heraeus, Hanau

Minigelsystem	AGS, Heidelberg
Minigelkammern	von Keutz, Reiskirchen
Netzgerät EPS 500/400	Pharmacia LBK, Freiburg
Kontaminationsmonitor, LB 124	Berthold, Bad Wildbad
Luminometer, Lumat LB9507	Berthold, Bad Wildbad
Luminometerröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme, Kodak X-omat XAR	Eastman Kodak, USA
Röntgenfilmentwickler und -fixierer	Agfa, Köln
Szintillations-Zähler, Tri-Carb 1500	Packard, Australien
Thermocycler, TProfessional	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge, Optima LE-80K, Rotor SW40	Beckman Instruments, USA
Ultrazentrifugenröhrchen, UltraClearTubes (14 x 95 mm)	Beckman Instruments, USA

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien, Reagenzien und Materialien wurden von den Firmen Boehringer Ingelheim, Invitrogen, Merck, Qiagen, Roche, Roth, Sarstedt und Sigma-Aldrich bezogen.

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Gelelektrophorese

4.2.1.1.1 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Auftrennung und Identifizierung von DNA- und RNA-Fragmenten, sowie zur Abschätzung ihrer Integrität und Menge wurden 1 – 2 % Agarosegele verwendet. Zu 1 µl der Nukleinsäurelösung wurden 2 µl 1:5 verdünnter Probenpuffer (75 % Glycerol, 50 mM EDTA, 2 mg/ml Bromphenolblau, 4 mg/ml Xylencyanol) gegeben, um die Dichte der Nukleinsäurelösung zu erhöhen und damit ein Absinken in die Geltasche zu ermöglichen. Die Elektrophorese erfolgte bei 230 mA für etwa 20 min in TAE-Puffer (40 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl pH 8,3). Im Anschluss wurden die Nukleinsäurebanden durch Färbung mit Ethidiumbromid (2 µg/ml in TAE-Puffer) sichtbar gemacht. Zur Trennung spezifischer DNA-Banden von anderen DNA-Banden wurden präparative Agarosegele angefertigt und die DNA-Bande von Interesse nach Anfärben mit Ethidiumbromid unter UV-Licht knapp und schnell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Zur Isolation der DNA aus Agarose wurde das GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

4.2.1.1.2 Denaturierende Agarosegel-Elektrophorese

Für den Kapillar-Transfer von RNA zur Northern Blot-Analyse wurden die RNA Proben zunächst unter denaturierenden Bedingungen über ein 1,5 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde die RNA mit insgesamt einem Volumen denaturierendem Probenpuffer (6 % Formamid, 2,3 % Glycerol, 0,5 % Formaldehyd, 80 mM MOPS, 20 mM Na-Acetat, 4 mM EDTA pH 7,0) und nativem Probenpuffer (75 % Glycerol, 50 mM EDTA, 2 mg/ml Bromphenolblau, 4 mg/ml Xylencyanol) versetzt, für 5 min bei 70 °C inkubiert, 2 min auf Eis abgekühlt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 mA für etwa 60 min in denaturierendem Laufpuffer (20 mM MOPS, 5 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, 0,74 % Formaldehyd pH 7,0).

4.2.1.1.3 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Kontrolle der Integrität radioaktiv markierter RNA und Abschätzung des erfolgten Einbaus radioaktiv markierter Nukleotide wurden denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Zu 1 µl der Nukleinsäurelösung wurden 3 µl denaturierendem Probenpuffer (80 % Formamid, 50 mM EDTA, 1 mg/ml Bromphenolblau, 2 mg/ml Xylencyanol) gegeben, erhitzt und auf 6- oder 15 % Polyacrylamidgele mit 7 M Harnstoff aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TBE-Puffer (90 mM Tris-Borat, 2,5 mM EDTA pH 8,3) bei 25 mA/Gel. Anschließend wurde das Gel in Frischhaltefolie eingeschlagen und die radioaktive RNA mittels Autoradiographie nachgewiesen.

4.2.1.2 Reinigung, Fällung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

4.2.1.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* XL-1 blue wurde in großem Maßstab aus 100 ml Übernachtskultur unter Verwendung des Kits NucleoBond® AX 100 (Macherey-Nagel) und in kleinem Maßstab aus 1,5 ml Übernachtskultur unter Verwendung des Kits Wizard® Plus SV Minipreps (Promega) nach den Protokollen der Hersteller durchgeführt.

Mit beiden Kits werden die Bakterienzellen unter alkalischen Bedingungen lysiert, wobei sowohl die chromosomale als auch die Plasmid-DNA denaturiert. Durch die Neutralisierung mit Kaliumacetat präzipitieren die chromosomale DNA und andere Zellbestandteile, wohingegen die Plasmid-DNA renaturiert und in Lösung bleibt. Nach einer Zentrifugation wird der Überstand auf eine Affinitätssäule geladen. Bei hohen Salzkonzentrationen und niedrigem pH bindet die Plasmid-DNA an die Matrix der Säule und wird anschließend mit TE-Puffer (0,1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8,0) oder ddH₂O von der Säule eluiert und durch Zugabe von Isopropanol gefällt.

4.2.1.2.2 Proteinase K-Verdau

Proteinase K gehört zu den Serinproteasen und besitzt endo- und exoproteolytische Aktivität. Stimuliert durch Calcium (1 - 5 mM) und einen pH-Wert von 7,5 – 8,0, verdaut das Enzym Proteine bevorzugt hinter hydrophoben Aminosäuren. Proteinase K wurde zur Reinigung der DNA-Matrizen (PCR-Produkt oder geschnittene Plasmid-DNA) für die *in vitro* Transkription verwendet. Die DNA-Lösung wurde mit CaCl₂ (Endkonzentration 2 mM), Tris-Cl pH 7,5 (Endkonzentration 50 mM) und Proteinase K (Endkonzentration 0,2 µg/µl) versetzt und für 30 min bis 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proteinase K und unverdaute Proteine mittels Phenol-Chloroform Extraktion aus dem Ansatz entfernt.

4.2.1.2.3 Phenol-Chloroform Extraktion

Mittels der Phenol-Chloroform Extraktion können unerwünschte Proteinbestandteile aus Nukleinsäurelösungen entfernt werden. Dazu wurde die Nukleinsäurelösung mit einem Volumen Phenol-Chloroform (1:1) gemischt und zentrifugiert (4 min, 13.000 x g, RT). Das Chloroform verbessert die Phasentrennung – denaturierte Proteine sammeln sich in der unteren organischen Phase sowie in der Interphase, wohingegen die Nukleinsäure in der oberen wässrigen Phase gelöst bleibt. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, mit einem Volumen Chloroform gemischt und zentrifugiert (2 min, 13.000 x g, RT), wodurch Phenolreste entfernt wurden.

4.2.1.2.4 Alkoholfällung

Das Konzentrieren einer Nukleinsäurelösung und die Entfernung störender Salze erfolgte mittels Alkoholfällung. Dazu wurde die Nukleinsäurelösung zunächst mit 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2, Endkonzentration 0,3 M) versetzt. Nach Zugabe des dreifachen Volumens 99 % Ethanol wurde die Lösung für 60 min bei -20 °C inkubiert. Die präzipitierte Nukleinsäure wurde durch Zentrifugation pelletiert (30 min, 13.000 x g, 4 °C). Um Salzreste zu entfernen, wurde das Pellet zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen, anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und in einem geeigneten Volumen RNase-freiem ddH₂O resuspendiert.

4.2.1.2.5 DNase I-Verdau

Zur Entfernung von DNA aus durch *in vitro* Transkription hergestellten RNA-Lösungen wurden diese mit 10 U RNase-freier DNase I und MgCl₂ (Endkonzentration 10 mM) für 60 min bei 37 °C inkubiert.

4.2.1.2.6 Gelchromatographie von radioaktiv markierter RNA

Zur Trennung der radioaktiv markierten RNA von nicht eingebauten Radionukleotiden aus einem *in vitro* Transkriptionsansatz wurde eine Gelchromatographie mit selbst hergestellten Säulen durchgeführt. Dazu wurde sterilisierte Glaswolle in eine sterilisierte Pasteurpipette gestopft und mit 2 ml in TE-Puffer (0,1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8,0) vorgequollenem Sephadex G-25 überschichtet. Um die Auftrennung optisch zu verfolgen, wurde der Transkriptionsansatz mit 10 µl denaturierendem Probenpuffer (80 % Formamid, 50 mM EDTA, 1 mg/ml Bromphenolblau, 2 mg/ml Xylencyanol) versetzt. Xylencyanol ist ein größeres Molekül und läuft eher zusammen mit der RNA, dagegen ist Bromphenolblau kleiner und läuft zusammen mit den Nukleotiden. Der Transkriptionsansatz wurde auf die Säule aufgetragen, mehrere Male mit 150 µl TE-Puffer eluiert und die Xylencyanol-haltigen Fraktionen gesammelt. Zur Ermittlung der RNA-haltigen Fraktionen wurde eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Autoradiographie durchgeführt. Die RNA-haltigen Fraktionen wurden vereint und die RNA mittels Alkohol-fällung konzentriert. Alternativ zu dieser Methode wurden kommerzielle Mini Quick RNA Spin Columns (Roche) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

4.2.1.3 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

4.2.1.3.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die endonukleolytische Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen wurde entsprechend den Standardvorschriften durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Für jedes Restriktionsenzym wurden die optimalen Reaktionsbedingungen der endonukleolytischen Spaltung von DNA entsprechend den Angaben der Enzymhersteller gewählt. Die Spaltung wurde auf analytischen Agarosegelen kontrolliert.

4.2.1.3.2 Ligation von DNA

Die Ligation doppelsträngiger DNA-Moleküle wurde mit der Bakteriophagen T4-DNA-Ligase durchgeführt. Der Vektor wurde standardmäßig in einer Konzentration von 3 – 5 pmol/ml eingesetzt. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor wurde durch die Länge (bp) des Inserts im Verhältnis zum Vektor ermittelt. Die Ligationsreaktion wurde mit 0,5 U T4-DNA-Ligase in 10 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 1 mM rATP und 50 mM Tris-Cl pH 7,6 für 16 Stunden bei 4 °C durchgeführt.

4.2.1.3.3 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die 5'-Phosphate der RNA-Oligonukleotide miR-122-mat, miR-122mu-mat und miR-124-mat wurden vor der 5'-Phosphorylierung mit [γ -³²P]-rATP entfernt. Weiterhin wurde linearisierte Plasmid-DNA vor dem Einsatz in eine Ligationsreaktion dephosphoryliert, um die

Wahrscheinlichkeit einer Rückligation der Vektor-DNA zu verringern. In beiden Fällen wurde die alkalische Phosphatase aus Shrimps (Roche) nach Herstellerangaben verwendet und anschließend inaktiviert (15 min, 65 °C).

4.2.1.3.4 Phosphorylierung von 5'-Enden

Die zuvor dephosphorylierten RNA-Oligonukleotide miR-122-mat, miR-122mu-mat und miR-124-mat wurden mit T4-Polynukleotid-Kinase (Fermentas) unter Verwendung von [γ - 32 P]-rATP den Herstellerangaben entsprechend am 5'-Ende phosphoryliert. Die T4-Polynukleotid-Kinase wurde anschließend inaktiviert (15 min, 70 °C).

4.2.1.4 RNA-Synthese *in vitro*

Um das 3'-Ende der RNA für die „run-off“-Transkripte festzulegen, wurden die Transkriptionsmatrizen durch Restriktionsverdau von Plasmid-DNA hergestellt. Um RNAs definierter Länge zu erhalten, wurden die Transkriptionsmatrizen mittels PCR hergestellt. Die DNA-Lösung wurde mit Proteinase K behandelt, Phenol-Chloroform-extrahiert, ethanolgefällt und in einem geeigneten Volumen RNase-freiem ddH₂O gelöst. Die einzelnen Komponenten des Transkriptionsansatzes wurden bei Raumtemperatur zusammenpipettiert, da das Spermidin aus dem Transkriptionspuffer auf Eis zur Präzipitation der Template-DNA führen würde.

Standard Reaktionsansatz

	Endkonzentration
5 x Transkriptionspuffer (s. Hersteller)	1 x 40 mM Tris-HCl pH 7,9, 6 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 2 mM Sperimidin
rNTPs	0,5 mM
DNA-Matrize	0,02- 0,04 µg/µl
T7-/T3-oder SP6-RNA-Polymerase	1 Unit/µl

Die Ansätze wurden für 60 min bei 37 °C (T7/SP6) oder 42 °C (T3) inkubiert.

Zur Synthese intern radioaktiv markierter RNA wurde [α - 32 P]-UTP in einer Endkonzentration von 2,5 - 3 µM verwendet. Um Synthese-Abbrüche innerhalb des poly(U/C)-Traktes der HCV-3'-UTR durch eine aufgrund limitiert vorhandener UTPs „stotternde“ RNA-Polymerase zu minimieren, wurde die Konzentration des nicht radioaktiv markierten UTP der Länge und dem UTP-Gehalt der zu synthetisierenden RNA angeglichen und in einer Endkonzentration von 200 - 300 µM eingesetzt. Die Endkonzentration nicht markierter Nukleotide (rATP, rCTP, rGTP) entsprach 0,4 mM.

Für die *in vitro* Transkription der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden für die Northern Blot Analyse wurden die Plasmide ph-anti-GAPDH mit BamHI und pM12-FLuc mit EcoRV linearisiert und aufgereinigt. Zur internen Markierung der RNA mit Digoxigenin wurde 0,175 mM DIG-UTP in der Transkriptionsreaktion eingesetzt. Um den Einbau von DIG-UTP in die RNA zu begünstigen, wurde

unmarkiertes UTP in einer Endkonzentration von 75 μM eingesetzt. Alle nicht markierten Nukleotide (rATP, rCTP, rGTP) wurden in einer Endkonzentration von 0,5 mM verwendet.

4.2.1.4.1 Anhängen einer 7-Methylguanosin-Kappe und eines poly(A)-Schwanzes an RNA

Das Anhängen einer 5'-7-Methylguanosin-Kappe an eine RNA kann während ihrer Synthese *in vitro* erfolgen. Hierzu wurde der Transkriptionsreaktion ein Ribo-m⁷G-Cap-Analog m⁷G(5')ppp(5')G (Endkonzentration 0,5 mM) von Promega zugesetzt, welches am 5'-Ende der RNA durch die RNA-Polymerase angefügt wird und die 7-Methylguanosin-Kappe simuliert. Die Konzentration des rGTP (Endkonzentration 50 μM) wurde entsprechend reduziert, um die Wahrscheinlichkeit des Anhängens des Cap-Analog an das 5'-Ende zu erhöhen. Die Transkriptionsreaktion wurde 60 min bei 37 °C inkubiert, mit DNase I behandelt und die RNA mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits aufgereinigt. Anschließend wurde die RNA zur Polyadenylierung mit 1 U Poly(A)-Polymerase und 1 mM rATP für 10 min bei 37 °C inkubiert und mittels des RNeasy® Mini Kits aufgereinigt.

4.2.1.4.2 Synthese intern radioaktiv markierter microRNAs

Zur Synthese intern radioaktiv markierter miRNAs wurden für die *in vitro* Transkription zunächst DNA-Matrizen hergestellt. Um das exakte 3'-Ende der miRNAs zu determinieren, wurden die Plasmide pmiR-122_BsmAI und pmiR-124_BsmAI mit dem Restriktionsenzym BsmAI und das Plasmid pmiR-122mu_BsaI mit dem Restriktionsenzym BsaI geschnitten und die entsprechenden DNA-Banden aus einem präparativen Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt. Die DNA wurde dann mit Proteinase K behandelt, Phenol-Chloroform-extrahiert, ethanolgefällt und in einem geeigneten Volumen RNase-freiem ddH₂O gelöst und in eine *in vitro* Transkriptionsreaktion eingesetzt.

Standard Reaktionsansatz

	Endkonzentration
Transkriptionspuffer (s. Hersteller)	1 x (s. Kapitel 4.2.1.4)
DIT	10 mM
rNTPs (ATP, GTP, CTP)	0,4 mM
rUTP	10-50 μM
[α - ³² P]-UTP	2,5 μM
DNA-Matrize	0,02- 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
T7-RNA-Polymerase	1 Unit/ μl

Die Reaktionsansätze wurden bei 37 °C inkubiert. Um die Prozessierung der RNA durch das Hammerhead-Ribozym am 5'-Ende der miRNA-Sequenz zu unterstützen, wurden den Transkriptionsansätzen nach 4 Stunden MgCl₂ in einer Endkonzentration von 22 mM zugegeben und die Ansätze für weitere 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die miRNAs an ihrem

5'-Ende mit der T4-Polynukleotid-Kinase (Fermentas) den Herstellerangaben entsprechend phosphoryliert. Die Aufreinigung der miRNAs erfolgte über präparative Polyacrylamidgele. Dazu wurden die RNA-Lösungen in Probenpuffer (80 % Formamid, 50 mM EDTA, 1 mg/ml Bromphenolblau, 2 mg/ml Xylencyanol) aufgenommen, auf denaturierende 15 % Polyacrylamidgele aufgetragen und bei 25 mA/Gel aufgetrennt. Anschließend wurde eine Autoradiographie durchgeführt und die RNA-Banden aus dem Gel unter Zuhilfenahme des entwickelten Röntgenfilms ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden zerkleinert, in Reaktionsgefäße überführt und die RNA in Elutionspuffer (1 x TE, 0,1 % SDS, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA) für 15 bis 20 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rotor eluiert. Dann wurden die Gelstücke abzentrifugiert, die RNA aus dem Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von drei Volumen 99 % Ethanol für 2 bis 3 Stunden bei -40 °C gefällt. Anschließend wurde die RNA pelletiert (30 min, 13.000 x g, 4 °C), mit 80 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in ddH₂O aufgenommen.

4.2.1.5 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*) wurde genutzt, um DNA-Fragmente spezifischer Sequenz und Größe *in vitro* exponentiell zu vervielfältigen. Voraussetzung für diesen Prozess ist ein Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende, das entsprechend verlängert werden kann. Ein solcher Abschnitt kann durch Zugabe kurzer DNA-Oligonukleotide (Primer) zum Reaktionsansatz geschaffen werden, die komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments sind. Zum Primer-Design wurde die Software „Net Primer“ (PREMIER Biosoft International) verwendet, womit Schmelztemperatur und potentielle Sekundärstrukturen der Primer analysiert werden konnten. Ein Zyklus aus Denaturierung der DNA (94 °C, 2 min), Anlagerung der Primer (42 - 65 °C, 1 min) und DNA-Synthese (72 °C, 1 -2 min) wurde 25mal wiederholt. Diesem Prozess ging eine initiale Denaturierung (94 °C, 2 min) voraus, und er wurde mit einer finalen DNA-Synthese (72 °C, 3 min) abgeschlossen. Zur Amplifikation der DNA wurde die hitzestabile Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* mit einem Temperaturoptimum von 72 °C verwendet.

Standard Reaktionsansatz

	Endkonzentration
5 x Taq-Puffer (s. Hersteller, Tris-HCl pH 8,5)	1 x
MgCl ₂	2,5 mM
dNTPs	250 µM
Primer A	0,5 µM
Primer B	0,5 µM
Template-DNA	10 ng/µl
Taq-DNA-Polymerase	1 Unit/50 µl

4.2.1.5.1 Zielgerichtete Mutagenese mit PCR

Mit dieser, auf einer zweistufigen PCR beruhenden Technik (Abb. 4.1) ist es möglich, punktgenaue Mutationen in einer bestimmten DNA-Sequenz einzufügen. In der ersten Stufe werden in zwei PCR-Reaktionen zwei überlappende PCR-Produkte generiert. In der überlappenden Region tragen beide Stränge dieselbe, durch Primer eingefügte Mutation. Der überlappende Bereich macht eine Rekombination beider PCR-Produkte möglich, die in einer PCR der zweiten Stufe als Matrize zur Amplifikation der rekombinierten Sequenzen dienen. Es werden zwei Mutageneseprimer *c und *b, welche die entsprechende Mutation tragen und zwei flankierende Primer a und b benötigt. In den PCR-Reaktionen der ersten Stufe werden nun die PCR-Produkte AB und CD, die in der überlappenden Region die Mutation tragen, generiert und über ein Agarosegel gereinigt um verbleibende Primer zu entfernen. Die Fragmente dienen in der PCR der zweiten Stufe als Matrize zur Synthese eines entsprechend größeren Fragments mittels der flankierenden Primer a und d.

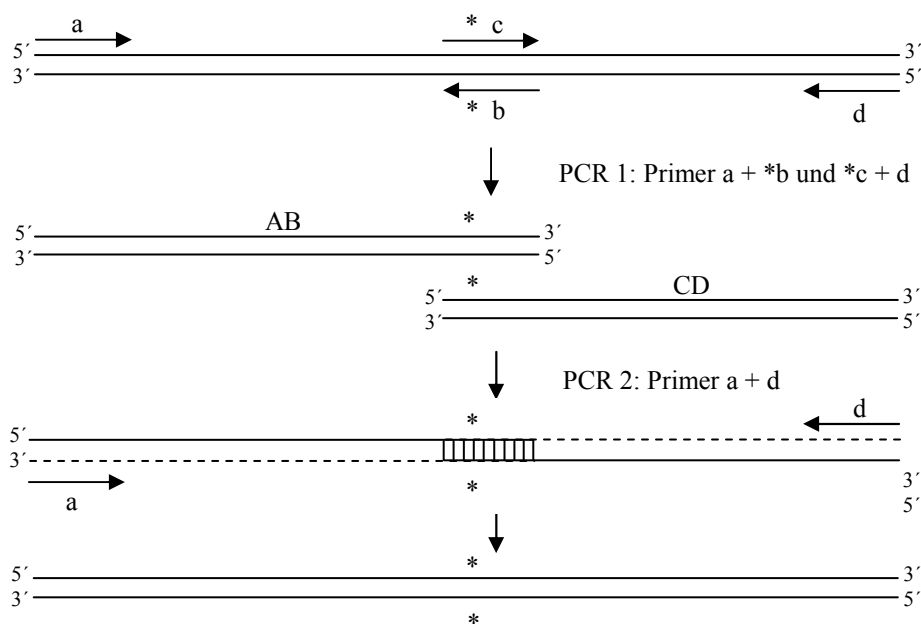


Abb. 4.1: Schema der zielgerichteten PCR-Mutagenese. In der ersten Stufe wird die gewünschte Mutation durch Primer in die Fragmente AB und CD eingefügt. Diese beiden Fragmente werden in der zweiten Stufe rekombiniert und dienen dort als Matrize zur Amplifikation des vollständigen mutierten Fragments. Das Sternchen markiert die über Primer eingefügte Mutation.

Das Fragment wird in der Nähe der Enden mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten, in den dafür vorgesehenen Vektor kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Auf diese Weise wurden die Plasmide pHCV-FLuc-5mut1, pHCV-FLuc-5mut2 und pHCV-FLuc-5mut1,2 konstruiert.

4.2.1.6 Northern Blot-Analyse

4.2.1.6.1 Kapillartransfer der RNA und Hybridisierung mit RNA-Sonden

Die qualitative und quantitative Analyse transfizierter Reporter-RNAs aus Huh7- und HeLa-Zellen erfolgte mittels Northern Blot-Analyse. Zunächst wurde die cytoplasmatische RNA mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert, die Aufreinigung durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft und die RNA-Proben unter denaturierenden Bedingungen über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Agarosegel für 10 min in ddH₂O, 10 min in 0,05 M NaOH und 20 min in 10 x SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M Tri-Natrium-Zitrat pH 7,0) gewaschen. Die Nylonmembran wurde 10 min in ddH₂O und 20 min in 10 x SSC geschwenkt. Der Transfer der Nukleinsäure von dem Agarosegel auf die Nylonmembran erfolgte über Kapillarblotting für 4 Stunden. Alle Komponenten wurden auf Gelgröße zugeschnitten und wie in Abbildung 4.2 aufgebaut:

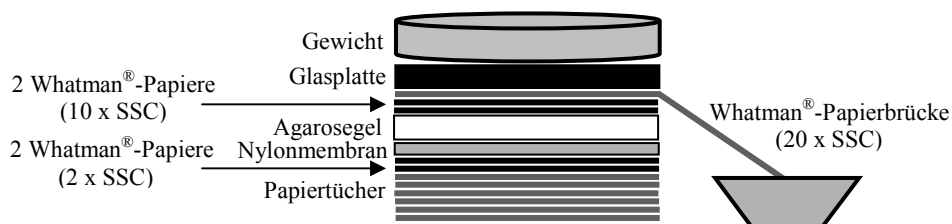


Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Kapillar-Blots. Auf einem Stapel Papiertücher wurden luftblasenfrei zwei in 2 x SSC getränkte Whatman®-Papiere, die Nylonmembran, das Agarosegel, zwei in 10 x SSC getränkte Whatman®-Papiere und eine Whatman®-Papierbrücke, deren Ende in einer Wanne mit 20 x SSC liegt, aufgelegt. Abschließend wurden eine Glasplatte und ein kleines Gewicht (etwa 0,5 kg) aufgesetzt.

Nach dem RNA-Transfer wurde die Nylonmembran in Frischhaltefolie eingeschlagen und 5 min mit UV-Licht bestrahlt, um die RNA auf der Membran zu fixieren. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Zur Vorbereitung der Membran auf die Hybridisierung mit der Sonde wurde die Membran mit 25 ml Hybridisierungspuffer (50 % Formamid, 0,1 % N-Lauroylsarcosin, 0,2 % SDS, 0,5 x SSC, 2 % Block-Reagenz von Roche) für 60 min bei 68 °C inkubiert. Unterdessen wurden 10 µl Digoxigenin-markierte RNA-Sonde (anti-GAPDH oder anti-FLuc) für 5 min bei 80 °C erhitzt, 5 min auf Eis abgekühlt und mit 25 ml Hybridisierungspuffer gemischt. Dieser Ansatz wurde zu der Membran gegeben und bei 68 °C über Nacht inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Membran zweimal mit 2 x SSC mit 0,1 % SDS und zweimal mit 0,5 x SSC mit 0,1 % SDS für jeweils 20 min bei 68 °C gewaschen. (20 x SSC (*saline-sodium citrate*)-Puffer: 3 M NaCl, 0,3 M Tri-Natrium-Zitrat pH 7,0).

4.2.1.6.2 Elektrotransfer der RNA und Hybridisierung mit DNA-Sonden

Zur Analyse endogener miR-122 wurden zunächst cytoplasmatische kleine RNAs aus Huh7- und HeLa-Zellen sowie aus Kaninchen-Retikulozytenlysate mit dem *mirVana*TM miRNA Isolation Kit (Ambion) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt und auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel überprüft und aufgetrennt. Unterdessen wurde die Nylonmembran für 10 min in 1 x TBE (90 mM Tris-Borat, 2,5 mM EDTA pH 8,3) gewaschen. Der RNA-Transfer erfolgte über ElektrobloTTing in einer *Semi-dry-blotting*-Apparatur (Biometra) bei 150 mA für 50 min. Alle verwendeten Komponenten wurden auf Gelgröße zugeschnitten und auf der Anode wie in Abbildung 4.3 aufgebaut:

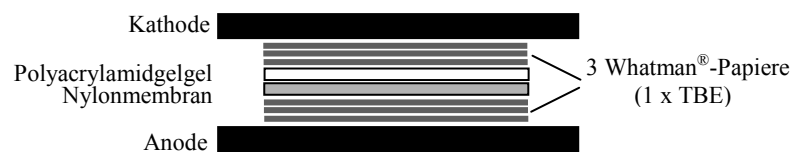


Abb. 4.3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Elektro-Blots. Auf die Anode einer Blot-Apparatur wurden luftblasenfrei drei in 1 x TBE getränkte Whatman®-Papiere, die Nylonmembran, das Polyacrylamidgel und drei in 1 x TBE getränkte Whatman®-Papiere aufgelegt. Abschließend wurde die Kathode aufgesetzt.

Nach dem RNA-Transfer wurde die Nylonmembran in Frischhaltefolie eingeschlagen und 5 min mit UV-Licht bestrahlt, um die RNA auf der Membran zu fixieren. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Die Membran wurde mit 25 ml Hybridisierungspuffer (50 % Formamid, 0,1 % N-Lauroylsarcosin, 0,2 % SDS, 0,5 x SSC, 2 % Block-Reagenz von Roche) ohne Sonde für 60 min bei 50 °C prähybridisiert. Unterdessen wurden 10 µl Digoxigenin-markierte DNA-Sonde (mi-122 oder hra-U6) für 5 min bei 80 °C erhitzt, 5 min auf Eis abgekühlt und mit 25 ml Hybridisierungspuffer gemischt. Dieser Ansatz wurde zu der Membran gegeben und bei 50 °C über Nacht inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Membran zweimal mit 2 x SSC mit 0,1 % SDS und zweimal mit 0,5 x SSC mit 0,1 % SDS für jeweils 20 min bei 50 °C gewaschen. (20 x SSC (*saline-sodium citrate*)-Puffer: 3 M NaCl, 0,3 M Tri-Natrium-Zitrat pH 7,0).

4.2.1.6.3 Detektion

Um unspezifische Bindungen des Digoxigenin-Antikörpers mit der Nylonmembran zu unterbinden, wurde die Membran zunächst in Blocklösung (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 1,5 % Block-Reagenz von Roche) für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde in Blocklösung 1:10.000 verdünnter Digoxigenin-Antikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase (anti-DIG-Fab-Fragmente, Roche), zu der Membran gegeben und für mindestens 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde dreimal mit Waschpuffer (0,3 % Tween 20, 0,1 M Maleinsäure, 0,15 mM NaCl) für jeweils 10 min bei Raumtemperatur von der Membran gewaschen. Zur Detektion

des Digoxigenin-Antikörpers wurde die Membran zunächst für 2 min in Detektionslösung (0,1 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl pH 9,5) equilibriert, mit 1 ml 1 % CSPD (*Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)Tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]Decan}-4-yl)Phenylphosphat*) in Detektionslösung bedeckt und für 5 min in Dunkelheit inkubiert. Die an den Antikörper gebundene alkalische Phosphatase dephosphoryliert CSPD, wodurch eine Verbindung entsteht bei deren Zerfall es zur Emission von Licht der Wellenlänge 477 nm kommt. Dieses Signal wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen und somit RNA einer spezifischen Sequenz indirekt identifiziert.

4.2.2 Methoden zur Analyse von RNA-Protein-Wechselwirkungen

4.2.2.1 UV-Crosslink von RNA und Proteinen

Bei der UV-Crosslink-Reaktion werden durch Bestrahlung mit UV-Licht Pyrimidin-Nukleotide einer intern radioaktiv markierten RNA energetisch angeregt, die dann mit reaktiven Aminosäure-Seitenketten von Proteinen eines Proteingemisches kovalente Bindungen eingehen können. Dadurch wird die radioaktive Markierung spezifisch auf die kovalent gebundenen Proteine übertragen, die dann durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden können. Die reaktiven Aminosäuren weisen eine in folgender Reihenfolge abnehmende Reaktivität im Crosslink auf: Cystein → Tyrosin → Phenylalanin → Cystin → Histidin → Arginin → Lysin → Serin (Smith, 1976). Die Bindungsreaktion von radioaktiv markierter RNA und Proteinen wurde in HeLa- oder Huh7-Zellextrakt in Anwesenheit von 130 mM K⁺ durchgeführt, wobei die K⁺-Konzentration der Extrakte berücksichtigt wurde. Dazu wurde zunächst Zellextrakt mit einer Proteinkonzentration von etwa 0,03 mg mit 1 pmol ³²P-markierter HCV-RNA oder 20 pmol ³²P-markierter miRNA und kompetierenden Mengen unmarkierter miRNA (200 oder 1000 pmol) oder unmarkierter HCV-RNA (9 pmol) gemischt. Um unspezifische Bindungen abzufangen, wurde dem Ansatz tRNA in einer Endkonzentration von 0,5 µg/µl zugesetzt. Die Ansätze wurden dann für 15 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze auf Eis für 45 min mit einer 8 W UV-Handlampe mit einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt. Nicht kovalent gebundene RNA wurde anschließend für 90 min bei 37 °C mit 5 µl RNase A (10 µg/µl) verdaut. Kovalent an Protein gebundene RNA wird durch den RNase-Verdau auf ein kurzes (gegebenenfalls heterogenes) RNA-Oligonukleotid getrimmt, das an dem Protein verbleibt und es dadurch in der Regel radioaktiv markiert. Das die kovalente Brücke schlagende Pyrimidin-Nukleotid muss dabei in der Nähe eines radioaktiv markierten Nukleotids liegen. Idealerweise liegt das radioaktiv markierte Nukleotid direkt 3'-terminal des kovalent an das Protein gebundenen Nukleotids.

Anschließend wurden die Proteine auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und in Entfärber fixiert. Die Gele wurden im Gelrockner für 2 Stunden getrocknet und die radioaktiv markierten Proteinbanden anschließend mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Zur Identifizierung der RNA-bindenden Proteine mittels Massenspektrometrie wurden UV-Crosslink-Reaktionen in großem Maßstab durchgeführt. Um ausreichend große Mengen des gesuchten Proteins anzureichern, wurden in dem Experiment HeLa- oder Huh7-Zellextrakt mit einer Gesamtproteinmenge von etwa 1,2 – 1,8 mg eingesetzt. Da die Effizienz des Crosslinks zwischen radioaktiv markierter RNA und Proteinkomponenten nur etwa 5 % bis 10 % ausmacht (Song et al., 2005), wurde eine entsprechend große Menge radioaktiv markierter RNA (~ 200 pmol) in die Reaktion eingesetzt. Die Entfernung der ungebundenen und RNase A-verdauten RNA aus dem Crosslink-Ansatz erfolgte bei einer anschließenden 2D-Gelelektrophorese durch eine Aufreinigung mit dem Trizol®-Reagenz (Invitrogen) nach Herstellerprotokoll und bei einer Auftrennung der Proteinkomponenten mittels rpHPLC über eine illustra NAP™ - 5 Säule (GE Healthcare). Das Proteinpellet wurde zur Anfertigung einer zweidimensionalen Gelelektrophorese oder einer rpHPLC und zur massenspektrometrischen Analyse an die Proteinanalytik-Abteilung des Biochemischen Instituts Gießen (Dr. G. Lochnit) übergeben.

4.2.2.2 Diskontinuierliche Dichtegradienten-Zentrifugation

Die Analyse von Translations-Initiationskomplexen erfolgte mittels analytischer Ultrazentrifugation nach der von Anthony und Merrick beschriebenen Methode (Anthony und Merrick, 1992).

Die Sucrosegradienten wurden am Tag vor der Zentrifugation hergestellt und bis zum Gebrauch bei -20 °C eingefroren. Dazu wurden je 2 ml 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 % und 10 % Sucrose (in 50 mM Tris-HCl pH 8,4, 6 mM MgCl₂, 60 mM NaCl und 10 mM DTT), beginnend mit 35 % Sucrose, im Zentrifugenröhrchen geschichtet. Durch das Einfrieren und Auftauen werden die Sucrocestufen etwas vermischt, und es bildet sich ein gleichmäßiger Sucrosegradient.

Die Bildung der Komplexe mit intern radioaktiv markierter HCV-RNA oder 5'-markierter miRNA wurde in Kaninchen-Retikulozytenlysate (Promega) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt 50 µl Kaninchen-Retikulozytenlysate (enthält ~ 113 mM K⁺, die vom Hersteller dem Lysat zugeführt werden), 80 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 15 mM Tris-HCl pH 7,5 und 1 mM DTT in einem Volumen von 150 µl. Die Endkonzentration an K⁺ betrug somit etwa 120 mM zuzüglich einer nicht genau bestimmten K⁺-Konzentration von 20 – 30 mM aus den lysierten Retikulozyten.

Um die Identität der 48S- und 80S-Initiationskomplexe zu bestätigen wurden Stadien-spezifische Translationsinhibitoren eingesetzt. Zur Identifizierung der 48S-Komplexe wurde 2 mM GMP-PNP eingesetzt, welches die Anlagerung der 60S-ribosomalen Untereinheit inhibiert und somit die 48S-Komplexe anreichert. Vollständig assoziierte 80S-Ribosomen wurden durch Zugabe von 0,17 mM Anisomycin oder 4 mM Cycloheximid, beides Inhibitoren der frühen Elongation, angereichert und identifiziert. Zur Bindung der Elongationsinhibitoren an die Ribosomen wurden die Ansätze mit Anisomycin oder Cycloheximid für 5 min bei 30 °C ohne Zugabe von RNA vorinkubiert. Nach Zugabe von 1 pmol HCV-RNA (intern radioaktiv markiert oder nicht markiert) oder 27 pmol

miRNA (5'-radioaktiv markiert oder nicht markiert) wurden die Reaktionsansätze für 10 min bei 30 °C inkubiert und anschließend auf die Sucrosegradienten aufgetragen. Zur Erstellung einer Kinetik der Komplexbildung wurden keine Translationsinhibitoren eingesetzt und die Inkubationszeiten limitiert (30 sec, 1 min, 2 min, 4 min, 6 min, 10 min). Anschließend wurden die Reaktionen mit 30 mM MgCl₂ gestoppt, um eine Dissoziation der Initiationskomplexe zu unterbinden und ihren augenblicklichen Assoziationsstatus zu erhalten. Zur Analyse der Initiationskomplexe aus lebenden Zellen wurden die Zellen 2 Stunden nach der Transfektion mit radioaktiv markierter HCV-RNA in 150 µl Passive Lysis Buffer (Promega) mit 1 mM Cycloheximid lysiert. Zur Identifizierung der 80S-Ribosomen wurde Cycloheximid auch 30 min vor Inkubationsende in einer Endkonzentration von 1 mM zu den Zellen gegeben. Das Lysat wurde anschließend auf einen Sucrosegradienten aufgetragen.

Die Sucrosegradienten wurden im Beckman Rotor SW 40 zentrifugiert (5,5 h, 4 °C, 200.000 x g beim mittleren Radius des Röhrchens) und anschließend durch Austropfen vom Boden des Zentrifugenröhrchens in Fraktionen zu je 500 µl fraktioniert. Zu den Fraktionen wurden je 2 ml Scintillatorflüssigkeit (Roth) gegeben und die Menge der emittierten β-Strahlung als Zählereignisse pro Minute (*counts per minute*, cpm) registriert. Anhand dieser Werte wurde ein Radioaktivitätsprofil der Gradienten erstellt und damit die Menge der in Komplexen gebundenen RNA ermittelt.

4.2.3 Proteinbiochemische Methoden

4.2.3.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamidgele, bestehend aus einem 10 - oder 12 % Trenngel (0,1 % SDS, 375 mM Tris-HCl pH 8,8) und einem 6 % Sammelgel (0,1 % SDS, 125 mM Tris-HCl pH 6,8) verwendet. Dazu wurden die Proben zunächst mit Probenpuffer (20 % Glycerol, 4 % SDS, 10 % β-ME, 0,02 % Bromphenolblau, 125 mM Tris-HCl pH 6,8) versetzt und für 5 min bei 90 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei 25 mA/Gel in TG-Puffer (192 mM Glycin, 0,1 % SDS, 125 mM Tris-OH pH 8,3) durchgeführt. Analytische Proteingele wurden direkt nach der Elektrophorese für 30 min mit Coomassie-Brilliant-Blau R-250 gefärbt und anschließend entfärbt. Zur Analyse radioaktiv markierter Proteine wurden die Gele 15 min in Entfärber fixiert, zwei Stunden getrocknet und anschließend autoradiographiert.

4.2.3.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Bei der zweidimensionalen (2D)-Gelelektrophorese werden Proteine sowohl nach ihrem isoelektrischen Punkt als auch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die 2D-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung der durch UV-Crosslink radioaktiv markierten Proteinbanden eingesetzt. Alle hier erfolgten Schritte wurden von der Proteinanalytik-Abteilung des Biochemischen Instituts Gießen (Dr. G. Lochnit) durchgeführt.

Vor der isoelektrischen Fokussierung wurde das getrocknete Proteinpellet aus der Trizol®-Reagenz- oder rpHPLC-Aufreinigung des UV-Crosslink-Ansatzes zunächst in 200 µl IEF-Puffer (4 % CHAPS, 30 mM DTT, 20 mM Tris-OH, 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % IPG-Puffer) aufgenommen und durch Schütteln und Ultraschall gelöst. Anschließend erfolgte eine Bestimmung des Proteingehaltes mit dem 2-D Quant Kit (GE Healthcare).

1. Dimension - Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden die IEF-Streifen im pH-Bereich von 3 – 10 (Immobiline™ DryStrip, GE Healthcare) und im pH-Bereich von 5 – 8 (ReadyStrip™, Biorad) verwendet und diese zunächst bei Raumtemperatur für 24 Stunden in der gelösten Probe rehydratisiert. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden sie dabei mit je 2 ml Cover Fluid (GE Healthcare) überschichtet. Durch die Rehydratisierung des Streifens in der Probe können größere Proteinmengen geladen und Präzipitationen am Applikationsort vermieden werden. Die Fokussierung wurde nach folgendem Protokoll bei 20 °C durchgeführt. Der Spannungsanstieg in Schritt 1 und 2 erfolgte linear (Multiphor II, GE Healthcare).

Schritt	Spannung	Stromstärke	Leistung	Voltstunden	Zeit
1.	0 – 100 V	2 mA	5 W	0,25 kWh	5 h
2.	100 – 3500 V	2 mA	5 W	10,80 kWh	6 h
3.	3500 V	2 mA	5 W	21,00 kWh	6 h

Im Anschluss an die Fokussierung wurden die IEF-Streifen direkt für die zweite Dimension verwendet oder bei – 80 °C gelagert.

2. Dimension – SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zunächst wurden die IEF-Streifen durch Inkubation in Equilibrierungspuffer (50 mM Tris-Cl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % Glycerin, 4 % SDS, Bromphenolblau) mit SDS gesättigt. Zur Zerstörung noch vorhandener Disulfidbrücken erfolgte die erste Inkubation für 15 min in Equilibrierungspuffer mit 1 % DTT. Dann erfolgte eine Inkubation für 15 min in Equilibrierungspuffer mit 4 % Iodacetamid, um freigewordene Cysteinreste der Disulfidbrücken zu acetylieren und ein Zurückfallen der Cysteinreste zu verhindern. Für die Auftrennung in der zweiten Dimension wurden 10 % Polyacrylamidgele ohne Sammelgel verwendet. Die equilibrierten IEF-Streifen wurden luftblasenfrei auf der Oberkante des Gels aufgelegt und mit Agarose fixiert. Die Elektrophorese erfolgte in einer Hoefer 600-Kammer (GE Healthcare) zunächst bei 15 mA/Gel für 15 min und anschließend bei 45 mA/Gel für etwa 3 h (600 V, 50 W) in Tris-Glycin Puffer (25 mM Tris-OH pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS). Danach wurden die Gele entnommen und mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt oder auf eine PVDF-Membran transferiert.

4.2.3.3 Western Blot

Zur massenspektrometrischen Analyse der durch UV-Crosslink identifizierten RNA-bindenden Proteine, wurden die Proteine des 2D-Gels zunächst auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (GE Healthcare) durch das elektrophoretische Tank-Blot-Verfahren übertragen. Dazu wurden das Proteingel, die PVDF-Membran und Whatman®-Papiere für 15 min in Towbin-Puffer (20 % Ethanol, 25 mM Tris, 192 mM Glycin) bei Raumtemperatur equilibriert und wie folgt auf der Anode einer Gitterkassette aufgelegt: Whatman®-Papier, PVDF-Membran, Polyacrylamidgel, Whatman®-Papier. Die gepackte Kassette wurde senkrecht in eine mit Towbin-Puffer gefüllte Hoefer 600-Kammer (GE Healthcare) geschoben und der Proteintransfer für 19 h bei 30 V durchgeführt. Zur Kontrolle des elektrophoretischen Proteintransfers wurde die Membran anschließend mit Ponceaurot gefärbt und zur Identifizierung der radioaktiven Proteinspots autoradiographiert. Alle hier erfolgten Schritte wurden von der Proteinanalytik-Abteilung des Biochemischen Instituts Gießen (Dr. G. Lochnit) durchgeführt.

4.2.3.4 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brilliant-Blau

Coomassie-Brilliant-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert und damit Proteine unspezifisch anfärbt. Dazu wurden die Proteingele für 30 min in Färbelösung (50 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 0,12 % Coomassie-Brilliant-Blue R250) geschwenkt, wodurch die Proteine durch die Denaturierung koagulierten und damit fixiert wurden. Nach dem Anfärben der Proteingele wurden diese mehrmals in Entfärber (5 % Ethanol, 7,5 % Essigsäure) geschwenkt, bis sich ein klarer Hintergrund einstellte.

4.2.3.5 Färbung von PVDF-Membranen mit Ponceaurot

Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff, mit dem sich Proteine auf PVDF- und Nitrocellulose-Membranen reversibel anfärben lassen. Durch die Färbelösung werden die Proteine gleichzeitig auf der Membran fixiert. Dazu wurde die PVDF-Membran 5 min in Färbelösung (0,1 % Ponceau S, 1 % Essigsäure) geschwenkt und anschließend mit 1 % Essigsäure gespült. Zum Entfärben der Membran wurde diese in TBS-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL pH 8,0) geschwenkt, bis sich ein klarer Hintergrund einstellte.

4.2.3.6 Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (*reversed phase high performance liquid chromatography, rpHPLC*)

Die Auftrennung von Proteinen eines über eine illustra NAP™ – 5 Säule vorgereinigten präparativen UV-Crosslink-Ansatzes für die massenspektrometrische Analyse erfolgte auch durch rpHPLC mit einer LKB 2150 HPLC-Pumpe. Die Trennung wurde mit einer Acclaim C₁₈-Säule (Porengröße 300 µm, 2,1 mm x 150 mm; Dionex GmbH, Idstein) durchgeführt. Die Proteine wurden unter Gradientenbedingungen bei 40 °C mit einer Flussrate von 0,2 ml/min in 60 min von der Säule eluiert. Für eine präparative rpHPLC wurde ein flacher linearer Lösungsmittelgradient bestehend aus Solvens A (0,1 % TFA, 5 % ACN) und Solvens B (0,085 % TFA, 80 % ACN) angewendet. Der Gradientenanstieg war wie folgt: 1) 0-5 min 5-25 % Solvens B, 2) 5-35 min 25-85 % Solvens B, 3) 35-40 min 85-95 % Solvens B, 4) 40-60 min 5 % Solvens B. Die UV-Detektion der eluierten Proteine erfolgte bei 220 nm mit einem ABI 759A UV-Detektor. Anschließend wurde die fraktionierte Reinigung mittels eindimensionaler SDS-PAGE und Autoradiographie überprüft und ausgewählte Fraktionen für die weitere Feinreinigung durch 2D-Gelelektrophorese oder durch Ausschnitt einer entsprechenden Proteinbande aus einem Polyacrylamidgel verwendet. Die rpHPLC wurde von der Proteinanalytik-Abteilung des Biochemischen Instituts Gießen (Dr. G. Lochnit) durchgeführt.

4.2.3.7 Immobilisierte Fe(III)-Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die Präparation der Fe³⁺-IMAC-Säulen zur Anreicherung von RNA-Protein-Crosslinks erfolgte nach dem Protokoll von Stensballe et al. (2001). Zur Substitution des Ni²⁺ durch Fe³⁺ der Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Bindungskapazität 20 mg/ml) wurde das Säulenmaterial in folgender Reihenfolge gewaschen: 15 min mit ddH₂O, 3 x 10 min mit 50 mM EDTA in 1 M NaCl, 4 x 10 min mit ddH₂O, 1 x 15 min mit 100 mM AcOH, 2 x 15 min mit 100 mM FeCl₃ : 100 mM AcOH (1:1, v/v), 1 x 15 min mit 100 mM AcOH, 2 x 10 min mit ddH₂O, 3 x 10 min mit 50 mM NH₄Ac pH 5,8, 3 x 10 min mit 50 mM NH₄Ac / 0,5 M NaCl pH 5,8. Das Säulenmaterial wurde in 50 mM NH₄Ac / 0,5 M NaCl pH 5,8 bei 4 °C gelagert. Direkt vor der Verwendung des Säulenmaterials wurde dieses zunächst noch zweimal mit 50 mM NH₄Ac / 0,5 M NaCl / 1 mM β-ME pH 5,8 für 15 min gewaschen. Der UV-Crosslink-Ansatz wurde in 50 mM NH₄Ac / 1 mM β-ME aufgenommen und 30 min mit dem Säulenmaterial auf einem Rotor inkubiert. Die Bindung der Probe an die Säule wurde durch Messung der Radioaktivität im Überstand der Säule mit Hilfe des Geigerzählers überprüft. Anschließend wurde das Säulenmaterial zweimal mit 50 mM NH₄Ac / 1 mM β-ME pH 5,8 und zweimal mit 50 mM NH₄Ac / 0,5 mM NaCl / 1 mM β-ME pH 5,8 für 15 min bei 4 °C gewaschen. Die Elution der über RNA an die Säule gebundenen Proteine erfolgte mit 50 mM NH₄Ac / 5 mM K₂HPO₄ / 1 mM β-ME pH 8,5 jeweils zweimal mit und ohne 5 µl RNase A (10 µg/µl) für 10 min bei 4 °C. Die Proteine wurden anschließend mit 4 Volumen eiskaltem Aceton gefällt (1 h, 4 °C) und die Anreicherung der RNA-Protein-Crosslinks über eindimensionale SDS-PAGE und Autoradiographie überprüft.

4.2.3.8 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen und die Vorbereitung der Proben wurden von der Proteinanalytik-Abteilung des Biochemischen Instituts Gießen (Dr. G. Lochnit) durchgeführt.

4.2.3.8.1 Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel oder auf der Membran

Zunächst wurden mittels Autoradiographie detektierte Proteinspots aus der PVDF-Membran oder aus dem Proteingel ausgestochen und gewaschen. Da nicht flüchtige Substanzen wie Glycerin, β -ME oder DMSO sowie ionische Seifen wie SDS den Einbau von Peptiden in die Kristalle der Matrix für die massenspektrometrische Analyse stören, wurden die Proben gründlich gewaschen. Das Membranstück wurde zunächst neunmal für je 15 min mit 100 μ l 25 mM NH_4HCO_3 und 10 % Acetonitril geschüttelt und anschließend mit 20 μ l 0,25 % Polyvinylpyrrolidon in 0,1 % Essigsäure bedeckt. Nach 5 min wurde die Membran abschließend mit 150 μ l 25 mM NH_4HCO_3 und 10 % Acetonitril für 5 min gewaschen. Das Gelstück wurde zunächst zweimal für 10 min mit 100 μ l H_2O bei Raumtemperatur geschüttelt und danach 15 min bei Raumtemperatur mit 100 μ l 50 mM NH_4HCO_3 /Acetonitril gewaschen. Anschließend wurde das Gelstück mit 30 μ l Acetonitril bedeckt, das nach genau 1 min wieder entfernt wurde. Das Gelstück wurde mit 50 μ l 50 mM NH_4HCO_3 /Acetonitril rehydriert. Nach 5 min wurde es mit 50 μ l Acetonitril versetzt und weitere 15 min geschüttelt. Abschließend wurde das Gelstück für 30 min in der Speed Vac getrocknet. Für den tryptischen Verdau wurde das Membran- oder Gelstück mit 10 – 20 μ l Trypsinlösung (10 ng/ μ l Trypsin in 25 mM NH_4HCO_3) versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Gelstücke mit 10 – 20 μ l 1 % Trifluoressigsäure für 15 min im Ultraschall inkubiert. Zur Extraktion der Peptide aus der PVDF-Membran, wurden die Membranstücke mit 30 μ l 1 % Trifluoressigsäure/ 10 % Acetonitril für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die isolierten Peptide wurden nun für die massenspektrometrische Analyse verwendet.

4.2.3.8.2 Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Die massenspektrometrischen Analysen wurden mit dem Ultraflex TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) durchgeführt. Dieses ist mit einem Stickstofflaser und einer LIFT-MS/MS Einheit ausgestattet. Die Messungen erfolgten im positiven Reflektormodus. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (10 mg/ml) und Phosphorsäure (10 mg/ml) im Verhältnis 1:1 verwendet. Zunächst wurde eine Kalibrierung des Massenspektrometers mit einem Peptid-(Kalibrierungs)-Standard (1000 – 4000 Da, Bruker Daltonics) durchgeführt. Anschließend wurde die Probe 200 – 400-mal ionisiert und die Einzelspektren addiert. Als Auswertungsprogramm wurde die Compass 1.1-Software bestehend aus FlexControl 2.4, FlexAnalysis 2.4 und BioTools 3.0 (Bruker Daltonics) verwendet. Die Identifizierung der Proteine erfolgte mit Hilfe der Mascot-Suchmaschine

(<http://www.matrixscience.com>) mit Beschränkung auf die Parameter *H. sapiens* mit einer Massentoleranz von 75 ppm, Carbamidomethylierung von Cystein als globale Modifikation und die Oxidation von Methionin als variable Modifikation.

4.2.4 Zellkulturtechniken

4.2.4.1 Subkultivierung adhärenter eukaryotischer Zellen

Huh7- und HeLa-Zellen wurden bei 37 °C (5 % CO₂) in DMEM, mit 10 % FBS und 1 x Penicillin/Streptomycin kultiviert. Waren die Zellen eines Kulturgefäßes etwa 90 % konfluent, wurden sie passagiert. Dazu wurden sie mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und mit 1 x Trypsin-EDTA bei 37 °C für etwa 5 min inkubiert. Der Boden des Kulturgefäßes sollte gerade mit der Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt sein, das Volumen ist abhängig von der Fläche des Kulturgefäßes (25 cm²/0,8 ml, 75 cm²/2 ml). Die Trypsinreaktion wurde mit DMEM mit 10 % FBS gestoppt und die suspendierten Zellen in neue Kulturflaschen ausgesät.

4.2.4.2 Einfrieren eukaryotischer Zellen

Die Zellen eines Kulturgefäßes (etwa 90 % konfluent) wurden mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und mit entsprechender Menge 1 x Trypsin-EDTA-Lösung behandelt. Die Reaktion wurde mit DMEM mit 10 % FBS gestoppt und die Zellen vorsichtig pelletiert (5 min, 550 x g, 4 °C). Das Pellet wurde mit 2 ml PBS gewaschen, nochmals zentrifugiert und in einem geeigneten Volumen sterilfiltriertem DMEM mit 20 % FBS und 20 % DMSO vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte Einfrierröhrchen aliquotiert und die Aliquots im Isopropanoltank für 24 Stunden bei -70 °C gelagert. Das Isopropanol gewährleistet ein gleichmäßiges und langsames Einfrieren der Zellen, sodass die Zellen etwa 1 °C pro Stunde abkühlen. Anschließend wurden die Zellen in die Gasphase eines Flüssigstickstoff-Tanks überführt und gelagert.

4.2.4.3 Auftauen eukaryotischer Zellen

Die in Flüssigstickstoff gelagerten Zellen wurden aufgetaut (37 °C, etwa 1 min), in eine Kulturflasche mit vorgewärmtem DMEM (10 % FBS, 1 x Penicillin/Streptomycin) überführt und bei 37 °C (5 % CO₂) inkubiert. Nach etwa 12 Stunden waren die Zellen adhärent, und es erfolgte ein Mediumwechsel, um das im Medium enthaltene und für Zellen toxische DMSO zu entfernen.

4.2.4.4 Herstellung von cytoplasmatischem Huh7-Zellysat

Die adhärennten Zellen einer Kulturschale (150 mm x 25 mm) wurden zweimal mit 12 ml kaltem Waschpuffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES pH 7,4) gewaschen und anschließend durch Inkubation mit 5 ml 1 x Trypsin-EDTA bei 37 °C abgelöst. Die Zellen wurden in 10 ml Waschpuffer mit 5 % FBS aufgenommen und zentrifugiert (500 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml Waschpuffer aufgenommen und erneut pelletiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet in ½ Volumen hypotonem Lysepuffer (10 mM K-Acetat, 1,5 mM Mg-Acetat, 10 mM HEPES pH 7,4) mit Proteaseinhibitor (complete EDTA-free, Roche) aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und dann in einem Potter-Elvehjem Glashomogenisator mit Glaspistill (Kontes Glass Co., 7 ml) homogenisiert. Waren etwa 80 % der Zellen lysiert, wurde die Lyse beendet und der Zellschrott sowie die Zellkerne abzentrifugiert (8500 x g, 15 min, 4°C). Alternativ dazu wurden die adhärennten Zellen mit Passive Lysis Buffer (Promega) lysiert. Dazu wurden die Zellen einer Kulturschale zweimal mit 12 ml kaltem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen, durch Zugabe von 2 ml Passive Lysis Buffer mit Proteaseinhibitor lysiert und anschließend zentrifugiert (8500 x g, 15 min, 4°C). In beiden Fällen wurde das cytoplasmatische Zellysat in Flüssigstickstoff eingefroren oder direkt im UV-Crosslink-Experiment verwendet.

4.2.4.5 Transfektion von RNA in eukaryotische Zellen

Transfektionen von eukaryotischen Zellen mit einzelsträngiger RNA und mit synthetischen miRNA-Duplexen wurden mit dem Lipofectamine™ 2000-Transfektionsreagenz (Invitrogen) durchgeführt. Das Reagenz basiert auf einer Lipidformel und bildet mit der zu transfizierenden RNA Komplexe, die mit FBS-freiem Medium gemischt und direkt auf die Zellen gegeben werden. Die Transfektionen wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Die zu transfizierenden Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion in Mikrotiterplatten ausgesät. In jede Vertiefung einer 24-well Platte wurden 0,5 ml (8-10 x 10⁴) Zellen und einer 12-well Platte 1 ml (2-3 x 10⁵) Zellen gegeben und bei normalen Wachstumsbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Für Transfektionen in 24-well Platten wurden 0,3 oder 0,4 pmol HCV-RNA, 21 oder 28 pmol miRNA-Duplexe und 40 oder 50 pmol anti-miRNA verwendet. Zur Extraktion transfizierter RNA für die Northern Blot-Analyse wurden Transfektionen in 12-well Platten mit 1 pmol HCV-RNA und 70 pmol miRNA-Duplexen durchgeführt. Die Komplexe wurden zu den Zellen gegeben, die Zellen 2 – 4 Stunden bei 37 °C (5 % CO₂) mit den Komplexen inkubiert und dann geerntet.

4.2.4.6 Detektion der Reporterproteine Firefly- und *Renilla*-Luziferase

In dieser Arbeit wurde die Effizienz der internen Translations-Initiation unter der Regie der kompletten HCV-IRES und ihrer Mutanten durch Verwendung eines monocistronischen Reportersystems gemessen. Das Firefly-Luziferase-Reportergen (FLuc) leitet sich von der codierenden Sequenz des Luziferasegens des nordamerikanischen Leuchtkäfers (engl. Firefly, *Photinus pyralis*) ab. Das Luziferase-Protein kommt normalerweise nicht in Säugerzellen vor und die Bestimmungsmethoden für dieses Enzym sind äußerst sensitiv, weshalb es sich als Reporter anbietet. Dieses 62 kDa-Protein katalysiert in Anwesenheit von ATP, Mg²⁺ und Koenzym A die Oxidation von D-Luziferin zu Oxyluziferin. Das freigesetzte Licht hat eine Wellenlänge von 560 nm und kann mit einem Luminometer gemessen werden, wobei die Einheiten an gemessenem Licht proportional zum Maß an Luziferase-Aktivität in der Probe sind.

Renilla-Luziferase (RLuc) wurde in dieser Arbeit als interne Transfektionskontrolle zur Normalisierung der Firefly-Luziferase-Messungen ko-transfiziert. Das Reporterprotein leitet sich von der Luziferase der Koralle *Renilla reniformis* ab und katalysiert die Oxidation seines Substrates Coelenterazin zu Coelenteramid und Licht. Der Abgleich des Reporters Firefly-Luziferase relativ zur internen Kontrolle *Renilla*-Luziferase minimiert experimentelle Schwankungen, denen die Messwerte ausgesetzt sind. Experimentelle Schwankungen entstehen durch unterschiedliche Zahl und Vitalität der Zellen, die Transfektionseffizienz und die Lysiseffizienz. Die relative Luziferase-Aktivität errechnet sich aus dem Quotienten FLuc-Aktivität/ RLuc-Aktivität.

Zur Messung der *in vivo* translatierten Reporterproteine wurden die Zellen 4 Stunden nach der Transfektion mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 150 µl/well vorgekühltem Lysepuffer (Passive Lysis Buffer, Promega) bei Raumtemperatur lysiert. Die Zellsuspension wurde in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (5 min, 1900 x g, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die Aktivität der Luziferasen am Luminometer gemessen. Zu 20 µl Lysat wurden 100 µl Luziferase-Substratlösung gegeben. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur für 20 s in einem Berthold Lumat 9507 bei 560 nm. Als Leerwert wurde ein Lysat nicht transfizierter Zellen gemessen.

<u><i>Renilla</i>-Luziferase-Puffer</u>	0,1	M	KH ₂ PO ₄
	0,1	M	K ₂ HPO ₄
	0,5	M	NaCl
	1,0	mM	EDTA
			pH 7,4
<u><i>Renilla</i>-Luziferase-Substrat</u>	0,5	mg/ml	Coelenterazin in Methanol

Das *Renilla*-Luziferase-Substrat wird direkt vor der Messung mit dem Puffer 1:100 verdünnt.

<u>Firefly-Luziferase-Puffer</u>	25,0	mM	Glycylglycin, pH 7,8
	15,0	mM	MgSO ₄
	33,3	mM	DTT
	0,1	mM	EDTA
	1,0	mM	rATP
<u>Firefly-Luziferase-Substrat</u>	20,0	mM	Tricine
	1,07	mM	(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ x 5H ₂ O
	2,67	mM	MgSO ₄
	0,1	mM	EDTA
	33,3	mM	DTT
	0,27	mM	Koenzym A
	0,47	mM	Luziferin (<i>Photinus pyralis</i>)
	0,53	mM	rATP

Das Firefly-Luziferase-Substrat wird direkt vor der Messung mit dem Puffer 1:5 verdünnt.

4.2.4.7 Zellviabilitätstest

Zur Normalisierung der Firefly-Luziferase-Messungen wurde zusätzlich die Stoffwechselaktivität der transfizierten Zellen als ein Maß für ihre Vitalität gemessen. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass Translationsunterschiede der Firefly-Luziferase auf Schwankungen in der Zellvitalität zurückzuführen sind. Dazu wurden die transfizierten Zellen 30 min vor Inkubationsende mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen. Zu den Zellen wurden dann 200 µl in Phenolrot-freiem DMEM 1:50 verdünnten WST-1 Reagenz (Roche) gegeben und die Zellen für weitere 30 min im Brutschrank inkubiert. WST-1 ist ein schwach rot gefärbtes Tetrazoliumsalz, welches durch die Succinatdehydrogenase der mitochondrialen Atmungskette in das dunkelrot gefärbte Formazan umgesetzt wird. Dieser Farbumschlag kann in einem Spektralphotometer gemessen werden. Dazu wurden 100 µl des Zellüberstandes auf eine 96-well Platte überführt und bei 450 nm photometrisch gemessen (BioTec ELX800).

4.2.4.8 Proteinbestimmung durch UV-Absorption

Zur Normalisierung der Firefly-Luziferase-Messung wurde unter anderem die Proteinkonzentration der Zellysate bestimmt, um experimentelle Schwankungen durch eine unterschiedliche Zellzahl auszuschließen. Dazu wurden die Zellysate 1:10 verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm und 260 nm gemessen. Da die Proteinzusammensetzung der Zellysate nicht bekannt war, errechnete sich die Proteinkonzentration aus der Näherungsformel für Proteingemische nach Warburg und Christian: Proteinkonzentration (in mg/ml) = (1,55 x A₂₈₀) - (0,76 x A₂₆₀)

4.2.5 Mikrobiologische Methoden

4.2.5.1 Kultivierung von *E. coli* XL1-blue

Der *E. coli*-Stamm XL1-blue wurde auf Platten oder in Flüssigkultur mit LB-Nährmedium kultiviert. Das LB-Nährmedium wurde von der Firma Roth bezogen, im Labor angesetzt und autoklaviert, die LB-Nährböden wurden vom Universitätsklinikum Gießen bezogen. Zur Selektion der gewünschten Klone und zur Verhinderung des Wachstums unerwünschter Mikroorganismen wurden Selektivmedien durch Zusatz von Antibiotika hergestellt. XL1-blue trägt eine Resistenz gegen Tetracyclin, die Plasmide pmiR-122_BsmAI, pmiR-122mu_BsaI und pmiR-124_BsmAI tragen eine Resistenz gegen Kanamycin, alle anderen Plasmide codieren für eine Resistenz gegen Ampicillin.

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	100 – 250 µg/ml
Chloramphenicol	25 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Tetracyclin	5 – 15 µg/ml

Auf die Platten mit LB-Nährmedium wurden entsprechende Antibiotika großflächig ausplattiert. Nach einer Einwirkzeit von etwa 60 min wurde ein Tropfen Zellen einer Übernachtskultur oder ein Ansatz transformierter Bakterienzellen auf der Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das LB-Flüssigmedium wurde mit entsprechenden Antibiotika versetzt, mit den zu kultivierenden Zellen angeimpft (Zugabe einer einzelnen Kolonie von Nährboden oder 1 ml Flüssigkultur) und bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert.

4.2.5.2 Herstellung elektrokompenter *E. coli* XL-1 blue

Die Zellen einer Übernachtskultur wurden in mit Tetracyclin versetztem LB-Medium 1:100 verdünnt. Die Kultur wurde für weitere 90 - 120 min auf einem Schüttler bei 37 °C inkubiert, bis eine Zelldichte von OD₆₀₀ 0,6 erreicht war, und anschließend pelletiert (10 min, 5000 x g, 4 °C). Die Zellen wurden viermal in ½ Volumen eiskaltem ddH₂O gewaschen und anschließend zentrifugiert (5 min, 5000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde in ein- bis zweifachem Volumen ddH₂O aufgenommen und mit Glycerol versetzt (Endkonzentration 10 %). Die Aliquots á 100 µl wurden bei -70 °C eingefroren.

4.2.5.3 Transformation elektrokompenter Bakterienzellen

Für die Transformation wurden 0,01-0,001 pmol Plasmid-DNA oder Ligationsansätze (5 – 10µl) mit 100 µl elektrokompenten Zellen und 50 µl ddH₂O gemischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit dem Elektroporator EasyJect Prima (Equibio) bei 2500 Volt. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) folgte eine Inkubation von 60 min bei 37 °C. Die transformierten Bakterienzellen wurden pelletiert (5 min, 700 x g, RT) und der Überstand

bis auf 200 µl verworfen. Darin wurden die Zellen resuspendiert und auf Platten mit LB-Nährmedium mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

4.2.5.4 Herstellung von Glycerol-Stocks

Um Bakterienzellen möglichst lange aufbewahren zu können, wurden Glycerol-Stocks angelegt. Dazu wurden die Zellen mit Glycerol versetzt (Endkonzentration 10 %) und bei -70 °C eingefroren. Zur Reaktivierung wurden die gefrorenen Zellen mit einer abgeflamten Impfnadel aufgenommen und auf Selektivmedien kultiviert.

4.2.6 Autoradiographie

Die Visualisierung von radioaktiv markierter RNA, radioaktiv markierten RNA-Protein-Komplexen oder des durch Umsetzung von CSPD durch alkalische Phosphatase generierten Signals (Northern Blot) erfolgte mittels Autoradiographie. Getrocknete Gele und Membranen wurden für einen längeren Zeitraum bei Raumtemperatur durch direktes Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak X-omat XAR) autoradiographiert, um ein scharfes Signal mit geringem Hintergrund zu erhalten (direkte Autoradiographie). Zur Verstärkung des Signals erfolgte die Exposition des Films bei -70 °C unter Verwendung eines „intensifying screens“ (indirekte Autoradiographie). Zur Analyse von *in vitro* synthetisierter radioaktiv markierter RNA wurde das nasse Gel in Frischhaltefolie eingeschlagen und für 5 – 15 min direkt autoradiographiert.

5. Literaturverzeichnis

- Anderson**, N.L. und **Anderson**, N.G. (1991). A two-dimensional gel database of human plasma proteins. *Electrophoresis* *12*, 883-906.
- Andersson**, L. und **Porath**, J. (1986). Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe³⁺) affinity chromatography. *Anal. Biochem.* *154*, 250-254.
- Anthony**, D.D. und **Merrick**, W.C. (1992). Analysis of 40 S and 80 S complexes with mRNA as measured by sucrose density gradients and primer extension inhibition. *J. Biol. Chem.* *267*, 1554-1562.
- Baird**, S.D., **Turcotte**, M., **Korneluk**, R.G., **Holcik**, M. (2006). Searching for IRES. *RNA* *12*, 1755-1785.
- Barad**, O., **Meiri**, E., **Avniel**, A., **Aharonov**, R., **Barzilai**, A., **Bentwich**, I., **Einav**, U., **Gilad**, S., **Hurban**, P., **Karov**, Y., **Lobenhofer**, E.K., **Sharon**, E., **Shibolet**, Y.M., **Shtutman**, M., **Bentwich**, Z., **Einat**, P. (2004). MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res.* *14*, 2486-2494.
- Bartel**, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* *116*, 281-297.
- Bartenschlager**, R. (1999). The NS3/4A proteinase of the hepatitis C virus: unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy. *J. Viral. Hepat.* *6*, 165-181.
- Bartenschlager**, R., **Frese**, M., **Pietschmann**, T. (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv. Virus Res.* *63*, 71-180.
- Barth**, S., **Pfuhl**, T., **Mamiani**, A., **Ehse**, C., **Roemer**, K., **Kremmer**, E., **Jäker**, C., **Höck**, J., **Meister**, G., **Grässer**, F.A. (2008). Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res.* *36*, 666-675.
- Behm-Ansmant**, I., **Rehwinkel**, J., **Doerks**, T., **Stark**, A., **Bork**, P., **Izaurralde**, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* *20*, 1885-1898.
- Bhattacharyya**, S.N., **Habermacher**, R., **Martine**, U., **Closs**, E.I., **Filipowicz**, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* *125*, 1111-1124.
- Blanchard**, E., **Belouzard**, S., **Goueslain**, L., **Wakita**, T., **Dubuisson**, J., **Wychowski**, C., **Rouille**, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* *80*, 6964-6972.
- Borchert**, G.M., **Lanier**, W., **Davidson**, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1097-1101.
- Boulant**, S., **Becchi**, M., **Penin**, F., and **Lavergne**, J.P. (2003). Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *J. Biol. Chem.* *278*, 45785-45792.
- Boulant**, S., **Montserret**, R., **Hope**, R.G., **Ratinier**, M., **Targett-Adams**, P., **Lavergne**, J.P., **Penin**, F., **McLauchlan**, J. (2006). Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J. Biol. Chem.* *281*, 22236-22247.
- Bradrick**, S.S., **Walters**, R.W., **Gromeier**, M. (2006). The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase. *Nucleic Acids Res.* *34*, 1293-1303.
- Brown**, E.A., **Zhang**, H., **Ping**, L.H., **Lemon**, S.M. (1992). Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res.* *20*, 5041-5045.
- Bung**, C., **Bochkaeva**, Z., **Terenin**, I., **Zinovkin**, R., **Shatsky**, I.N., **Niepmann**, M. (2010) Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation. *FEBS Lett.* *19*, 837-842.

- Buratti, E., Tisminetzky, S., Zotti, M., Baralle, F.E.** (1998). Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3. *Nucleic Acids Res.* *26*, 3179-3187.
- Burlone, M.E. und Budkowska, A.** (2009). Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J. Gen. Virol.* *90*, 1055-1070.
- Buzayan, J.M., Gerlach, W.L., Bruening, G., Keese, P., Gould, A.R.** (1986). Nucleotide sequence of satellite tobacco ringspot virus RNA and its relationship to multimeric forms. *Virology* *151*, 186-199.
- Carthew, R.W. und Sontheimer, E.J.** (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* *136*, 642-655.
- Cerutti, L., Mian, N., Bateman, A.** (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 481-482.
- Chang, J., Guo, J.T., Jiang, D., Guo, H., Taylor, J.M., Block, T.M.** (2008). Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *J. Virol.* *82*, 8215-8223.
- Chang, J., Nicolas, E., Marks, D., Sander, C., Lerro, A., Buendia, M.A., Xu, C., Mason, W.S., Moloshok, T., Bort, R., Zaret, K.S., Taylor, J.M.** (2004). miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol.* *1*, 106-113.
- Chapman, K.A., Gunderson, S.I., Anello, M., Wells, R.D., Burgess, R.R.** (1988). Bacteriophage T7 late promoters with point mutations: quantitative footprinting and in vivo expression. *Nucleic Acids Res.* *16*, 4511-4524.
- Chekulaeva, M. und Filipowicz, W.** (2009). Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 452-460.
- Chen, C.M., He, Y., Lu, L., Lim, H.B., Tripathi, R.L., Middleton, T., Hernandez, L.E., Beno, D.W., Long, M.A., Kati, W.M., Bosse, T.D., Larson, D.P., Wagner, R., Lanford, R.E., Kohlbrenner, W.E., Kempf, D.J., Pilot-Matias, T.J., Molla, A.** (2007). Activity of a potent hepatitis C virus polymerase inhibitor in the chimpanzee model. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 4290-4296.
- Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., Shiekhattar, R.** (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* *447*, 823-828.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., Shiekhattar, R.** (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* *436*, 740-744.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., Houghton, M.** (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* *244*, 359-362.
- Conrad, C. und Rauhut, R.** (2002). Ribonuclease III: new sense from nuisance. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *34*, 116-129.
- Dahari, H., Ribeiro, R.M., Rice, C.M., Perelson, A.S.** (2007). Mathematical modeling of subgenomic hepatitis C virus replication in Huh-7 cells. *J. Virol.* *81*, 750-60.
- Dahm, S.C. und Uhlenbeck, O.C.** (1991). Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry* *30*, 9464-9469.
- Date, T., Kato, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Yasui, K., Mizokami, M., Wakita, T.** (2004). Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 22371-22376.
- Davis, S., Lollo, B., Freier, S., Esau, C.** (2006). Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* *34*, 2294-2304.
- Del Campo, J.A., Romero-Gómez, M.** (2009). Steatosis and insulin resistance in hepatitis C: A way out for the virus? *World J. Gastroenterol.* *28*, 5014-5019.

- Diaz-Toledano, R., Ariza-Mateos, A., Birk, A., Martinez-Garcia, B., Gomez, J.** (2009). In vitro characterization of a miR-122-sensitive double-helical switch element in the 5' region of hepatitis C virus RNA. *Nucleic Acids Res.* *37*, 5498-5510.
- Doench, J.G. und Sharp, P.A.** (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* *18*, 504-511.
- Dvir, A., Conaway, J.W., Conaway, R.C.** (2001). Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *11*, 209-214.
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., Bienz, K.** (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* *76*, 5974-5984.
- Esau, C., Davis, S., Murray, S.F., Yu, X.X., Pandey, S.K., Pear, M., Watts, L., Booten, S.L., Graham, M., McKay, R., Subramaniam, A., Propp, S., Lollo, B.A., Freier, S., Bennett, C.F., Bhanot, S., Monia, B.P.** (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* *3*, 87-98.
- Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D., Rice, C.M.** (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* *466*, 801-805.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N.** (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* *9*, 102-114.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N., Bartenschlager, R.** (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J. Virol.* *75*, 12047-12057.
- Fukushi, S., Katayama, K., Kurihara, C., Ishiyama, N., Hoshino, F.B., Ando, T., Oya, A.** (1994). Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *199*, 425-432.
- Gardner, J.P., Durso, R.J., Arrigale, R.R., Donovan, G.P., Maddon, P.J., Dragic, T., Olson, W.C.** (2003). L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 4498-4503.
- Garry, R.F. und Dash, S.** (2003). Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virology* *307*, 255-265.
- Gebauer, F. und Hentze, M.W.** (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 827-835.
- Geyer, H., Geyer, R., Pingoud, V.** (2004). A novel strategy for the identification of protein-DNA contacts by photocrosslinking and mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* *32*, e132.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Bienz, K., Moradpour, D.** (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J. Virol.* *77*, 5487-5492.
- Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M., Rice, C.M.** (1993). A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 10583-10587.
- Gramantieri, L., Ferracin, M., Fornari, F., Veronese, A., Sabbioni, S., Liu, C.G., Calin, G.A., Giovannini, C., Ferrazzi, E., Grazi, G.L., Croce, C.M., Bolondi, L., Negrini, M.** (2007). Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* *67*, 6092-6099.
- Grassmann, C.W., Yu, H., Isken, O., Behrens, S.E.** (2005). Hepatitis C virus and the related bovine viral diarrhoea virus considerably differ in the functional organization of the 5' non-translated region: implications for the viral life cycle. *Virology* *333*, 349-366.

- Griffin, S.D.,** Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., Harris, M.P., Rowlands, D.J. (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* *535*, 34-38.
- Gu, S.,** Jin, L., Zhang, F., Sarnow, P., Kay, M.A. (2009). Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 144-150.
- Han, J.,** Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* *18*, 3016-3027.
- Haseloff, J.** und Gerlach, W.L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* *334*, 585-591.
- Henke, J.I.** Analyse der Rolle der leberspezifischen microRNA-122 bei der Translation des Hepatitis C Virus. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg. 2006.
- Henke, J.I.,** Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C.G., Fehr, C., Jünemann, C., Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* *27*, 3300-3310.
- Hershey, J.** und W. B., Merrick, W. C. (2000). Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In *Translational control of gene expression*, pp. 33-88. Edited by N. Sonenberg, J. W. B. Hershey, M. B. Mathews. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hijikata, M.,** Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Shimotohno, K. (1991). Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 5547-5551.
- Hinnebusch, A.G.** (2006). eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 553-562.
- Höck, J.,** Weinmann, L., Ender, C., Rüdell, S., Kremmer, E., Raabe, M., Urlaub, H., Meister, G. (2007). Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep.* *8*, 1052-1060.
- Honda, M.,** Ping, L.H., Rijnbrand, R.C., Amphlett, E., Clarke, B., Rowlands, D., Lemon, S.M. (1996). Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* *222*, 31-42.
- Huang, H.,** Sun, F., Owen, D.M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., Jr., Ye, J. (2007a). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 5848-5853.
- Huang, J.,** Wang, F., Argyris, E., Chen, K., Liang, Z., Tian, H., Huang, W., Squires, K., Verlinghieri, G., Zhang, H. (2007b). Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat. Med.* *13*, 1241-1247.
- Humphreys, D.T.,** Westman, B.J., Martin, D.I., Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 16961-16966.
- Hutvagner, G.** und Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 22-32.
- Hutvagner, G.,** Simard, M.J., Mello, C.C., Zamore, P.D. (2004). Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol.* *2*, E98.
- Inoue, H.,** Hayase, Y., Imura, A., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E. (1987). Synthesis and hybridization studies on two complementary nona(2'-O-methyl)ribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* *15*, 6131-6148.
- Ito, T.** und Lai, M.M. (1997). Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome. *J. Virol.* *71*, 8698-8706.
- Jackson, R.J.** und Standart, N. (1990). Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? *Cell* *62*, 15-24.

- Jang, S.K.,** Kräusslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C., Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol.* *62*, 2636-2643.
- Jang, S.K.** (2006). Internal initiation: IRES elements of picornaviruses and hepatitis c virus. *Virus Res.* *119*, 2-15.
- Ji, H.,** Fraser, C.S., Yu, Y., Leary, J., Doudna, J.A. (2004). Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16990-16995.
- Jopling, C.L.,** Schütz, S., Sarnow, P. (2008). Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* *4*, 77-85.
- Jopling, C.L.,** Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* *309*, 1577-1581.
- Jünemann, C.,** Song, Y., Bassili, G., Goergen, D., Henke, J., Niepmann, M. (2007). Picornavirus internal ribosome entry site elements can stimulate translation of upstream genes. *J. Biol. Chem.* *282*, 132-141.
- Khvorova, A.,** Reynolds, A., Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* *115*, 209-216.
- Kieft, J.S.,** Zhou, K., Jubin, R., Doudna, J.A. (2001). Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA* *7*, 194-206.
- Kim, J.E.,** Song, W.K., Chung, K.M., Back, S.H., Jang, S.K. (1999). Subcellular localization of hepatitis C viral proteins in mammalian cells. *Arch. Virol.* *144*, 329-343.
- Kim, Y.K.,** Lee, S.H., Kim, C.S., Seol, S.K., Jang, S.K. (2003). Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *RNA* *9*, 599-606.
- Kiriakidou, M.,** Tan, G.S., Lamprinak, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* *129*, 1141-1151.
- Knapinska, A. M.,** Irizarry-Barreto, P., Adusumalli, S., Androulakis, I., Brewer, G. (2005). Molecular Mechanisms Regulating mRNA Stability: Physiological and Pathological Significance. *Current Genomics* *6*, 471-486.
- Koizumi, M.,** Hayase, Y., Iwai, S., Kamiya, H., Inoue, H., Ohtsuka, E. (1989). Design of RNA enzymes distinguishing a single base mutation in RNA. *Nucleic Acids Res.* *17*, 7059-7071.
- Korneeva, N.L.,** Lamphear, B.J., Hennigan, F.L., Rhoads, R.E. (2000). Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. *J. Biol. Chem.* *275*, 41369-41376.
- Krützfeldt, J.,** Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* *438*, 685-689.
- Kühn-Hölsken, E.,** Dybkov, O., Sander, B., Lührmann, R., Urlaub, H. (2007). Improved identification of enriched peptide RNA cross-links from ribonucleoprotein particles (RNPs) by mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* *35*, e95.
- Lagos-Quintana, M.,** Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* *12*, 735-739.
- Landgraf, P.,** Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N.D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foà, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., Müller, R.U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D.B., Choksi, R., De Vita, G., Frezzetti, D., Trompeter, H.I., Hornung, V., Teng, G., Hartmann, G., Palkovits, M., Di Lauro, R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C.E., Nagle, J.W., Ju,

- J., Papavasiliou, F.N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M.J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J.J., Sander, C., Zavolan, M., Tuschl, T. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* *129*, 1401-1414.
- Landthaler**, M., Gaidatzis, D., Rothballer, A., Chen, P.Y., Soll, S.J., Dinic, L., Ojo, T., Hafner, M., Zavolan, M., Tuschl, T. (2008). Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *RNA* *14*, 2580-2596.
- Landford**, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S., Orum, H. (2010) Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* *327*, 198-201.
- Lauer**, G.M. und Walker, B.D. (2001). Hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* *345*, 41-52.
- Lecellier**, C.H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, C., Saib, A., Voinnet, O. (2005). A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* *308*, 557-560.
- Lee**, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* *23*, 4051-4060.
- Lewis**, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* *120*, 15-20.
- Lewis**, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* *115*, 787-798.
- Liang**, Y., Ridzon, D., Wong, L., Chen, C. (2007). Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* *8*, 166.
- Liu**, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* *7*, 719-723.
- Lo**, S.Y., Selby, M.J., Ou, J.H. (1996). Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J. Virol.* *70*, 5177-5182.
- Lohmann**, V., Körner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* *285*, 110-113.
- Lohmann**, V., Roos, A., Körner, F., Koch, J.O., Bartenschlager, R. (2000). Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *J. Viral. Hepat.* *7*, 167-174.
- Lopez de Quinto**, S., Lafuente, E., Martinez-Salas, E. (2001). IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *RNA* *7*, 1213-1226.
- Lukavsky**, P.J. (2009). Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res.* *139*, 166-171.
- Luo**, G. (1999). Cellular proteins bind to the poly(U) tract of the 3' untranslated region of hepatitis C virus RNA genome. *Virology* *256*, 105-118.
- Luo**, G., Xin, S., Cai, Z. (2003). Role of the 5'-proximal stem-loop structure of the 5' untranslated region in replication and translation of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* *77*, 3312-3318.
- Lytle**, J.R., Yario, T.A., Steitz, J.A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 9667-9672.
- Ma**, J., Flemr, M., Stein, P., Berninger, P., Malik, R., Zavolan, M., Svoboda, P., Schultz, R.M. (2010). microRNA activity is suppressed in mouse oocytes. *Curr. Biol.* *20*, 265-270.
- Maroney**, P.A., Yu, Y., Fisher, J., Nilsen, T.W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1102-1107.
- Mathonnet**, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., Filipowicz, W., Duchaine, T.F., Sonenberg, N. (2007).

- MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* *317*, 1764-1767.
- Mayer**, M.P. (2005). Recruitment of Hsp70 chaperones: a crucial part of viral survival strategies. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *153*, 1-46.
- McLauchlan**, J. (2000). Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J. Viral. Hepat.* *7*, 2-14.
- Meister**, G., Landthaler, M., Dorsett, Y., Tuschl, T. (2004a). Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA* *10*, 544-550.
- Meister**, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., Tuschl, T. (2004b). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* *15*, 185-197.
- Menkes**, J.H., Alter, M., Steigleder, G.K., Weakley, D.R., Sung, J.H. (1962). A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics* *29*, 764-779.
- Mercer**, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W.R., Fischer, K.P., Churchill, T.A., Lakey, J.R., Tyrrell, D.L., Kneteman, N.M. (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.* *7*, 927-933.
- Moradpour**, D., Penin, F., Rice, C.M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 453-463.
- Murakami**, K., Abe, M., Kageyama, T., Kamoshita, N., Nomoto, A. (2001). Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. *Arch. Virol.* *146*, 729-741.
- Murakami**, Y., Aly, H.H., Tajima, A., Inoue, I., Shimotohno, K. (2009). Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J. Hepatol.* *50*, 453-460.
- Nielsen**, S.U., Bassendine, M.F., Burt, A.D., Martin, C., Pumechockchai, W., Toms, G.L. (2006). Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J. Virol.* *80*, 2418-2428.
- Niepmann**, M. (2009a). Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochim. Biophys. Acta.* *1789*, 529-541.
- Niepmann**, M. (2009b). Activation of hepatitis C virus translation by a liver-specific microRNA. *Cell Cycle* *8*, 1473-1477.
- Nottrott**, S., Simard, M.J., Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1108-1114.
- Ohba**, K., Mizokami, M., Lau, J.Y., Orito, E., Ikeo, K., Gojobori, T. (1996). Evolutionary relationship of hepatitis C, pesti-, flavi-, plantviruses, and newly discovered GB hepatitis agents. *FEBS Lett.* *378*, 232-234.
- Orom**, U.A., Nielsen, F.C., Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* *30*, 460-471.
- Pacheco**, A., Reigadas, S., Martinez-Salas, E. (2008). Riboproteomic analysis of polypeptides interacting with the internal ribosome-entry site element of foot-and-mouth disease viral RNA. *Proteomics* *8*, 4782-4790.
- Pang**, H., Koda, Y., Soejima, M., Kimura, H. (2002). Identification of human phosphoglucomutase 3 (PGM3) as N-acetylglucosamine-phosphate mutase (AGM1). *Ann. Hum. Genet.* *66*, 139-144.
- Parent**, R., Qu, X., Petit, M.A., Beretta, L. (2009). The heat shock cognate protein 70 is associated with hepatitis C virus particles and modulates virus infectivity. *Hepatology* *49*, 1798-1809.
- Pavlovic**, D., Neville, D.C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B., Zitzmann, N. (2003). The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 6104-6108.

- Pedersen, I.M., Cheng, G., Wieland, S., Volinia, S., Croce, C.M., Chisari, F.V., David, M. (2007).** Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* *449*, 919-922.
- Pelham, H.R. und Jackson, R.J. (1976).** An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* *67*, 247-256.
- Pelletier, J. und Sonenberg, N. (1985).** Photochemical cross-linking of cap binding proteins to eucaryotic mRNAs: effect of mRNA 5' secondary structure. *Mol. Cell Biol.* *5*, 3222-3230.
- Pelletier, J. und Sonenberg, N. (1988).** Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* *334*, 320-325.
- Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H.E., Bartenschlager, R., Moradpour, D. (2004a).** Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J. Biol. Chem.* *279*, 40835-40843.
- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D., Pawlotsky, J.M. (2004b).** Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* *39*, 5-19.
- Perrault, M. und Pecheur, E.I. (2009).** The hepatitis C virus and its hepatic environment: a toxic but finely tuned partnership. *Biochem. J.* *423*, 303-314.
- Pestova, T.V., Borukhov, S.I., Hellen, C.U. (1998a).** Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* *394*, 854-859.
- Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Fletcher, S.P., Jackson, R.J., Hellen, C.U. (1998b).** A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev.* *12*, 67-83.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.E., Pelletier, J., Sharp, P.A. (2006).** Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* *21*, 533-542.
- Petris, M.J. und Mercer, J.F. (1999).** The Menkes protein (ATP7A; MNK) cycles via the plasma membrane both in basal and elevated extracellular copper using a C-terminal di-leucine endocytic signal. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 2107-2115.
- Pham, J.W., Pellino, J.L., Lee, Y.S., Carthew, R.W., Sontheimer, E.J. (2004).** A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* *117*, 83-94.
- Pietschmann, T. (2009).** Regulation of hepatitis C virus replication by microRNAs. *J. Hepatol.* *50*, 441-444.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., Filipowicz, W. (2005).** Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* *309*, 1573-1576.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Filipowicz, W. (2007).** Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* *17*, 118-126.
- Ploss, A., Evans, M.J., Gaysinskaya, V.A., Panis, M., You, H., de Jong, Y.P., Rice, C.M. (2009).** Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* *457*, 882-886.
- Pöhlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G.J., Lin, G., Graneli-Piperno, A., Doms, R.W., Rice, C.M., McKeating, J.A. (2003).** Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Virol.* *77*, 4070-4080.
- Poumbourios, P. und Drummer, H.E. (2007).** Recent advances in our understanding of receptor binding, viral fusion and cell entry of hepatitis C virus: new targets for the design of antiviral agents. *Antivir. Chem. Chemother.* *18*, 169-189.
- Price, S.R., Ito, N., Oubridge, C., Avis, J.M., Nagai, K. (1995).** Crystallization of RNA-protein complexes. I. Methods for the large-scale preparation of RNA suitable for crystallographic studies. *J. Mol. Biol.* *249*, 398-408.

- Randall, G., Panis, M., Cooper, J.D., Tellinghuisen, T.L., Sukhodolets, K.E., Pfeffer, S., Landthaler, M., Landgraf, P., Kan, S., Lindenbach, B.D., Chien, M., Weir, D.B., Russo, J.J., Ju, J., Brownstein, M.J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M., Tuschl, T., Rice, C.M. (2007).** Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 12884-12889.
- Reynolds, J.E., Kaminski, A., Kettinen, H.J., Grace, K., Clarke, B.E., Carroll, A.R., Rowlands, D.J., Jackson, R.J. (1995).** Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J.* *14*, 6010-6020.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B., Bartel, D.P. (2002).** Prediction of plant microRNA targets. *Cell* *110*, 513-520.
- Rijnbrand, R., Bredenbeek, P., van der Straaten, T., Whetter, L., Inchauspe, G., Lemon, S., Spaan, W. (1995).** Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation. *FEBS Lett.* *365*, 115-119.
- Rosa, D., Campagnoli, S., Moretto, C., Guenzi, E., Cousens, L., Chin, M., Dong, C., Weiner, A.J., Lau, J.Y., Choo, Q.L., Chien, D., Pileri, P., Houghton, M., Abrignani, S. (1996).** A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 1759-1763.
- Roy, A.L., Chakrabarti, D., Datta, B., Hileman, R.E., Gupta, N.K. (1988).** Natural mRNA is required for directing Met-tRNA(f) binding to 40S ribosomal subunits in animal cells: involvement of Co-eIF-2A in natural mRNA-directed initiation complex formation. *Biochemistry* *27*, 8203-8209.
- Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T.E., Merrick, W.C., Sonenberg, N. (1990).** Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol. Cell Biol.* *10*, 1134-1144.
- Sakai, A., Claire, M.S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Bukh, J. (2003).** The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11646-11651.
- Saleh, L., Rust, R.C., Füllkrug, R., Beck, E., Bassili, G., Ochs, K., Niepmann, M. (2001).** Functional interaction of translation initiation factor eIF4G with the foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site. *J. Gen. Virol.* *82*, 757-763.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning. A laboratory manual.* (Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sandberg, R., Neilson, J.R., Sarma, A., Sharp, P.A., Burge, C.B. (2008).** Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science* *320*, 1643-1647.
- Sarasin-Filipowicz, M., Krol, J., Markiewicz, I., Heim, M.H., Filipowicz, W. (2009).** Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat. Med.* *15*, 31-33.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P.D. (2003).** Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199-208.
- Seeff, L.B. (2002).** Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* *36*, S35-46.
- Sen, G.L. und Blau, H.M. (2005).** Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.* *7*, 633-636.
- Sheldon, C.C. und Symons, R.H. (1989).** Mutagenesis analysis of a self-cleaving RNA. *Nucleic Acids Res.* *17*, 5679-5685.
- Sheth, U. und Parker, R. (2003).** Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* *300*, 805-808.
- Shimoike, T., Mimori, S., Tani, H., Matsuura, Y., Miyamura, T. (1999).** Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J. Virol.* *73*, 9718-9725.

- Shu, N.,** Baehner, L., Moltzahn, F., Melton, C., Shenoy, A., Chen, J., Belloch, R. (2010). microRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos. *Curr. Biol.* *20*, 271-277.
- Simmonds, P.,** Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D.G., Okamoto, H., Pawlotsky, J.M., Penin, F., Sablon, E., Shin-I, T., Stuyver, L.J., Thiel, H.J., Viazov, S., Weiner, A.J., Widell, A. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* *42*, 962-973.
- Simons, J.N.,** Desai, S.M., Schultz, D.E., Lemon, S.M., Mushahwar, I.K. (1996). Translation initiation in GB viruses A and C: evidence for internal ribosome entry and implications for genome organization. *J. Virol.* *70*, 6126-6135.
- Sizova, D.V.,** Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Hellen, C.U. (1998). Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J. Virol.* *72*, 4775-4782.
- Smith, K.C.** (1976). The radiation-induced addition of proteins and other molecules to nucleic acids. In *Photochemistry and Photobiology of nucleic acids*, pp. 187-218. Edited by S.Y. Wang. New York, San Francisco, London: Academic Press.
- Song, J.J.,** Smith, S.K., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* *305*, 1434-1437.
- Song, Y.** (2006). Regulation of Hepatitis C Virus translation by the viral internal ribosome entry site and the 3'-untranslated region. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Song, Y.,** Friebe, P., Tzima, E., Jünemann, C., Bartenschlager, R., Niepmann, M. (2006). The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J. Virol.* *80*, 11579-11588.
- Song, Y.,** Tzima, E., Ochs, K., Bassili, G., Trusheim, H., Linder, M., Preissner, K.T., Niepmann, M. (2005). Evidence for an RNA chaperone function of polypyrimidine tract-binding protein in picornavirus translation. *RNA* *11*, 1809-1824.
- Steen, H.,** Petersen, J., Mann, M., Jensen, O.N. (2001). Mass spectrometric analysis of a UV-cross-linked protein-DNA complex: tryptophans 54 and 88 of E. coli SSB cross-link to DNA. *Protein Sci.* *10*, 1989-2001.
- Stensballe, A.,** Andersen, S., Jensen, O.N. (2001). Characterization of phosphoproteins from electrophoretic gels by nanoscale Fe(III) affinity chromatography with off-line mass spectrometry analysis. *Proteomics* *1*, 207-222.
- Stern-Ginossar, N.,** Elefant, N., Zimmermann, A., Wolf, D.G., Saleh, N., Biton, M., Horwitz, E., Prokocimer, Z., Prichard, M., Hahn, G., Goldman-Wohl, D., Greenfield, C., Yagel, S., Hengel, H., Altuvia, Y., Margalit, H., Mandelboim, O. (2007). Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* *317*, 376-381.
- Sullivan, C.S.** und Pipas, J.M. (2001). The virus-chaperone connection. *Virology* *287*, 1-8.
- Terenin, I.M.,** Dmitriev, S.E., Andreev, D.E., Shatsky, I.N. (2008). Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 836-841.
- Tahbaz, N.,** Kolb, F.A., Zhang, H., Jaronczyk, K., Filipowicz, W., Hobman, T.C. (2004). Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep.* *5*, 189-194.
- Thermann, R.** und Hentze, M.W. (2007). Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* *447*, 875-878.
- Tsuchihara, K.,** Tanaka, T., Hijikata, M., Kuge, S., Toyoda, H., Nomoto, A., Yamamoto, N., Shimotohno, K. (1997). Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the extreme 3'-terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3'X. *J. Virol.* *71*, 6720-6726.

- Unbehaun**, A., Borukhov, S.I., Hellen, C.U., Pestova, T.V. (2004). Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev.* *18*, 3078-3093.
- Vasudevan**, S. und Steitz, J.A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* *128*, 1105-1118.
- Vasudevan**, S., Tong, Y., Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* *318*, 1931-1934.
- Vasudevan**, S., Tong, Y., Steitz, J.A. (2008). Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* *7*, 1545-1549.
- Vaucheret**, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* *20*, 759-771.
- Wakita**, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., Liang, T.J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* *11*, 791-796.
- Wakiyama**, M., Takimoto, K., Ohara, O., Yokoyama, S. (2007). Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev.* *21*, 1857-1862.
- Wang**, B., Love, T.M., Call, M.E., Doench, J.G., Novina, C.D. (2006). Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol. Cell* *22*, 553-560.
- Wang**, B., Yanez, A., Novina, C.D. (2008a). MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 5343-5348.
- Wang**, Y., Sheng, G., Juranek, S., Tuschl, T., Patel, D.J. (2008b). Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature* *456*, 209-213.
- Wells**, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., Sachs, A.B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* *2*, 135-140.
- Winter**, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* *11*, 228-234.
- Wu**, L., Fan, J., Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 4034-4039.
- Yang**, Z., Jakymiw, A., Wood, M.R., Eystathiou, T., Rubin, R.L., Fritzler, M.J., Chan, E.K.L. (2004). GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J. Cell Sci.* *117*, 5567-5578.
- Yekta**, S., Shih, I.H., Bartel, D.P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* *304*, 594-596.
- Yi**, M. und Lemon, S.M. (2003). 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* *77*, 3557-3568.
- Yi**, M., Bodola, F., Lemon, S.M. (2002). Subgenomic hepatitis C virus replicons inducing expression of a secreted enzymatic reporter protein. *Virology* *304*, 197-210.
- Yi**, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* *17*, 3011-3016.
- Yuan**, Y.R., Pei, Y., Ma, J.B., Kuryavii, V., Zhadina, M., Meister, G., Chen, H.Y., Dauter, Z., Tuschl, T., Patel, D.J. (2005). Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol. Cell* *19*, 405-419.
- Zhu**, Q., Guo, J.T., Seeger, C. (2003). Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J. Virol.* *77*, 9204-9210.

6. Anhang

miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR

Die miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR sind zwischen allen Genotypen und Subtypen des HCV konserviert. Die Sequenzen wurden von der europäischen HCV-Datenbank (euHCVdb; http://euhcvdb.ibcp.fr/euHCVdb/jsp/nomen_tab1.jsp) erworben. Bei dem Abgleich der dort bestätigten Sequenzen für den Genotyp 4a (Y11604), 5a (Y13184) und 6a (Y12083) mit der Referenzsequenz des Genotyps 1a H77 zeigte sich, dass die 5'-UTRs dieser Sequenzen verkürzt sind und das 5'-Ende erst stromabwärts der miR-122-Zielsequenzen beginnt. Als Referenzsequenzen dieser Genotypen wurden daher die in der Tabelle aufgeführten Sequenzen nach Lanford et al. (2010) verwendet. Die miR-122-Zielsequenzen sind hervorgehoben (fett, unterstrichen).

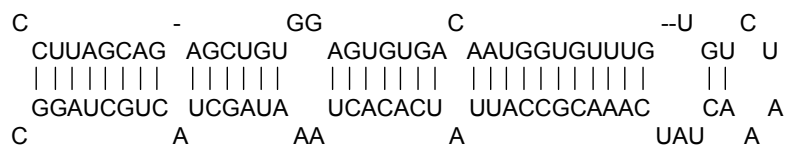
Tab. 6.1: Beide miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR sind zwischen allen HCV-Isolaten konserviert.

Genotyp	Subtyp	Zugangsnummer	Sequenz
1	a	AF009606 (H77)	gccagccccctgatggggcg <u>acactcc</u> accatgaat <u>cactccc</u> cctgt
1	a	M62321	gccagccccctgatggggcg <u>acactcc</u> accatgaat <u>cactccc</u> cctgt
	b	D90208	-----ttggggcg <u>acactcc</u> accatagat <u>cactccc</u> cctgt
	c	D14853	gccagccccctgatggggcg <u>acactcc</u> gccatgaat <u>cactccc</u> cctgt
2	a	D00944	-accgccccctaatagggcg <u>acactcc</u> gccatgaat <u>cactccc</u> cctgt
	b	D10988	gcccgccccctgatggggcg <u>acactcc</u> gccatgaat <u>cactccc</u> cctgt
	c	D50409	-accgccccctaaaagggcg <u>acactcc</u> gccatgaat <u>cactccc</u> cctgt
	k	AB031663	tgcccgccccctaatagggcg <u>acactcc</u> gccatgaat <u>cactccc</u> cctgt
3	a	D17763	acctgcctttac - - gagggcg <u>acactcc</u> accatggat <u>cactccc</u> cctgt
	b	D49374	acctgccttttc - - gagggcg <u>acactcc</u> accatgaat <u>cactccc</u> cctgt
	k	D63821	acctgccttttc - - gagggcg <u>acactcc</u> accatgaat <u>cactccc</u> cctgt
4	a	DQ295833	-----ttggggcg <u>acactcc</u> accatagat <u>cactccc</u> cctgt
5	a	D50466	accgcccccttatt - gggggcg <u>acactcc</u> accatg - at <u>cactccc</u> cctgt
6	a	D88476	gccagcccctaac - gggggcg <u>acactcc</u> gccatt - at <u>cactccc</u> cctgt
	b	D84262	gccagcccctaacgggg - cg <u>acactcc</u> accatg-at <u>cactccc</u> cctgt
	d	D84263	gccagcccct - aatgggg - cg <u>acactcc</u> accatg-at <u>cactccc</u> cctgt
	g	D63822	gccagcccctta - cgggg - cg <u>acactcc</u> accatg-at <u>cactccc</u> cctgt
	h	D84265	gccagcccct - aa tgggg - cg <u>acactcc</u> accatg-at <u>cactccc</u> cctgt
	k	D84264	gccagcccct - a atgggg - cg <u>acactcc</u> accatg-at <u>cactccc</u> cctgt

Sequenzen der microRNAs miR-122 und miR-124

Die Sequenzen der microRNAs miR-122 (hsa-mir-122, MI0000442) und miR-124 (hsa-mir-124-3, MI0000445) wurden von der microRNA-Datenbank (miRBase; <http://www.mirbase.org/>) erworben. Während der Anfertigung der hier vorliegenden Arbeit wurden die Sequenzen der reifen miR-122 und der reifen miR-124 der Datenbank aktualisiert, woraus sich Unterschiede in der Sequenzlänge ergeben.

Stem-Loop der miR-122

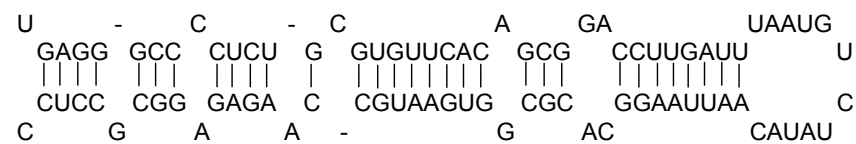


Sequenz der reifen miR-122

5'-UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGU-3' (in der vorliegenden Arbeit verwendet)

5'-UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG-3' (aktualisiert, in der vorliegenden Arbeit verwendet)

Stem-Loop der miR-124

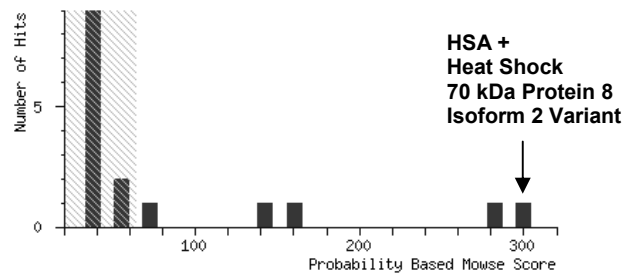


Sequenz der reifen miR-124

5'-UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA-3' (in der vorliegenden Arbeit verwendet)

5'-UAAGGCACGCGGUGAAUGCC-3' (aktualisiert)

Mascot-Datenbankanalyse der in Kapitel 2.5.2 isolierten Proteinspots nach Auftrennung durch 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS (Kapitel 2.5.2, Abb. 2.26, Spotreihe 1)

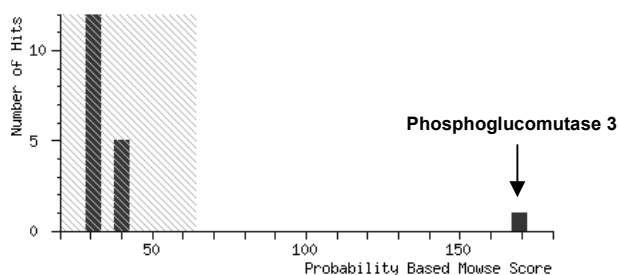


Heat Shock 70 kDa Protein 8 Isoform 2 Variant (human) Q53HF2					
MW [kDa]	pI	SC [%]	IC [%]	Mowse Score	Signifikanz-Grenzwert
53,6	5,5	47,9	31	133	64
Massenübereinstimmungen					
m/z	Position	Aminosäuresequenz	m/z	Position	Aminosäuresequenz
993,5	129 - 137	EIAEAYLGK	1653,8	89 - 102	HWPFMVVDAGRPK
1081,6	349 - 357	LLQDFFNGK	1659,9	172 - 187	IINEPTAAAIAYGLDK
1199,7	160 - 171	DAGTIAGLNVL	1691,8	221 - 236	STAGDTHLGGEDFDNR
1228,6	26 - 36	VEIANDQGNR	1982,0	138 - 155	TVTNAVVTVPAYFNDSQR
1235,6	237 - 246	MVNHFAIEFK	2260,1	362 - 384	SINPDEAVAYGAAVQAAIILSGDK
1253,6	302 - 311	FEELNADLFR	2263,1	4 - 25	GPAVGIDLGTTCYSCVGVFQHGK Carbamidomethyl (C)
1480,8	300 - 311	ARFEELNADLFR	2774,4	424 - 447	QTQTFTTYSNQPGLIQVYEGER
1487,7	37 - 49	TTPSYVAFTDTER	2997,5	273 - 299	TLSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITR

Serumalbumin (human) 1A06A					
MW [kDa]	pI	SC [%]	IC [%]	Mowse Score	Signifikanz-Grenzwert
67,7	5,6	39,1	35,8	160	64
Massenübereinstimmungen					
m/z	Position	Aminosäuresequenz	m/z	Position	Aminosäuresequenz
880,4	222 - 229	AEFAEVSK	1342,6	542 - 553	AVMDDFAAFVEK
927,5	134 - 140	LYEYIAR	1371,6	159 - 170	AAFTECCQAADK Carbamidomethyl (C6, C7)
933,5	70 - 77	LCTVATLR Carbamidomethyl (C)	1623,8	320 - 332	DVFLGMFLYFYAR
960,5	399 - 406	FQNALLVR	1639,9	410 - 424	KVPQVSTPTLVEVSR
984,5	348 - 355	TYETLLEK	1742,9	142 - 155	HPYFYAPELLFFAK
1017,5	61 - 69	SLHTLFGDK	1899,0	142 - 156	HPYFYAPELLFFAKR
1074,5	178 - 186	LDELRDEGK	1910,9	481 - 496	RPCFSALEVDETYVPK Carbamidomethyl (C)
1138,5	472 - 480	CCTESLVNR Carbamidomethyl (C1, C2)	2045,1	369 - 385	VFDEFKPLVEEPQNLK
1149,6	38 - 47	LVNEVTEFAK	2260,1	497 - 515	EFNAETFTFHADICTLSEK Carbamidomethyl (C)
1226,6	7 - 16	FKDLGEENFK	2490,3	17 - 37	ALVLIQFAQYLQQCPFEDHVK Carbamidomethyl (C)

Abb. 6.1/Tab. 6.2: Analyse der Spotreihe 1 nach Auftrennung durch 2D-Gelelektrophorese (Kapitel 2.5.2, Abb. 2.26). **Abbildung oben:** Die Proteinidentifizierung erfolgte mittels Mascot-Datenbankanalyse. Gezeigt ist die Häufigkeitsverteilung der Datenbankeinträge mit einem bestimmten „Mowse Score“ ($-10 \cdot \log(P)$), wobei P die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Übereinstimmung der Massen angibt. Es wurde eine Proteinmischung aus dem humanen Serumalbumin (HSA, 1A06A, „Mowse Score“ 160) und dem humanen Heat Shock 70 kDa Protein 8 Isoform 2 Variant (Hsp70, Q53HF2, „Mowse Score“ 133) mit einem Gesamtscore von 293 identifiziert, der über dem Signifikanz-Grenzwert von 64 ($p < 0,05$) lag. Der nicht signifikante Bereich ist grau schraffiert. **Tabellen unten:** Die mittels Mascot-Datenbankanalyse ermittelten Peptidtreffer mit ihrer zugeordneten Position in der Aminosäuresequenz der Proteine. SC, Sequenzabdeckung des Proteins mit den ermittelten Peptidmassen. IC, dem Protein zugeordnete Peptidmassen.

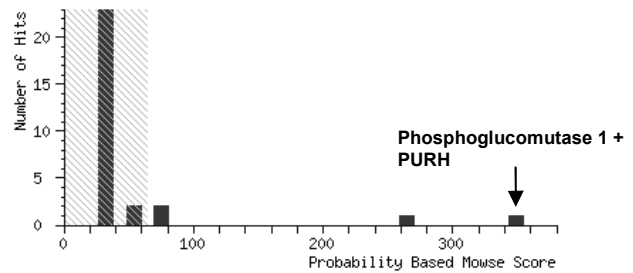
Mascot-Datenbankanalyse der in Kapitel 2.5.2 isolierten Proteinspots nach Auftrennung durch 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS (Kapitel 2.5.2, Abb. 2.26, Spotreihe 2)



Phosphoglucomutase 3 (human) CAI42427					
MW [kDa]	pI	SC [%]	IC [%]	Mowse-Score	Signifikanz-Grenzwert
55,9	5,7	34,4	69,8	169	64
Massenübereinstimmungen					
m/z	Position	Aminosäuresequenz	m/z	Position	Aminosäuresequenz
872,5	42 - 49	MGLLAVLR	1273,6	245 - 255	LNHLGADDFVK Carbamidomethyl (C)
911,4	337 - 343	YLEEVMK	1432,7	455 - 467	AFVRPSGTEDVVR
916,5	105 - 112	VLIDISEK	1658,9	113 - 127	EAVNLQQDAFVVIGR
927,4	337 - 343	YLEEVMK Oxidation (M)	1792,9	432 - 448	QAVTPPGLQEAINDLVK
991,5	423 - 431	VISTTDAER	1990,0	396 - 412	GLTVQQWDALYTDLPNR
1072,5	178 - 186	ATIEGYYQK	2278,1	282 - 300	IVYYYHDADGHFHLIDGDK
1092,6	301 - 310	IATLISSFLK	2316,1	223 - 242	EMEHYFSQGLSVQLFNDGSK
1254,7	32 - 41	AEHLDHVMFR			

Abb. 6.2/Tab. 6.3: Analyse der Spotreihe 2 nach Auftrennung durch 2D-Gelelektrophorese (Kapitel 2.5.2, Abb. 2.26). Die Proteinidentifizierung erfolgte mittels Mascot-Datenbankanalyse. Gezeigt ist die Häufigkeitsverteilung der Datenbankeinträge mit einem bestimmten „Mowse Score“ ($-10 \cdot \log(P)$), wobei P die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Übereinstimmung der Massen angibt. Mit einem „Mowse Score“ von 169 wurde das Protein humane Phosphoglucomutase 3 (CAI42427) identifiziert. Der nicht signifikante Bereich mit einem Signifikanz-Grenzwert von 64 ($p < 0,05$) ist grau schraffiert. **Tabelle unten:** Die mittels Mascot-Datenbankanalyse ermittelten Peptidtreffer mit ihrer zugeordneten Position in der Aminosäuresequenz des Proteins. SC, Sequenzabdeckung des Proteins mit den ermittelten Peptidmassen. IC, dem Protein zugeordnete Peptidmassen.

Mascot-Datenbankanalyse der in Kapitel 2.5.2 isolierten Proteinspots nach Auftrennung durch 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS (Kapitel 2.5.2, Abb. 2.26, Spotreihe 3)



Phosphoglucomutase 1 (human) BC001756					
MW [kDa]	pI	SC [%]	IC [%]	Mowse-Score	Signifikanz-Grenzwert
66,3	9,3	57,9	72,1 %	263	64
Massenübereinstimmungen					
m/z	Position	Aminosäuresequenz	m/z	Position	Aminosäuresequenz
859,5	588 - 594	VSQLQER	1498,8	107 - 118	FYMKEAIQLIAR Oxidation (M)
885,5	252 - 259	ELLSGPNR	1516,7	470 - 482	YDYEEVEAEGANK
908,5	534 - 541	LIFTDGSR	1555,8	18 - 33	AAAASAGRPSASQVRR
913,5	111 - 118	EAIQLIAR	1649,8	51 - 65	TQAYQDQKPGTSGLR
1021,5	215 - 222	QQFDLENK	1652,7	320 - 335	SGEHDFGAAFDGDGDR
1027,5	243 - 251	SIFDFSALK	1658,9	262 - 276	ICIDAMHGVVGPYVK Carbamidomethyl(C)
1030,5	558 - 565	LYIDSYEK	1674,9	262 - 276	ICIDAMHGVVGPYVK Oxidation (M) Carbamidomethyl (C)
1090,6	546 - 557	LSGTGSAGATIR	1771,8	513 - 528	ADNFEYSDPVDGSISR
1109,5	486 - 494	DLEALMFDR	1864,8	413 - 429	LSLCGEESFGTGSDHIR Carbamidomethyl(C)
1125,5	486 - 494	DLEALMFDR Oxidation (M)	1964,1	570 - 587	INQDPQVMLAPLISIALK
1129,6	403 - 412	FFGNLMDASK	1980,1	570 - 587	INQDPQVMLAPLISIALK Oxidation (M)
1145,6	403 - 412	FFGNLMDASK Oxidation (M)	2206,2	150 - 172	AIGGIILTASHNPGGPNDFGIK
1201,6	95 - 106	QEATLVVGGDGR	2316,2	223 - 242	FKPFTVEIVDSVEAYATMLR
1278,7	392 - 402	IALYETPTGWK	2799,3	70 - 94	VFQSSANYAENFIQSIISTVEPAQR
1437,7	195 - 206	TIEEYAVCPDLK Carbamidomethyl (C)	3281,6	342 - 371	HGFFVNPDSVAVIAANIFSIPYFQQTGVR

PURH bifunktionales Enzym (human) JC4642					
MW [kDa]	pI	SC [%]	IC [%]	Mowse Score	Signifikanz-Grenzwert
65,1	6,3	28	5	81	64
Massenübereinstimmungen					
m/z	Position	Aminosäuresequenz	m/z	Position	Aminosäuresequenz
890,5	91 - 97	LDFNLIR	1715,8	531 - 545	LTEVSISSDAFFPFR
892,5	15 - 22	TGLVEFAR	1847,9	267 - 285	HVSPAGAAVGIPLSEDEAK
1008,5	462 - 468	ANYWWLR	2034,9	178 - 194	AFTHTAQYDEAISDYFR
1076,6	469 - 477	HHPQVLSMK	2206,2	2 - 22	APGQLALFSVSDKTGLVEFAR
1143,6	380 - 389	TLFGLHLSQK	2553,3	109 - 133	TVASPGVTVEEAVEQIDIGGVTLR
1309,7	98 - 108	VVACNLYPFVK Carbamidomethyl (C)	2808,3	485 - 509	AEISNAIDQYVTGTIGEDEDLIKWK

Abb. 6.3/Tab. 6.4: Analyse der Spotreihe 3 nach Auftrennung durch 2D-Gelelektrophorese (Kapitel 2.5.2, Abb. 2.26). Die Proteinidentifizierung erfolgte mittels Mascot-Datenbankanalyse. Gezeigt ist die Häufigkeitsverteilung der Datenbankeinträge mit einem bestimmten „Mowse Score“ ($-10 \cdot \log(P)$), wobei P die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Übereinstimmung der Massen angibt. Es wurde eine Proteinnischung aus der humanen Phosphoglucomutase 1 (AAH01756, „Mowse Score“ 263) und dem humanen bifunktionalen Purin-Biosynthese-Protein (PURH, JC4642, „Mowse Score“ 81) mit einem Gesamtscore von 344 identifiziert, der über dem Signifikanz-Grenzwert von 64 ($p < 0,05$) lag. Der nicht signifikante Bereich ist grau schraffiert. **Tabellen unten:** Die mittels Mascot-Datenbankanalyse ermittelten Peptidtreffer mit ihrer zugeordneten Position in der Aminosäuresequenz der Proteine. SC, Sequenzabdeckung des Proteins mit den ermittelten Peptidmassen. IC, dem Protein zugeordnete Peptidmassen.

Daten der Identifizierung des durch eine präparative rpHPLC angereicherten und über eine präparative 1D-Gelelektrophorese isolierten 68 kDa-Proteins (Kapitel 2.5.3)

Identifizierung des Heat Shock Cognate 71 kDa Proteins Isoform 1 in Bande 1

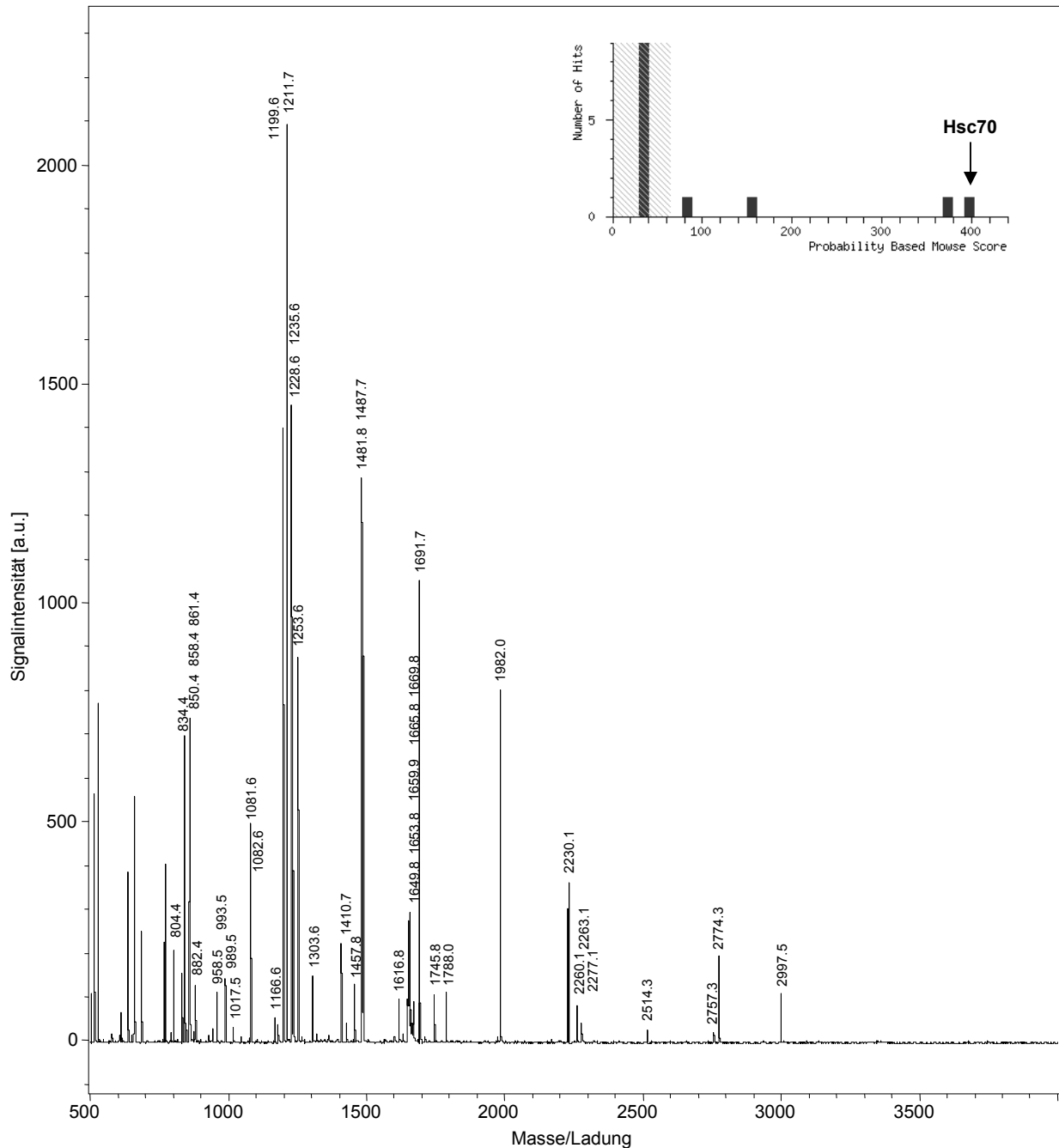


Abb. 6.4: Analyse des Proteins der Bande 1 aus dem präparativen 1D-SDS-Gel mittels MALDI-TOF-MS. Das Spektrum der durch MALDI-TOF-MS-Analyse ermittelten Peptidmassen des in Bande 1 isolierten Proteins, aufgereinigt durch rpHPLC und 1D-SDS-PAGE (Abb. 6.7, vergl. Aufreinigungsstrategie Kapitel 2.5.3). Aufgetragen sind die Signalintensitäten in a.u. (*arbitrary units*, willkürliche Einheiten) gegen den Masse/Ladungs-Quotienten. Die Proteinidentifizierung erfolgte mittels Mascot-Datenbankanalyse. Gezeigt ist die Häufigkeitsverteilung der Datenbankinträge mit einem bestimmten „Mowse Score“ ($-10 \cdot \log(P)$), wobei P die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Übereinstimmung der Massen angibt. Es wurde das humane Heat Shock Cognate 71 kDa Protein (A27077) mit einem „Mowse Score“ von 397 identifiziert, der über dem Signifikanz-Grenzwert von 64 ($p < 0,05$) lag (vergl. Tab. 6.5). Der nicht signifikante Bereich ist grau schraffiert.

Heat Shock Cognate 71 kDa Protein (human) A27077					
MW [kDa]	pl	SC [%]	IC [%]	Mowse Score	Signifikanz-Grenzwert
71,1	5,2	60	79	397	64
Massenübereinstimmungen					
m/z	Position	Aminosäuresequenz	m/z	Position	Aminosäuresequenz
804,4	501 - 507	ITITNDK	1487,7	37 - 49	TTPSYVAFTDTER
834,4	518 - 524	MVQEAEK	1616,8	113 - 126	SFYPEEVSSMLTK
850,4	518 - 524	MVQEAEK Oxidation (M)	1649,8	57 - 71	NQVAMNPTNTVFDK
858,4	312 - 319	GTLDPVEK	1653,8	89 - 102	HWPFMVVNDAGRPK
861,4	252 - 258	DISENKR	1659,9	172 - 187	IINEPTAAAIAYGLDK
882,4	525 - 531	YKAEDEK	1665,8	57 - 71	NQVAMNPTNTVFDK Oxidation (M)
989,5	510 - 517	LSKEDIER	1669,8	89 - 102	HWPFMVVNDAGRPK Oxidation (M)
993,5	129 - 137	EIAEAYLGK	1691,7	221 - 236	STAGDTHLGGEDFDNR
1017,5	501 - 509	ITITNDKGR	1745,8	584 - 597	NQTAEKEEFEHQK
1081,6	349 - 357	LLQDFNGK	1788,0	172 - 188	IINEPTAAAIAYGLDKK
1199,6	160 - 171	DAGTIAGLNLVR	1982,0	138 - 155	TVTNAVVTVPAYFNDSQR
1228,6	26 - 36	VEIANDQGGR	2260,1	362 - 384	SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK
1235,6	237 - 246	MVNHFAIEFK	2263,1	4 - 25	GPAVGIDLGTTCYSCVGVFQHGK Carbamidomethyl (C)
1253,6	302 - 311	FEELNADLFR	2514,3	470 - 493	GVPQIEVTFDIDANGILNVSVDK
1303,6	540 - 550	NSLESYAFNMK	2774,3	424 - 447	QTQTFTTYSNQPGLIQVYEGER
1410,7	77 - 88	RFDDAVVQSDMK	2997,5	273 - 299	TLSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITR
1481,8	329 - 342	SQIHDIIVLGGSTR			

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
MSKGPVAVGID	LGTTYSCVGV	FQHGKVEIIA	NDQGNRITPS	YVAFTDTERL	IGDAAKNQVA	MVPTNTVFDK	KRLIGRRFDD	AVVQSDMKHW	PFMVVNDAGR	PKVQVEYKGE	TKSFYPEEVS
130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
SMVLTMKKEI	AEAYLGKTVT	NAVVTVPAYF	NDSQRQATKD	AGTIAGLNLV	RIINEPTAAA	IAYGLDKKVG	AERNVLIFDL	GGGTFDVSIL	TIEDGIFEVK	STAGDTHLGG	EDFDNRMVNH
250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
FIAEFKRRHK	KDISENKRVA	RRLRTACERA	KRTLSSSTQA	SIEIDSLYEG	IDFYTSITRA	RFEELNADLF	RGLDLPVEKA	LRDAKLDKSO	IHDIVLVGGS	TRIPKIQKLL	QDFNKGKELN
370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
KSINPDEAVA	YGAAVQAAIL	SGDKSENVDQ	LLLLDVTPLS	LGIETAGGVH	TVLKRNTI	PTKQTQFTT	YSDNQPGLVI	QVYEGERANT	KDNLLGKFE	LTGIPPAPRG	VPOIEVTFDI
490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
DANGILNVA	VDKSTGRENK	ITITNDKGR	SKEDIERMVQ	EAEKYKAED	KQRDKVSSKN	SLESYAFNMK	ATVEDEKLGQ	KINDEDKQKI	LKRCNEIINW	LDKNQTAEKE	EFEHQKLELE
610	620	630	640	650							
KVCNPIITKL	YQSAGGMFGG	MFGGFPGGGA	PPSGGASSGP	TIEEVD							

Abb. 6.5/Tab. 6.5: Identifizierung des Heat Shock Cognate 71 kDa Proteins aus Bande 1 der präparativen 1D-SDS-PAGE. Tabelle: Die mittels Macot-Datenbankanalyse ermittelten Peptidtreffer mit ihrer zugeordneten Position in der Aminosäuresequenz des Proteins, ergaben die Identifizierung des humanen Heat Shock Cognate 71 kDa Proteins mit einer Sequenzabdeckung von 60 % (SC). Dem Protein konnten 79 % (IC) der Peptide zugeordnet werden. **Abbildung unten:** Peptide der MS-Analyse (siehe Tab. 6.5), die dem Heat Shock Cognate 71 kDa Protein zugeordnet werden konnten.

Daten der Identifizierung des durch eine präparative rpHPLC angereicherten und über eine präparative 1D-Gelelektrophorese isolierten 68 kDa-Proteins (Kapitel 2.5.3)

Identifizierung des Heat Shock 70 kDa Proteins 8 Isoform 2 Variant in Bande 2

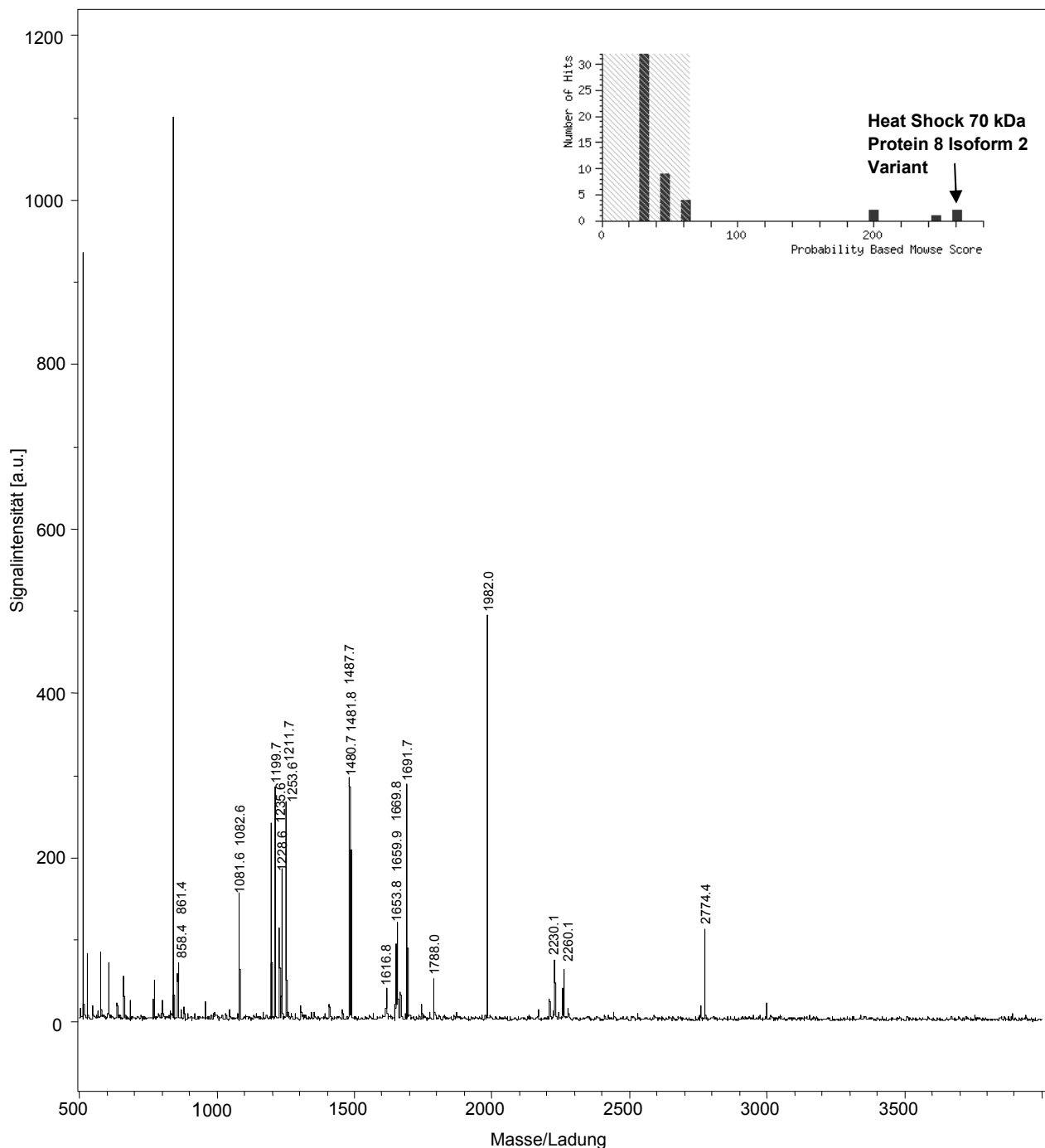
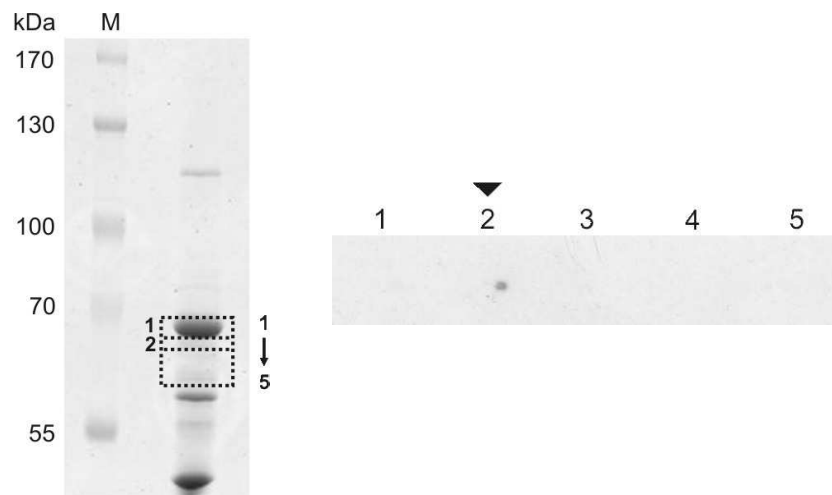


Abb. 6.6: Analyse des Proteins der Bande 2 aus dem präparativen 1D-SDS-Gel mittels MALDI-TOF-MS. Das Spektrum der durch MALDI-TOF-MS-Analyse ermittelten Peptidmassen des in Bande 2 isolierten Proteins, aufgereinigt durch rpHPLC und 1D-SDS-PAGE (Abb. 6.7, vergl. Aufreinigungsstrategie Kapitel 2.5.3). Aufgetragen sind die Signalintensitäten in a.u. (*arbitrary units*, willkürliche Einheiten) gegen den Masse/Ladungs-Quotienten. Die Proteinidentifizierung erfolgte mittels Mascot-Datenbankanalyse. Gezeigt ist die Häufigkeitsverteilung der Datenbankeinträge mit einem bestimmten „Mowse Score“ ($-10 \cdot \log(P)$), wobei P die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Übereinstimmung der Massen angibt. Es wurde das humane Heat Shock 70 kDa Protein 8 Isoform 2 Variant (Q53HF2) mit einem „Mowse Score“ von 261 identifiziert, der über dem Signifikanz-Grenzwert von 64 ($p < 0,05$) lag (vergl. Tab. 6.6). Der nicht signifikante Bereich ist grau schraffiert.



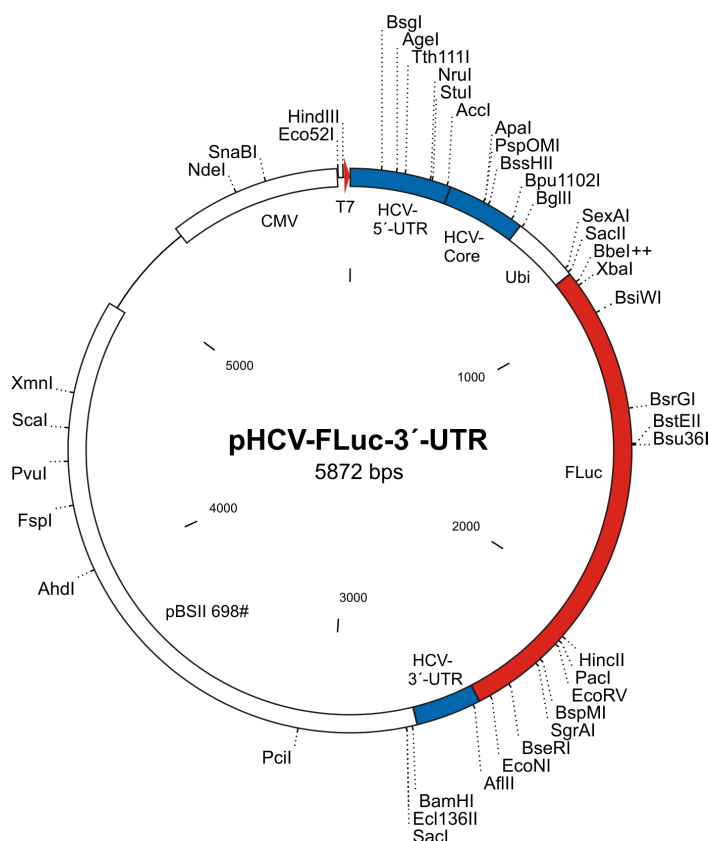
Heat Shock 70 kDa Protein 8 Isoform 2 Variant (human) Q53HF2					
MW [kDa]	pI	SC [%]	IC [%]	Mowse Score	Signifikanz-Grenzwert
53,6	5,5	45	83	261	64
Massenübereinstimmungen					
m/z	Position	Aminosäuresequenz	m/z	Position	Aminosäuresequenz
858,4	312 - 319	GTLDPVEK	1616,7	113 - 126	SFYPEEVSSMVLTK
861,4	252 - 258	DISENKR	1653,8	89 - 102	HWPFMVVDNAGRPK
1081,6	349 - 357	LLQDFFNGK	1659,9	172 - 187	IINEPTAAAIAAYGLDK
1199,7	160 - 171	DAGTIAGLNVL	1669,8	89 - 102	HWPFMVVDNAGRPK Oxidation (M)
1228,6	26 - 36	VEIANDQGNR	1691,7	221 - 236	STAGDTHLGGEDFDNR
1235,6	237 - 246	MVNHFAIEFK	1787,9	172 - 188	IINEPTAAAIAAYGLDKK
1253,6	302 - 311	FEELNADLFR	1982,0	138 - 155	TVTNAVVTVPAYFNDSQR
1480,7	300 - 311	ARFEELNADLFR	2260,1	362 - 384	SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK
1481,8	329 - 342	SQIHDIVLVGGSTR	2774,4	424 - 447	QTQTFTTYSNQPGLIQVYEGER
1487,7	37 - 49	TPSYVAFTDTER			

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
MSKQPAVGID	LGTTYSVGV	FQHGKVEIIA	NDQGNRTTPS	YVAFDTTERL	IGDAAKNQVA	MNPNTVTFDA	KRLIGRRFDD	AVVQSDMKHW	PFMVVDNAGR	PKVQVEYKGE	TKSFYPEEVS
130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
SHVLTKMKEI	AEAYLGKIVT	NAVVTVPATF	NDQGNRTTPS	ACTIAGLNLV	RIINEPTAAA	IAYGLDKVVG	AERNVLIFDL	GGTFDVSIL	TIEDGIFEVK	STAGDTHLGG	EDFDNRMVNH
250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
FIAEFKRRHK	KDISENKR	AVRRLRTACERA	KRTLSSTQA	SIEIDSLYEG	IDFYTSITRA	RFEELNADLF	RGLDLPVEKA	LRDAKLKFSQ	IHDIVLVGGS	TRIPKIQKLL	QDFNKGKELN
370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
KSLNPDEAVA	YGAVQAAIL	SCDKSENVQD	LLLLDVTPLS	LGIEIAGGVT	TVLIKRNVTI	PIKQTQFTT	YSDNQPGLI	QVYEGERANT	KDNLLGKFE	LTGHPGGMPG	GFPGGGAPPS
490	500										
GGASSGPTIE	EVD										

Abb. 6.7/Tab. 6.6: Identifizierung des radioaktiv markierten 68 kDa-Proteins aus Bande 2 der präparativen 1D-SDS-PAGE. Abbildung oben links: Auftrennung des mittels rpHPLC vorgereinigten UV-Crosslink-Ansatzes mit radioaktiv markierter HCV-RNA in Huh7-Extrakt über ein 7,5 % SDS-Gel (vergl. Aufreinigungsstrategie Kapitel 2.5.3). Die Identifizierung der Proteinbanden erfolgte durch Coomassie-Blau-Färbung. Das Ausschneiden der Gelbanden (1 bis 1,5 mm) erfolgte oberhalb der dominanten Proteinbande von etwa 70 kDa (Bande 1) bis oberhalb der Proteinbande von etwa 60 kDa (Bande 5). M, Proteinmarker PAGE-Ruler (Fermentas). **Abbildung oben rechts:** Identifizierung der Radioaktivität in den Gelstücken durch Autoradiographie (5 Tage, -70°C). In dem Gelstück 2 des 1D-SDS-Gels konnte das stärkste radioaktive Signal detektiert und dem durch die HCV-RNA radioaktiv markierten 68 kDa-Protein zugeordnet werden (Markierung durch Pfeil). Auf die PVDF-Membran wurden 20 % der isolierten und Trypsin-verdauten Proteine aufgetragen. **Tabelle unten:** Die mittels Mascot-Datenbankanalyse ermittelten Peptidtreffer mit ihrer Position in der Aminosäuresequenz des Proteins, ergaben die Identifizierung des humanen Heat Shock 70 kDa Proteins 8 Isoform 2 Variant mit einer Sequenzabdeckung von 45 % (SC). Dem Protein konnten 83 % (IC) der Peptide zugeordnet werden. **Abbildung unten:** Peptide der MS-Analyse (vergl. Tab. 6.6), die dem Heat Shock 70 kDa Protein 8 Isoform 2 Variant zugeordnet werden konnten.

Plasmidkarte pHCV-FLuc-3'-UTR

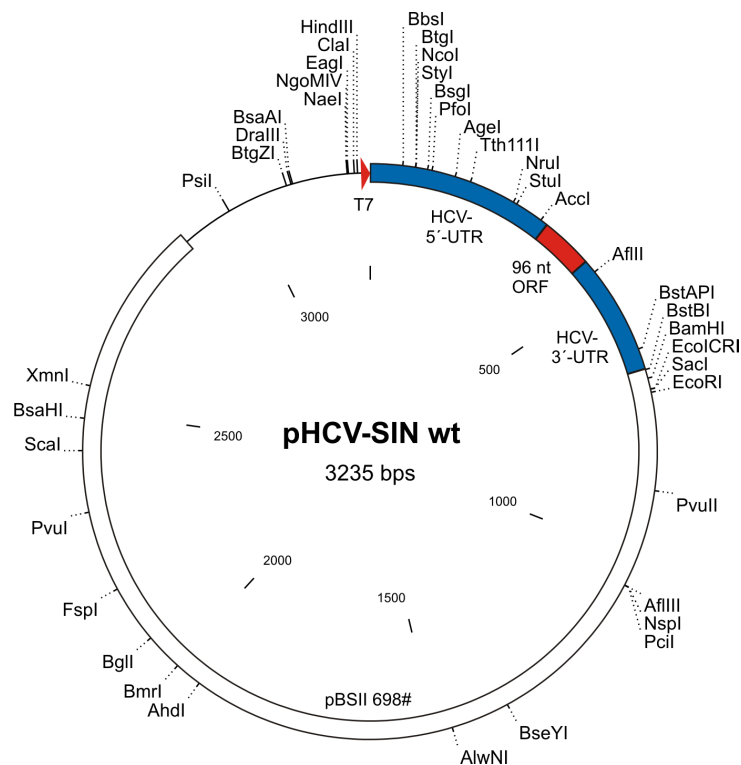
Ausgangsplasmid für die Klonierung des Plasmids pHCV- Δ 3b mit deletierter Domäne III b der HCV-5'-UTR und der Plasmide pHCV-FLuc-5mut1, pHCV-FLuc-5mut2 und pHCV-FLuc-5mut1,2 mit mutierten miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR. Die Generierung von DNA-Matrizen zur Transkription von Reporter-RNAs dieser Plasmide mit und ohne HCV-3'-UTR erfolgte mittels PCR. Die Karte zeigt Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen, die nur je einmal auf dem Molekül vorkommen.



Name	Start	Ende	Beschreibung
HCV-5'-UTR	1	341	5'-untranslatierte Region des HCV (Wildtyp)
HCV-Core	342	606	265 Nukleotide der codierenden Sequenz des HCV-Core-Proteins Startcodon (AUG) in Position 342 - 344
Ubi	608	823	Ubiquitinsequenz
FLuc	837	2489	Firefly-Luziferasegen
HCV-3'-UTR	2490	2710	3'-untranslatierte Region des HCV (Wildtyp)
pBSII 698#	2711	4917	Teil der Sequenz des Plasmids pBluescript II mit der codierenden Sequenz für beta-Laktamase (Ampicillin Resistenz)
CMV	5251	5829	Cytomegalievirus <i>immediate early</i> Promotor
T7	5856	5872	T7-RNA-Polymerase-Promotor

Plasmidkarte pHCV-SIN wt

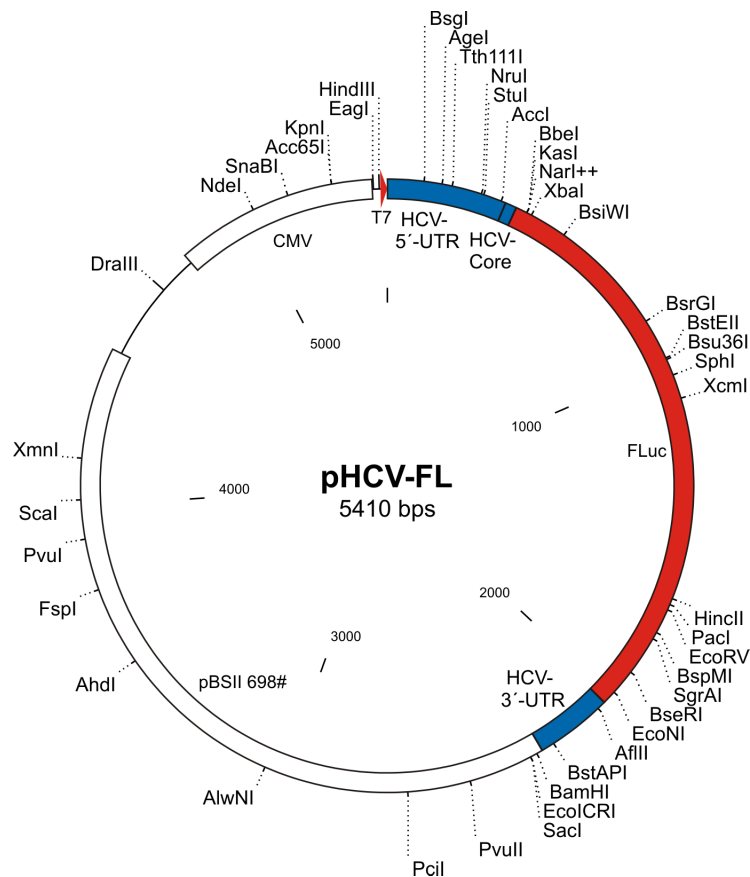
Ausgangsplamid zur Klonierung des Plasmids pHCV-SIN 5mut1,2 mit mutierten miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR. Die Generierung von DNA-Matrizen zur Transkription von RNAs dieser Plasmide mit und ohne HCV-3'-UTR erfolgte mittels PCR. Die RNAs wurden für die RNA-Protein-Crosslink-Experimente und zur Analyse von Transkriptions-Initiationskomplexen verwendet. Die Karte zeigt Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen, die nur je einmal auf dem Molekül vorkommen.



Name	Start	Ende	Beschreibung
HCV-5'-UTR	1	341	5'-untranslatierte Region des HCV (Wildtyp)
96 nt ORF	342	437	offener Leserahmen mit einer Länge von 96 Nukleotiden, bestehend aus 61 Nukleotiden der codierenden Sequenz des HCV-Core-Proteins und 35 Nukleotiden der codierenden Sequenz der Firefly-Luziferase Startcodon (AUG) in Position 342 - 344
HCV-3'-UTR	438	658	3'-untranslatierte Region des HCV (Wildtyp)
pBSII 698#	659	2865	Teil der Sequenz des Plasmids pBluescript II mit der codierenden Sequenz für beta-Laktamase (Ampicillin Resistenz)
T7	3219	3235	T7-RNA-Polymerase-Promotor

Plasmidkarte pHCV-FL

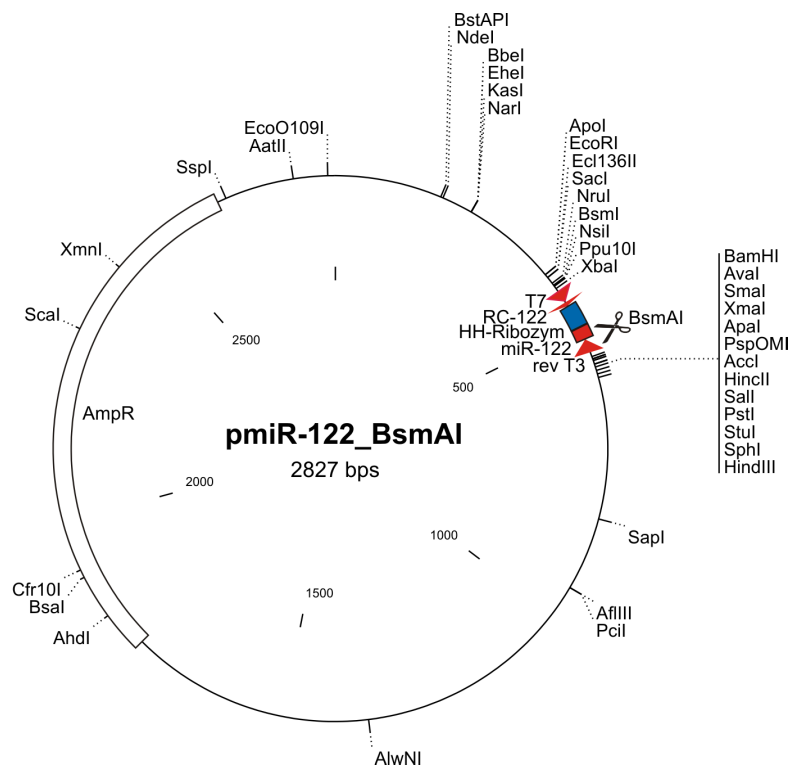
Plasmid zur Herstellung von HCV-Reporter-RNAs zur Untersuchung eines Effektes der miR-122 auf die translationsinhibierende RNA-RNA-Interaktion in der HCV-RNA zwischen Nukleotiden der HCV-5'-UTR und des HCV-Core-Proteins. Die Generierung von DNA-Matrizen zur Transkription der Reporter-RNAs erfolgte mittels PCR. Die Karte zeigt Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen, die nur je einmal auf dem Molekül vorkommen.



Name	Start	Ende	Beschreibung
HCV-5'-UTR	1	341	5'-untranslatierte Region des HCV (Wildtyp)
HCV-Core	342	374	33 Nukleotide der codierenden Sequenz des HCV-Core-Proteins Startcodon (AUG) in Position 342 - 344
FLuc	375	2027	Firefly-Luziferasegen
HCV-3'-UTR	2028	2248	3'-untranslatierte Region des HCV (Wildtyp)
pBSII 698#	2249	4455	Teil der Sequenz des Plasmids pBluescript II mit der codierenden Sequenz für beta-Laktamase (Ampicillin Resistenz)
CMV	4789	5367	Cytomegalievirus <i>immediate early</i> Promotor
T7	5393	5410	T7-RNA-Polymerase-Promotor

Plasmidkarte pmiR-122_BsmAI

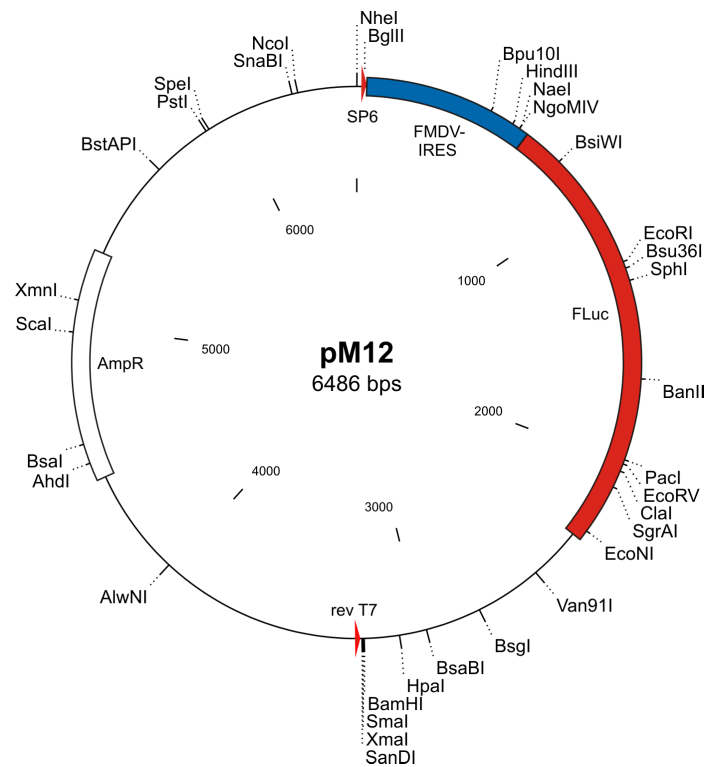
Die Plasmidkarte pmiR-122_BsmAI (Ausgangsplasmid pUC57, Ampicillin-Resistenz) ist stellvertretend für die Plasmide pmiR-124_BsmAI/pmiR-122mut_BsaI (Ausgangsplasmid pEZSeq-Kan, Kanamycin-Resistenz) gezeigt. Die Plasmide enthalten die Sequenz der reifen miR-122 beziehungsweise der mutierten miR-122 oder der reifen miR-124. Die Generierung von DNA-Matrizen zur Transkription der miR-122 oder miR-124 mit 5'-terminalem Hammerhead-Ribozym erfolgte durch Spaltung der Plasmid-DNA mit der Restriktionsendonuklease BsmAI hinter den miRNA-Sequenzen. Zur Generierung von Transkriptionsmatrizen der miR-122mut wurde die Plasmid-DNA pmiR-122mut-BsaI mit der Restriktionsendonuklease BsaI hinter der miRNA-Sequenz gespalten. Die Karte zeigt Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen, die nur je einmal auf dem Molekül vorkommen.



Name	Start	Ende	Beschreibung
T7	431	453	T7-RNA-Polymerase-Promotor
RC-122	454	459	6 Nukleotide revers-komplementär zum 5'-Ende der miR-122 zur Bildung der Sekundärstruktur des Hammerhead-Ribozyms
HH-Ribozym	460	499	Sequenz des Hammerhead-Ribozyms
miR-122	500	521	Sequenz der microRNA miR-122 (Wildtyp)
rev T3	528	551	T3-RNA-Polymerase-Promotor auf dem Gegenstrang
AmpR	1767	2627	codierende Sequenz für beta-Laktamase (Ampicillin-Resistenz)

Plasmidkarte pM12

Die Generierung von DNA-Matrizen zur Transkription einer FMDV-IRES wurde die Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Karte zeigt Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen, die nur je einmal auf dem Molekül vorkommen.



Name	Start	Ende	Beschreibung
SP6	8	24	SP6-RNA-Polymerase-Promotor
FMDV-IRES	38	663	interne Ribosomen-Eintrittsstelle des Maul- und Klauenseuchevirus (FMDV, <i>foot-and-mouth disease virus</i>) 11. AUG (Startcodon) direkt vor dem Firefly-Luziferasegen
FLuc	664	2313	Firefly-Luziferasegen
rev T7	528	551	T7-RNA-Polymerase-Promotor auf dem Gegenstrang
AmpR	4424	5284	codierende Sequenz für beta-Laktamase (Ampicillin-Resistenz)

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
β-Me	β-Mercaptoethanol
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	Cytosin
Ci	Curie
CMV	Cytomegalievirus
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxy Spiro {1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphat)
CTP	Cytosintriphosphat
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EMCV	Encephalomyocarditisvirus
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FBS	fötales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FLuc	Firefly-Luziferase (aus <i>Photinus pyralis</i>)
FMDV	Maul- und Klauenseuchevirus (<i>foot-and-mouth disease virus</i>)
x g	Fallbeschleunigung (lat. gravitas „die Schwere“; 9,81 m/sec)
G	Guanin
GMP-PNP	Guanylyl-imidodiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HCV	Hepatitis C Virus
IRES	interne Ribosomen-Eintrittsstelle
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
μM	Mikromol/l
M	mol/l
mat	reif (<i>mature</i>)
mM	Millimol/l
min	Minute(n)
miR	microRNA
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
mut	Mutante
n	Nano-

NS	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
OMe	2'-O-methyliert
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
p	Pico-
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	pondus hydrogenii (negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration)
pmol	Picomol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RLuc	<i>Renilla</i> -Luziferase (aus <i>Renilla reniformis</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
RRL	Kaninchen-Retikulozytenlysate (<i>rabbit reticulocyte lysate</i>)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Stem-loop	Faltung einzelsträngiger RNA zu doppelsträngigen Bereichen durch Basenpaarung zwischen kurzen benachbarten Bereichen komplementärer Sequenzen (<i>stem</i>). Intervenierende, nicht komplementäre RNA-Sequenzen werden ausgeschlossen und bilden eine Schleifen- oder Blasenstruktur aus (<i>loop</i> oder <i>bulge</i>).
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-Essigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierte Region (<i>untranslated region</i>)
UV	ultraviolett
v/v	volume/volume (Volumen/Volumen)
w/v	weight/volume (Gewicht/Volumen)
wt	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Struktur und Genomorganisation des Hepatitis C Virus.....	3
Abb. 1.2:	Modell des Infektionszyklus des Hepatitis C Virus	6
Abb. 1.3:	Der Mechanismus der m ⁷ G-Kappen-abhängigen Translations-Initiation bei Eukaryoten	8
Abb. 1.4:	Schematische Darstellung der Translations-Initiation an der HCV-IRES	11
Abb. 1.5:	Modell der Biogenese von microRNAs und ihrer Funktion	14
Abb. 1.6:	Die leberspezifische miR-122 stimuliert die Translation monocistronischer HCV-Reporter-RNAs	17
Abb. 2.1:	Die untranslatierten Regionen der HCV-RNA weisen drei potentielle Interaktionsstellen für die miR-122 auf	20
Abb. 2.2:	Die Determinanten für die Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 liegen in der HCV-5'-UTR	22
Abb. 2.3:	Die miR-122-Zielsequenzen und ihre Substitutionsmutanten in der HCV-5'-UTR	23
Abb. 2.4:	miR-122 stimuliert die HCV-Translation durch Interaktion mit beiden Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR.....	24
Abb. 2.5:	Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der Nukleotide 1 – 570 der HCV-RNA	26
Abb. 2.6:	Die Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 in Zellen beruht nicht auf einem Struktureffekt	27
Abb. 2.7:	miR-122 stimuliert die Bildung von 48S-Initiationskomplexen mit der HCV-RNA	30
Abb. 2.8:	miR-122 ko-migriert mit der HCV-RNA	32
Abb. 2.9:	microRNAs sind mit 80S Ribosomen assoziiert	33
Abb. 2.10:	miR-122 beschleunigt die Assoziation der HCV-RNA mit der kleinen 40S-ribosomalen Untereinheit	34
Abb. 2.11:	miR-122 mu stimuliert die Bildung von 80S-Ribosomen mit der mutierten HCV-RNA in HeLa-Zellen	36
Abb. 2.12:	Die miR-122 schwächt die Bindung eines Proteins von etwa 68 kDa an die HCV-RNA	38
Abb. 2.13:	Die Interaktion des 68 kDa-Proteins mit der HCV-RNA kann durch Inaktivierung der miR-122 wieder hergestellt werden	39
Abb. 2.14:	Die Prozessierung von miR-122-Duplexen in Zellextrakt ist nicht ausreichend, um die Interaktion des 68 kDa-Proteins mit der HCV-RNA zu unterbinden	40
Abb. 2.15:	Das 68 kDa-Protein interagiert mit der HCV-5'-UTR	42
Abb. 2.16:	Bei dem 68 kDa-Protein handelt es sich nicht um Serumalbumin	43
Abb. 2.17:	Organisation viraler IRES-Elemente	44
Abb. 2.18:	Das 68 kDa-Protein interagiert mit der FMDV-IRES	45
Abb. 2.19:	Herstellung intern radioaktiv markierter microRNAs	48
Abb. 2.20:	Prozessierung und Aufreinigung intern radioaktiv markierter miR-122	49
Abb. 2.21:	Die miR-122 kompetiert mit der HCV-RNA um die Bindung des 68 kDa-Proteins	51
Abb. 2.22:	Anreicherung der RNA-Protein-Crosslinks mittels Fe(III)-IMAC	55
Abb. 2.23:	Auftrennung der RNA-Protein-Crosslinks mittels 2D-Gelelektrophorese	57
Abb. 2.24:	Analyse des 68 kDa-Proteins mittels MALDI-TOF-MS aus HeLa-Extrakt	58
Abb. 2.25:	Proteinidentifizierung mittels Mascot-Datenbankanalyse	59
Abb. 2.26:	Auftrennung der RNA-Protein-Crosslinks mittels 2D-Gelelektrophorese	60
Abb. 2.27:	Isolierung der aufgetrennten Proteine eines UV-Crosslink-Experimentes aus einem SDS-Gel	61
Abb. 2.28:	Elutionsprofil der rpHPLC des UV-Crosslink-Ansatzes aus Huh7-Zellextrakt	64

Abb. 2.29: Analyse der durch rpHPLC fraktionierten Reinigung des analytischen UV-Crosslink-Ansatzes aus Huh7-Zellextrakt mittels SDS-PAGE	65
Abb. 2.30: Elutionsprofil der rpHPLC des UV-Crosslink-Ansatzes aus Huh7-Zellextrakt	66
Abb. 2.31: Analyse der durch rpHPLC fraktionierten Reinigung des analytischen UV-Crosslink-Ansatzes aus Huh7-Zellextrakt mittels SDS-PAGE	67
Abb. 2.32: Aufreinigung eines präparativen UV-Crosslink-Ansatzes mittels rpHPLC	68
Abb. 2.33: Analyse der durch rpHPLC fraktionierten Reinigung des präparativen UV-Crosslink-Ansatzes aus Huh7-Zellextrakt mittels SDS-PAGE	69
Abb. 2.34: Auftrennung der vorgereinigten RNA-Protein-Crosslinks mittels 2D-Gelelektrophorese	70
Abb. 2.35: Aufreinigung eines präparativen UV-Crosslink-Ansatzes mittels rpHPLC	71
Abb. 2.36: Analyse der durch rpHPLC fraktionierten Reinigung des präparativen UV-Crosslink-Ansatzes aus Huh7-Zellextrakt mittels SDS-PAGE	72
Abb. 2.37: Präparative 1D-Gelelektrophorese der vorgereinigten Proteine	73
Abb. 2.38: Analyse des Proteins der Bande 1 aus dem präparativen 1D-SDS-Gel mittels MALDI-TOF-MS	74
Abb. 2.39: Identifizierung des Proteins der Bande 1 der präparativen 1D-SDS-PAGE mittels Mascot-Datenbankanalyse	75
Abb. 2.40: Analyse des Proteins der Bande 2 aus dem präparativen 1D-SDS-Gel mittels MALDI-TOF-MS	76
Abb. 2.41: Identifizierung des Proteins der Bande 2 der präparativen 1D-SDS-PAGE mittels Mascot-Datenbankanalyse	77
Abb. 2.42: Analyse der Aminosäuresequenzen der identifizierten Proteine Heat Shock Cognate 71 kDa Protein Isoform 1 und Heat Shock 70 kDa Protein 8 Isoform 2 Variant	78
Abb. 3.1: Picornvirale IRES-Elemente können die Translation eines stromaufwärts gelegenen Gens verstärken	84
Abb. 3.2: Restriktion von miRNA-Zielsequenzen auf die 3'-untranslatierte Region tierischer mRNAs	87
Abb. 3.3: Modell des Wirkmechanismus der miR-122 als positiver Regulator der HCV-Translation	91
Abb. 3.4: Faktoren, die zum Gewebetropismus des HCV beitragen	93
Abb. 4.1: Schema der zielgerichteten PCR-Mutagenese	110
Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Kapillar-Blots	111
Abb. 4.3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Elektro-Blots	112
Abb. 6.1: Analyse der Spotreihe 1 nach Auftrennung durch 2D-Gelelektrophorese (Kapitel 2.5.2, Abb. 2.26)	139
Abb. 6.2: Analyse der Spotreihe 2 nach Auftrennung durch 2D-Gelelektrophorese (Kapitel 2.5.2, Abb. 2.26)	140
Abb. 6.3: Analyse der Spotreihe 3 nach Auftrennung durch 2D-Gelelektrophorese (Kapitel 2.5.2, Abb. 2.26)	141
Abb. 6.4: Analyse des Proteins der Bande 1 aus dem präparativen 1D-SDS-Gel mittels MALDI-TOF-MS	142
Abb. 6.5: Identifizierung des Heat Shock Cognate 71 kDa Proteins aus Bande 1 der präparativen 1D-SDS-PAGE	143
Abb. 6.6: Analyse des Proteins der Bande 2 aus dem präparativen 1D-SDS-Gel mittels MALDI-TOF-MS	144
Abb. 6.7: Identifizierung des radioaktiv markierten 68 kDa-Proteins aus Bande 2 der präparativen 1D-SDS-PAGE	145

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Überblick über die eukaryotischen Translations-Initiationsfaktoren (eIFs)	9
Tab. 2.1:	Proteinidentifizierung mittels Mascot-Datenbankanalyse	59
Tab. 2.2:	Identifizierung des Proteins der Bande 1 der präparativen 1D-SDS-PAGE mittels Mascot-Datenbankanalyse	75
Tab. 2.3:	Identifizierung des Proteins der Bande 2 der präparativen 1D-SDS-PAGE mittels Mascot-Datenbankanalyse	77
Tab. 4.1:	Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide	98
Tab. 4.2:	Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide	99
Tab. 4.3:	Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Digoxigenin-markierten DNA-Oligonukleotide	100
Tab. 4.4:	Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten RNA-Oligonukleotide	100
Tab. 6.1:	Beide miR-122-Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR sind zwischen allen HCV-Isolaten konserviert	137
Tab. 6.2:	Analyse der Spotreihe 1 nach Auftrennung durch 2D-Gelelektrophorese (Kapitel 2.5.2, Abb. 2.26)	139
Tab. 6.3:	Analyse der Spotreihe 2 nach Auftrennung durch 2D-Gelelektrophorese (Kapitel 2.5.2, Abb. 2.26)	140
Tab. 6.4:	Analyse der Spotreihe 3 nach Auftrennung durch 2D-Gelelektrophorese (Kapitel 2.5.2, Abb. 2.26)	141
Tab. 6.5:	Identifizierung des Heat Shock Cognate 71 kDa Proteins aus Bande 1 der präparativen 1D-SDS-PAGE	143
Tab. 6.6:	Identifizierung des radioaktiv markierten 68 kDa-Proteins aus Bande 2 der präparativen 1D-SDS-PAGE	145

Publikationen

Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M. (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* 27:3300-10.

Jünemann C, Song Y, Bassili G, Goergen D, Henke J, Niepmann M. (2007) Picornavirus internal ribosome entry site elements can stimulate translation of upstream genes. *J. Biol. Chem.* 282:132-41.

Kongressbeiträge

Henke J, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Jünemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of Hepatitis C Virus RNA.

14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, September 2007, Glasgow, UK.

Jünemann C, Song Y, Bassili G, Goergen D, Henke J, Niepmann M. Translation enhancement: IRES elements can stimulate translation of upstream genes in dicistronic vectors.

14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, September 2007, Glasgow, UK.

Jünemann C, Song Y, Bassili G, Goergen D, Henke J, Niepmann M. Translation enhancement: IRES elements can stimulate translation of upstream genes in dicistronic vectors.

3rd European Congress of Virology, September 2007, Nürnberg, Deutschland.

Henke J, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler C, Jünemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of Hepatitis C Virus RNA.

15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oktober 2008, San Antonio, TX, USA.

Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M. microRNA-122 enhances translation of the hepatitis C virus RNA through interaction with the 5'-UTR.

19th Annual Meeting of the Society for Virology, März 2009, Leipzig, Deutschland.

Goergen D, Henke JI, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M. The liver-specific microRNA-122 stimulates translation of the hepatitis C virus RNA by increasing 48S complex formation efficiency.

19th Annual Meeting of the Society for Virology, März 2009, Leipzig, Deutschland.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben und durch ihre Unterstützung wesentlich zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Albrecht Bindereif für die freundliche Übernahme des Referates am Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen und für sein stets großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Michael Niepmann am Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Dank für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für seine Begleitung bei der Entstehung dieser Arbeit, die er durch seine ständige Diskussionsbereitschaft, Anregungen und konstruktiven Hilfestellungen maßgeblich gefördert hat.

Des Weiteren möchte ich Herrn Privatdozenten Dr. Günter Lochnit und seinen Mitarbeitern der Proteinanalytik-Abteilung des Biochemischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung diverser Arbeiten auf dem Weg zur Proteinidentifizierung danken.

Herzlich gedankt sei auch meinen Kolleginnen Christiane Bung, Carmen Fehr, Juliane Hirnet und ganz besonders Dagmar Goergen, sowie meinen ehemaligen Kollegen Dr. Christiane Jünemann, Dr. Yutong Song und Herrn Prof. Dr. Ewald Beck und seiner gesamten Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft, konstruktiven Anregungen, Unterstützung jeglicher Art und die tolle Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders danke ich meiner Familie für die konstante und in jeder Form gewährte Unterstützung während meines Studiums und meiner Doktorarbeitszeit.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, im März 2010

Jura Inga Henke