

**Effekt der Hepatitis C Virus  
3'-untranslatierten Region und des  
3'-Poly(A)-Endes auf IRES-abhängige  
und cap-abhängige Translation**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von

**Christiane Bung**

Diplom-Biologin

Gießen, im Mai 2011

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2007 bis Mai 2011 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Niepmann im Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin 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

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Hepatitis C Virus 3'-untranslatierten Region (HCV 3'-UTR) und des 3'-Poly(A)-Anhangs sowohl auf die IRES-abhängige als auch auf die cap-abhängige Translation *in vivo* und *in vitro* untersucht.

Das Hepatitis C Virus ist ein positivsträngiges RNA-Virus, welches der Familie der Flaviviren zugeordnet wird. Die Initiation der Translation erfolgt cap-unabhängig mit Hilfe einer internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) des viralen Genoms. Eine HCV-verwandte IRES ist die des porcinen Teschovirus (PTV), welches den Picornaviren zugeordnet wird. Die PTV IRES ähnelt allerdings sowohl bezüglich seiner Struktur als auch seiner Funktionsweise der Translationsinitiation stark der HCV IRES. In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Translation an beiden IRES-Elementen durch die HCV 3'-UTR deutlich stimuliert wird. Dieser Effekt konnte allerdings auch für eine nicht HCV-verwandte IRES gezeigt werden. Die Stimulation der Aktivität verschiedener IRES-Elemente durch die HCV 3'-UTR wurde unabhängig vom untersuchten Zelltyp gefunden. Dies weist darauf hin, dass an der Translationsstimulation durch die HCV 3'-UTR eher allgemeine als leberzellspezifische Faktoren beteiligt sind. Die Stimulation der Translation durch die HCV 3'-UTR scheint demnach kein bedeutender Faktor bezüglich des Lebertropismus des Hepatitis C Virus zu sein.

In dieser Arbeit wurde neben der IRES-abhängigen Translation auch der Einfluss der HCV 3'-UTR auf die Translationsinitiation an der 5'-Cap-Struktur einer RNA untersucht. Ebenso wie bei der Initiation der Translation an viralen IRES-Elementen konnte auch hier ein positiver stimulatorischer und zelltypunabhängiger Effekt der HCV 3'-UTR auf die Translation an der Cap-Struktur nachgewiesen werden.

Wie schon für die Stimulation der cap-abhängigen Translationsinitiation durch den 3'-Poly(A)-Anhang gezeigt, konnte in der vorliegenden Arbeit auch eine zelltypunabhängige Stimulation der Translation aller untersuchten IRES-Elemente durch einen 3'-Poly(A)-Schwanz nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Stimulation sowohl der HCV IRES-abhängigen als auch der cap-abhängigen Translation durch die HCV 3'-UTR oder den 3'-Poly(A)-Anhang unabhängig von der Zellzyklusphase stattfindet, in welcher sich die Zellen befinden.

Ein spezielles Augenmerk wurde auf den Zusammenhang zwischen der Länge des 3'-Poly(A)-Anhangs und dem quantitativen Stimulationseffekt sowohl für die cap- als auch die IRES-abhängige Translation gelegt. Dabei zeigte sich *in vivo* bei beiden Arten der Translationsinitiation ein direkter Zusammenhang zwischen der Länge des Poly(A)-Endes und der Stärke der Translationsstimulation. Diese erhöht sich jedoch ab einer Poly(A)-Schwanz-Länge von mehreren hundert Adenosinen nicht mehr, so dass es hier zu einem Stimulationsplateau kommt.

Zusammengefasst deuten die Resultate der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die Stimulation der Translationsinitiation durch die verschiedenen 3'-Enden durch zumindest teilweise unterschiedliche Mechanismen bewirkt wird.

## Summary

In this study the influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region (HCV 3'-UTR) and the 3'-poly(A)-tail on IRES-dependent and cap-dependent translation was investigated *in vivo* and *in vitro*.

The hepatitis C virus is a positive strand RNA virus which belongs to the family of Flaviviruses. The initiation of translation takes place cap-independently with the help of an internal ribosome entry site (IRES) in the 5'-untranslated region (5'-UTR) of the viral genome. An HCV-related IRES is the IRES of the porcine teschovirus (PTV) which is assigned to the Picornavirus family. The PTV IRES is very similar to the HCV IRES concerning its structure and function in initiating translation. In this study it could be shown that the translation on both IRES-elements could be stimulated considerably by the HCV 3'-UTR. This effect could also be shown for a non-HCV-related IRES-element. The stimulation of the activity of different IRES-elements by the HCV 3'-UTR was found to be independent of the investigated cell types. These data suggest that in the stimulation of translation by the HCV 3'-UTR ubiquitous factors rather than liver cell-specific factors are involved. The stimulation of translation by the HCV 3'-UTR seems to be not an important factor concerning the liver tropism of the hepatitis C virus.

Besides the effect of the HCV 3'-UTR on IRES-dependent translation also its influence on translation initiation at the 5'-cap-structure of an RNA was investigated in this study. As well as for the initiation of translation on viral IRES-elements, a positive stimulatory effect of the HCV 3'-UTR on translation at the cap-structure could be detected cell type-independently.

As already shown for the stimulation of cap-dependent translation initiation by the 3'-poly(A)-tail a cell type-independent translation stimulation of all investigated IRES-elements by a poly(A)-tail could be discovered in this study. Furthermore, it could be shown that the stimulation of HCV IRES-dependent as well as cap-dependent translation by the HCV 3'-UTR or the poly(A)-tail is independent of the cell cycle phase of the transfected cells.

A focus of this study was on the interrelation of the length of the 3'-poly(A)-tail and the quantitative stimulatory effect for cap-dependent as well as IRES-dependent translation. Here a direct correlation between the length of the poly(A)-tail and the translation stimulation was found *in vivo* for both types of translation initiation. This stimulation is enhanced until the poly(A)-tail reaches several hundred adenosines, finally reaching a plateau.

Taken together the results of this study indicate that the stimulation of translation initiation by different 3'-ends is caused at least partially by different mechanisms.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Summary

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Hepatitis C Virus</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Struktur und Genomorganisation von HCV</b> .....	<b>2</b>
1.2.1	Die HCV 5'-UTR .....	5
1.2.2	Die HCV 3'-UTR .....	6
<b>1.3</b>	<b>Der Infektionszyklus des Hepatitis C Virus</b> .....	<b>7</b>
1.3.1	Anheftung und Eintritt in die Wirtszelle .....	7
1.3.2	Translation des Polyproteins und Prozessierung .....	8
1.3.3	RNA Replikation .....	8
1.3.4	HCV Zusammenbau und Freisetzung aus der Zelle .....	10
<b>1.4</b>	<b>Mechanismus der Translation</b> .....	<b>10</b>
1.4.1	Cap-abhängige Translationsinitiation bei eukaryotischen mRNAs .....	11
1.4.2	Interne Translationsinitiation bei IRES-Elementen .....	13
1.4.2.1	Einteilung und Struktur von viralen IRES-Elementen .....	14
1.4.2.2	Funktionsweise der verschiedenen IRES-Elemente .....	15
1.4.2.2.1	Anforderung der IRES-Elemente an eukaryotische Initiationsfaktoren (eIFs) ....	15
1.4.2.2.2	Anforderung der IRES-Elemente an IRES-trans-acting factors (ITAFs) .....	18
<b>1.5</b>	<b>Polyadenylierung von RNAs am 3'-Ende</b> .....	<b>21</b>
1.5.1	Polyadenylierung zellulärer mRNAs .....	21
1.5.2	Polyadenylierung viraler RNAs .....	24
1.5.3	Stimulation der cap-abhängigen Translation durch einen 3'-Poly(A)-Anhang .....	25
<b>1.6</b>	<b>Der Zellzyklus</b> .....	<b>27</b>
1.6.1	Einfluss von Viren auf den Zellzyklus .....	28
<b>1.7</b>	<b>Ziele dieser Arbeit</b> .....	<b>29</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1</b>	<b>Mikrobiologie</b> .....	<b>30</b>
2.1.1	Bakterienstämme .....	30
2.1.2	Nährboden und Flüssigmedium .....	30
2.1.3	Antibiotika .....	30
2.1.4	Herstellung von elektrokompetenten Bakterien .....	30
2.1.5	Transformation von Plasmid DNA in elektrokompetente Bakterien .....	31
2.1.6	Herstellung von Bakterien-Glycerin-Stocks.....	31

<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologie</b> .....	<b>31</b>
2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA .....	31
2.2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation) .....	31
2.2.1.2	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräparation) .....	32
2.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	33
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	34
2.2.4	Klonierungen .....	34
2.2.4.1	Dephosphorylierung von 5'-Enden .....	35
2.2.4.2	Ligation von DNA Fragmenten .....	35
2.2.5	Herstellung von DNA-Templates für die <i>in vitro</i> -Transkription .....	35
2.2.5.1	Reinigung von Nukleinsäuren .....	36
2.2.5.1.1	Proteinase-K Verdau .....	36
2.2.5.1.2	Phenol/Chloroform-Extraktion .....	36
2.2.5.1.3	Ethanol-Präzipitation von Nukleinsäuren .....	36
2.2.6.0	<i>In vitro</i> -Transkription .....	36
2.2.6.1	<i>In vitro</i> -Transkription von gecappter RNA .....	37
2.2.6.2	Polyadenylierung von <i>in vitro</i> -transkribierter RNA .....	37
2.2.7	RNA Aufreinigung .....	38
2.2.7.1	Aufreinigung aus Lösungen mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen .....	38
2.2.7.2	Aufreinigung durch LiCl-Fällung .....	39
2.2.7.3	RNA-Aufreinigung aus Zelllinien .....	39
2.2.8	<i>In vitro</i> -Translation .....	39
2.2.8.1	Translation in Kaninchen-Lysat .....	39
2.2.8.2	Translation in Pierce Thermo Scientific Lysat .....	40
2.2.9	Messung der Luciferase-Aktivität .....	40
<b>2.3</b>	<b>Zellkultur</b> .....	<b>40</b>
2.3.1	Verwendete Zelllinien .....	40
2.3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	41
2.3.3	Kultivierung von eukaryotischen Zellen .....	41
2.3.4	Aussäen von Zellen für Transfektionen .....	41
2.3.5	Transfektion von Reporter-RNA in Zelllinien .....	42
2.3.5.1	Transfektion durch Lipofektion .....	42
2.3.5.2	Transfektion durch Elektroporation .....	42
2.3.6	Synchronisation von Zellen in verschiedenen Zellzyklus-Phasen .....	42
2.3.6.1	Synchronisation in der G2-/M-Phase durch Nocodazol-Behandlung und Shake-Off .....	43
2.3.6.2	Synchronisation in der G1-/S-Phase durch Nocodazol, Shake-Off und Thymidin .....	43
2.3.6.3	Synchronisation in der G0-Phase durch Wachstum bis zu 100 %iger Konfluenz	43

2.3.7	WST1-Test .....	44
<b>2.4</b>	<b>Verwendete Plasmide .....</b>	<b>44</b>
<b>2.5</b>	<b>Verwendete Oligonukleotide .....</b>	<b>45</b>
<b>2.6</b>	<b>Verwendete Restriktionsenzyme .....</b>	<b>46</b>
<b>2.7</b>	<b>Lösungen und Puffer .....</b>	<b>46</b>
<b>2.8</b>	<b>Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Reagenzien .....</b>	<b>47</b>
<b>2.9</b>	<b>Verzeichnis der Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>48</b>
<b>2.10</b>	<b>Verzeichnis der verwendeten Geräte .....</b>	<b>48</b>
<b>2.11</b>	<b>Verwendete Kits .....</b>	<b>49</b>
<b>2.12</b>	<b>Andere Enzyme .....</b>	<b>49</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Der Einfluss der Hepatitis C Virus 3'-UTR auf die Translation durch die IRES des Hepatitis C Virus und Porcinen Teschovirus .....</b>	<b>50</b>
3.1.1	Die HCV 3'-UTR stimuliert die Translation von HCV und PTV IRES-abhängiger Translation <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .....	51
3.1.2	Eine Sequenzverlängerung nach dem Reporter gen wird für eine korrekte Translation benötigt .....	54
3.1.3	Verschiedene Deletionen innerhalb der HCV 3'-UTR reduzieren die Stimulation der Translation von HCV und PTV IRES .....	59
<b>3.2</b>	<b>Einfluss eines Poly(A)-Anhangs auf die Translation .....</b>	<b>62</b>
3.2.1	Ein Poly(A)-Anhang von 50 A stimuliert die IRES-abhängige Translation .....	62
3.2.2	Ein Poly(A)-Anhang und die HCV 3'-UTR stimulieren die cap-abhängige Translation <i>in vivo</i> .....	66
<b>Exkurs</b>	<b>Mögliche Probleme der Normalisierung bei Kotransfektion eines Renilla Reporters .....</b>	<b>68</b>
<b>3.3</b>	<b>Einfluss des Zellzyklus auf die Stimulation der Translation .....</b>	<b>78</b>
3.3.1	Die Stimulation der Translation durch die HCV 3'-UTR wird durch den Zellzyklus nicht beeinflusst .....	78
3.3.2	Die Translationsstimulation durch einen Poly(A)-Anhang wird im Zellzyklus nicht verändert .....	80
<b>3.4</b>	<b>Einfluss der Länge des Poly(A)-Anhangs auf die Translationsstimulation..</b>	<b>82</b>
<b>4.</b>	<b>Schlussdiskussion .....</b>	<b>94</b>
<b>4.1</b>	<b>Die HCV 3'-UTR stimuliert die IRES-abhängige Translation der HCV und PTV IRES zelltypunabhängig .....</b>	<b>94</b>

4.2	Stimulation der IRES-abhängigen Translation durch einen 3'-Poly(A)-Anhang .....	100
4.3	Stimulation der cap-abhängigen Translation durch die HCV 3'-UTR .....	103
4.4	Einfluss der Länge des Poly(A)-Anhangs auf cap- und IRES-abhängige Translation.....	104
5.	Literaturverzeichnis .....	107
	Plasmidkarten.....	127
	Annotierte Sequenz der HCV Reporter-Plasmide .....	132
	Abkürzungsverzeichnis und Glossar .....	138
	Abbildungsverzeichnis .....	141
	Tabellenverzeichnis .....	143
	Wissenschaftliche Veröffentlichungen .....	144
	Danksagungen.....	145
	Eidesstattliche Erklärung .....	146



## 1. Einleitung

Viren sind kleine infektiöse Partikel aus Proteinen, die bei einigen Virustypen von einer Lipidmembran umgeben sind, und die als Erbinformation entweder DNA oder RNA enthalten. Sie besitzen keinen eigenen Stoffwechsel und sind für ihre Vermehrung auf eine lebende Wirtszelle angewiesen. Da sie sich nicht durch Teilung vermehren können, müssen sie innerhalb einer Wirtszelle aus den einzelnen Molekülen zusammengebaut werden (Assembly).

Viren können sowohl Menschen und Tiere, als auch Pflanzen und Bakterien befallen. Eine Infektion kann je nach Virus für den Wirt sehr unterschiedliche Auswirkungen haben. Die Symptombandbreite reicht dabei von völliger Symptommfreiheit bis hin zum Tod.

Eine erste Einteilung der Viren erfolgt aufgrund ihrer Genomstruktur und der damit verbundenen Replikationsstrategie (Baltimore-Klassifikation). Dabei unterscheidet man zunächst zwischen einzel- oder doppelsträngigen DNA- bzw. RNA-Viren. Einzelsträngige RNA-Viren werden außerdem danach unterteilt, ob ihr Genom in positiver oder negativer Orientierung vorliegt. Eine RNA mit positiver Orientierung kann in der Zelle sofort translatiert werden, wohingegen ein negativ-orientierter RNA-Strang erst umgeschrieben werden muss. RNA-Viren besitzen durch die Fehleranfälligkeit der RNA-Polymerase eine hohe Mutationsrate, was zu einer schnellen Evolution und Ausbildung von Quasispezies führt.

Neben der Art der Nukleinsäure können allerdings auch morphologische Merkmale bei der Einteilung der Viren betrachtet werden. Dazu gehören die Form der Kapside oder das Vorhandensein einer Hülle (Envelope). Ein einfach strukturiertes Virus besteht aus der die Erbinformation tragende Nukleinsäure, welche in einer Proteinhülle (Kapsid) verpackt ist. Manche Viren erhalten beim Durchdringen von zellulären Membranen eine zusätzliche Hülle, in die sowohl gegebenenfalls zelluläre als auch virale Proteine eingelagert sind. „Nackte“ Viren besitzen im Gegensatz zu den umhüllten Viren unter anderem eine höhere Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen sowie eine höhere Anpassungsfähigkeit, da eine Virushülle in der Regel empfindlicher gegenüber beispielsweise Austrocknung oder Desinfektionsmitteln ist.

Diese Arbeit beschäftigt sich unter anderem mit der Translation des Hepatitis C Virus (HCV), dem Erreger der Hepatitis C.

### 1.1 Das Hepatitis C Virus

Da das Virus bis zu seiner Identifizierung 1989 (Choo et al., 1989) mit der bekannten Diagnostik für Hepatitis A und B Viren nicht nachweisbar war, wurde der Erreger den Nicht-A/Nicht-B Hepatitisviren zugeordnet. Eine Infektion war häufig nach Bluttransfusionen beobachtet worden. Erst nach der Identifizierung und den damit verbundenen neuen diagnostischen Methoden wurde die Infektionsrate nach Bluttransfusionen deutlich reduziert. Trotzdem sind nach heutigen Schätzungen der WHO weltweit ca. 3 % der Bevölkerung mit dem Hepatitis C Virus infiziert. Ein sehr hoher Prozentsatz von 70 – 80 % der Infektionen

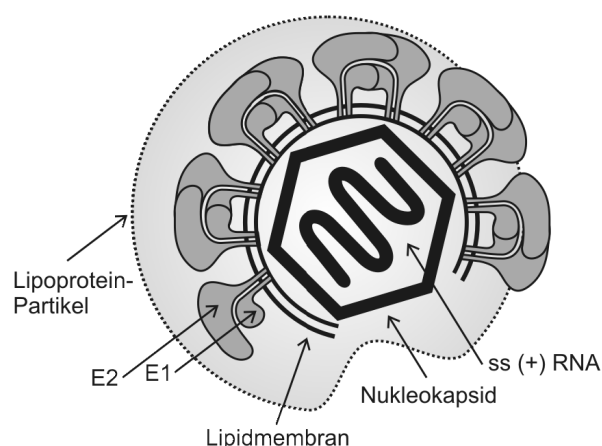
verlaufen chronisch und bei ca. 20 % dieser chronischen Verläufe tritt später eine Leberzirrhose auf, die zur Notwendigkeit einer Lebertransplantation oder sogar zum Tod führen kann. Eine vorbeugende Schutzimpfung gegen HCV konnte bisher noch nicht entwickelt werden. Eine antivirale Therapie ist die Gabe von hochdosiertem Interferon- $\alpha$  und Ribavirin, einem Guanosin-Analogon, was bei ca. 40 % der Infizierten zu einer Eliminierung der RNA im Serum führt.

Aufgrund seiner Genomstruktur und seiner molekularen Eigenschaften wird das Hepatitis C Virus in die Familie der *Flaviviridae* eingeordnet. Andere Vertreter dieser Virusfamilie sind z.B. das Gelbfiebervirus oder das klassische Schweinepestvirus. Innerhalb der Familie stellt HCV den einzigen Vertreter des Genus *Hepacivirus* dar.

Aufgrund der hohen Variabilität der Viren werden sie in Genotypen und Subtypen eingeteilt. Eine Klassifikation für HCV erfolgt in 6 Genotypen, wobei die Genotypen 1 - 3 weltweit verbreitet sind, der Genotyp 4 vor allem in Afrika, Genotyp 5 in Südafrika und Genotyp 6 besonders in Asien vorkommt (Bartenschlager et al., 2004). Die häufigsten Subtypen in westlichen Ländern sind Genotyp 1a, 1b, 2a, 2b und 2c.

## 1.2 Struktur und Genomorganisation von HCV

Das Hepatitis C Virus besitzt ein einzelsträngiges, positiv orientiertes RNA-Genom. Die Nukleinsäure wird von einem Kapsid aus viruskodierten Core-Proteinen umgeben (Penin et al., 2004b). Das Kapsid wird von einer Virusenvelope umhüllt, in dessen Membran die viralen Oberflächenproteine E1 und E2 verankert sind. Beide Proteine sind glykosyliert und bilden ein Heterodimer in der Hülle des Virions. Der Durchmesser der Viren wird mit ca. 40 - 70 nm angegeben (Kaito et al., 1994; Wakita et al., 2005). Infektiöse HCV Partikel sind häufig mit Lipoproteinen assoziiert und werden auch als Lipo-Viro-Partikel bezeichnet (Abbildung 1.1).



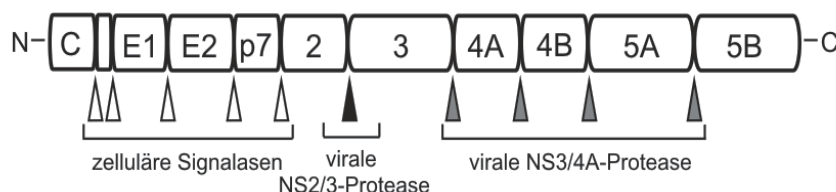
**Abbildung 1.1: Modell des Hepatitis C Viruspartikels.** Das einzelsträngige RNA-Genom ist verpackt in das aus Core-Proteinen bestehende Kapsid. Umhüllt wird dieses Nukleokapsid von einer Membranhülle, in die die viralen Glykoproteine E1 und E2 als Heterodimere eingelagert sind. Die infektiösen Viren sind mit Lipoproteinen assoziiert. Abbildung modifiziert nach Bartenschlager et al., 2004.

Das einzelsträngige RNA Genom des Virus besitzt eine Länge von ca. 9.600 Nukleotiden. Es weist eine positive Orientierung auf, so dass es wie eine zelluläre mRNA direkt dem Translationsapparat der Zelle zur Verfügung gestellt werden kann. Das Genom hat nur einen offenen Leserahmen (open reading frame, ORF) und kodiert somit für nur ein Polyprotein mit einer Größe von ca. 3.100 Aminosäuren (AS). Eine schematische Darstellung der HCV-RNA inklusive der beiden untranslatierten Regionen (UTRs) ist in Abbildung 1.2 gezeigt.



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des HCV Genoms.** Die einzelsträngige, positiv-orientierte Virus RNA codiert mit nur einem offenen Leserahmen (ORF) für das HCV Polyprotein. Dieser ORF wird an beiden Seiten von zwei untranslatierten Regionen (UTRs) flankiert, der 5'-UTR und der 3'-UTR. Abbildung modifiziert nach Bartenschlager et al., 2004.

Am N-terminalen Ende des ORFs sind die HCV Strukturproteine für Core, E1 und E2 codiert, gefolgt von einem noch nicht vollständig charakterisierten Protein p7. Am C-terminalen Ende der RNA sind die Nichtstrukturproteine NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B codiert. Das virale Polyprotein wird mit Hilfe von sowohl zellulären als auch viralen Proteasen in seine funktionalen Proteine gespalten (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3: Organisation des HCV Polyproteins.** Am N-terminalen Ende des Polyproteins befinden sich die viralen Strukturproteine. Das Core-Protein (C), die viralen Oberflächenproteine E1 und E2 und das Protein p7 werden mit Hilfe von zellulären Signalasen gespalten. Die C-terminalen Nichtstrukturproteine (NS) 2 - 5B werden durch die viruskodierten Proteasen prozessiert.

Die Spaltung des Polyproteins in die viralen Strukturproteine findet im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. Hier bewirkt eine Signalase zwei Spaltungen, so dass sowohl das Core-Protein als auch die beiden Oberflächenproteine E1 und E2 freigesetzt werden.

Das HCV Core-Protein bildet als Multimer das Nukleokapsid des Virus (Yasui et al., 1998). Es besitzt eine Molmasse von 21 kDa und hat eine hohe Affinität zu RNA. Außerdem werden weitere zelluläre Prozesse von diesem Protein beeinflusst. Die Virusproteine E1 und E2 sind 35 bzw. 70 kDa große glykosylierte Transmembranproteine, die als nicht-kovalente Heterodimere Bestandteil der HCV Hülle sind (Deleersnyder et al., 1997). Für die Bindung des Virus an die Zielzelle scheint vor allen Dingen E2 verantwortlich zu sein, wohingegen E1 wohl am anschließenden Fusionsprozess beteiligt ist (Flint und McKeating., 2000; Rosa et al., 1996). Neben diesen Strukturproteinen konnte bei chronisch-infizierten Patienten noch ein Frameshift-Protein (F- oder ARFP-Protein) mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden (Walewski et al., 2001). Es entsteht durch eine Leserasterverschiebung in der Core-Region. Die Funktion ist noch weitgehend ungeklärt.

Stromabwärts der viralen Strukturproteine sind die Nichtstrukturproteine codiert. Ein recht kleines Protein mit einem Molekulargewicht von 7 kDa (p7) erfüllt die Funktion eines integralen Membranproteins (Carrere-Kremer et al., 2002). Dieses essentielle Protein wird den Viroporinen zugeordnet und scheint die Funktion eines Kalzium-Ionen-Kanals zu haben (Griffin et al., 2003; Gonzalez und Carrasco, 2003).

Für die Prozessierung der HCV Nichtstrukturproteine sind zwei virale Proteasen essentiell, NS3 und NS2 - NS3. Die Autoprotease NS2-NS3 ist nur für die Spaltung von NS2 und NS3 verantwortlich. Alle anderen Spaltungen werden von der Serinprotease NS3 durchgeführt, dabei spielt NS4A als Kofaktor eine Rolle (Bartenschlager 1999). NS3-NS4A hat neben der proteolytischen Funktion auch die einer Helikase/NTPase. Dadurch kann z.B. für die Replikation RNA gebunden und leichter entwunden werden (Gwack et al., 1997; Tai et al., 1996). Durch ihre vielseitige Funktion ist NS3-NS4 eines der beliebtesten Ziele für antivirale Medikamente (Pawlotsky und McHutchison, 2004; Pawlotsky, 2006). NS4B mit einem Molekulargewicht von 27 kDa ist ein integrales Membranprotein (Hugle et al., 2001; Lundin et al., 2003). Seine Funktion ist die Induktion der Bildung eines membranösen Netzwerks (membranous web) für die Replikation (Egger et al., 2002; Elazar et al., 2004; Gretton et al., 2005). NS5A ist ein 56 bzw. 58 kDa großes Phosphoprotein. Es ist involviert in der Replikation des Virus (Elazar et al., 2003; Penin et al., 2004b), was jedoch noch nicht komplett aufgeklärt werden konnte. Es wurde gezeigt, dass NS5A mit Membranmikrodomänen (Lipid Rafts) assoziiert und dass diese Interaktion für die Bildung des Replikationskomplexes von Bedeutung ist (Shi et al., 2003; Tu et al., 1999; Gao et al., 2004). Außerdem weisen Studien darauf hin, dass NS5A eine Rolle bei der Interferon- $\alpha$  Resistenz spielt, indem es PKR (Proteinkinase R) bindet und inhibiert (Gale et al., 1998). NS5B hingegen erfüllt die Funktion einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Behrens et al., 1996). Dieses 68 kDa große Protein ist ebenfalls ein bedeutender Angriffspunkt bei der Entwicklung einer antiviralen Therapie (Di Marco et al., 2005; Ma et al., 2005). Eine Übersicht der HCV Virusproteine und deren Funktionen ist in Tabelle 1 gezeigt.

HCV Protein	MG (kDa)	Funktion
C (Core)	p21	Phosphoprotein, RNA-Bindung, Nukleokapsid
E1 (Envelope 1)	gp36	N-glykosyliert, Hüllprotein, Fusionsdomäne?
E2 (Envelope 2)	p70	N-glykosyliert, Hüllprotein, Rezeptor-Bindung
p7	p7	Viroporin (Ionenkanal)
NS2	p23	Teil der NS2-NS3 Autoprotease
NS3	p70	Serin-Protease, NTP -ase, RNA-Helikase
NS4A	p6	Kofaktor für NS3-NS4
NS4B	p27	Transmembranprotein
NS5A	56 bzw. 58	Phosphoprotein, Bildung von Replikationskomplexen, Interferon $\alpha$ -Resistenz
NS5B	68	RNA-abhängige RNA Polymerase

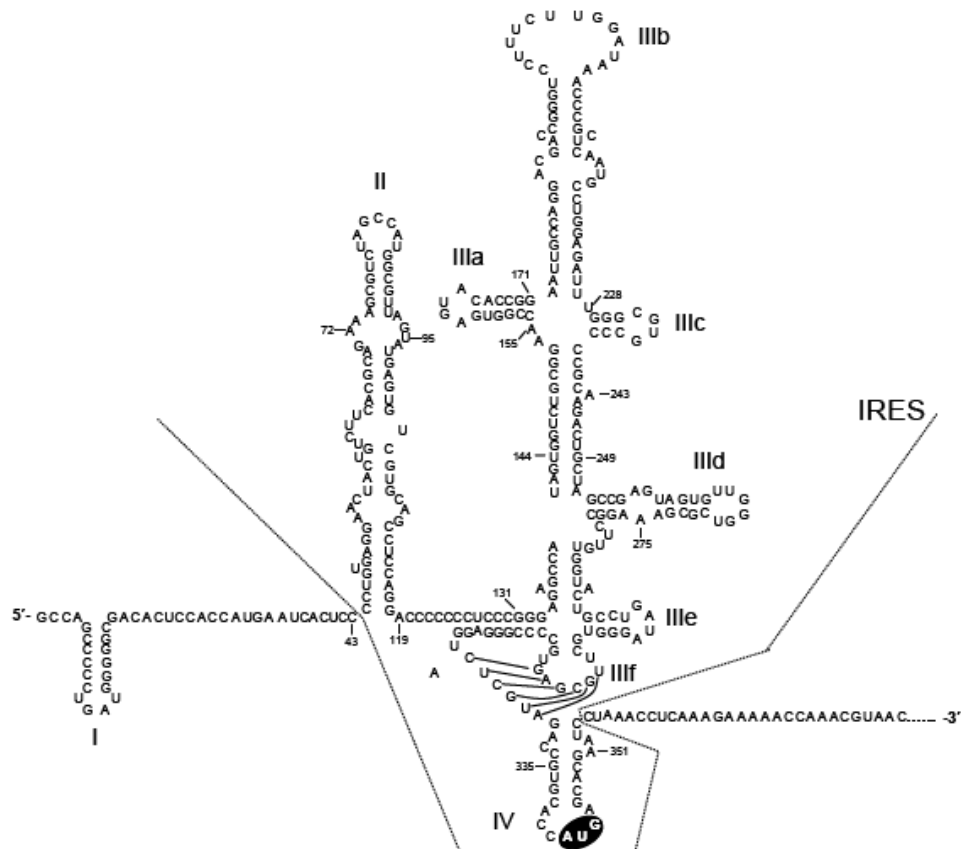
**Tabelle 1: Übersicht der HCV-codierten Proteine mit Molekulargewicht und Funktionen.**

Der offene Leserahmen dieser RNA wird an beiden Seiten von jeweils einem untranslatierten Bereich (UTR) flankiert (Abbildung 1.2). Am 5'-Ende der RNA befindet sich die so genannte 5'-UTR, die zwischen verschiedenen Isolaten hochkonserviert ist. Dieser komplex strukturierte Bereich beinhaltet die interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES), die für eine Cap-unabhängige Translation des HCV Genoms verantwortlich ist. Am 3'-Ende der RNA befindet sich ebenfalls eine nichtkodierende Region, die HCV 3'-UTR. Diese Region ist von variabler Länge und hat wichtige regulatorische Funktion für die Replikation und Translation des Virus (Friebe et al., 2002; Song et al., 2006).

### 1.2.1 Die HCV 5'-UTR

Die hochkonservierte 5'-UTR des Hepatitis C Virus (s. Abbildung 1.4) besitzt in den meisten Isolaten eine Länge von 341 Nukleotiden. Sie hat eine komplexe Sekundärstruktur bestehend aus vier Domänen mit verschiedenen Stamm-Schleifen-Strukturen (Stem-loops) und einem Pseudoknoten (Brown et al., 1992; Wang et al, 1995). Die Domänen II - IV sowie ein Stück des ORFs bilden die IRES, die interne Ribosomeneintrittsstelle, welche essentiell für die Translation der Virus RNA ist (Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Die Domäne I liegt außerhalb der IRES und ist gemeinsam mit Domäne II wichtig für die Replikation des viralen RNA (Friebe et al., 2001; Luo et al., 2003).

Die HCV IRES kann zur Initiation der Translation ohne die Zuhilfenahme von eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIFs) die 40S-ribosomale Untereinheit binden, wobei jedoch die Anwesenheit von eIF3 die Bindung verstärken kann.



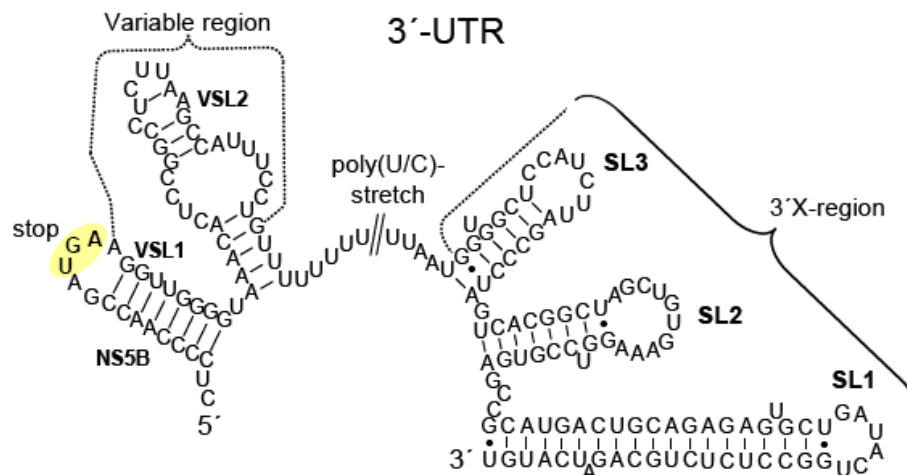
**Abbildung 1.4: Sequenz und Sekundärstruktur der HCV 5'-UTR mit Beginn des viralen ORFs.** Die HCV 5'-UTR besteht aus vier Domänen (I - IV). Die HCV IRES schließt dabei die Domänen II – IV ein sowie einen Teil des viralen ORFs. Das AUG-Startcodon ist schwarz unterlegt. Abbildung modifiziert nach Honda et al., 1999.

### 1.2.2 Die HCV 3'-UTR

Die Hepatitis C Virus 3'-UTR besteht in der Regel aus ca. 225 Nucleotiden und kann in drei Bereiche eingeteilt werden (siehe Abbildung 1.4). Am 5'-Ende befindet sich eine variable Region mit zwei Stem-loops, die je nach Genotyp eine Länge zwischen 27 und 70 Nucleotiden besitzt. Darauf folgt ein Poly-U/C-Bereich, dessen Länge ebenfalls stark zwischen den HCV Isolaten variieren kann (Tanaka et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die Länge dieser Region mit der Replikationseffizienz des Virus in Verbindung steht (Friebe und Bartenschlager, 2002).

Am 3'-Ende der UTR befindet sich die 3'-X-Region. Diese besteht aus insgesamt 98 Nucleotiden, die drei hochkonservierte Stem-loops (SL1 - 3) bilden (Blight und Rice, 1997; Ito und Lai, 1997). Auch für diese Region ist eine essentielle Funktion bezüglich der Replikation des Virus nachgewiesen (Friebe und Bartenschlager, 2002).

Die HCV 3'-UTR kann verschiedene Proteine binden, zum Beispiel PTB (Polypyrimidin-Trakt-Bindeprotein (Ito und Lai, 1997).



**Abbildung 1.5: Sequenz und Sekundärstruktur der HCV 3'-UTR im Anschluss des Polyprotein ORFs.** Die virale 3'-UTR besteht aus einer variablen Region, bestehend aus zwei Stem-loops, einem Poly-U/C Trakt und der so genannten 3'X Region, die aus den drei Stem-loops SL1 - 3 besteht. Das Stop-Codon des ORFs im Stem-loop 1 der variablen Region (VSL1) ist farbig unterlegt. Abbildung modifiziert nach Blight und Rice, 1997.

### 1.3 Der Infektionszyklus des Hepatitis C Virus

Da HCV ein sehr enges Wirtsspektrum besitzt und nur Menschen und Schimpansen infiziert, war es lange Zeit schwierig, ohne Tiermodell Studien des Infektionszyklus des Virus durchzuführen. Trotz Entwicklung eines Zellkultursystems, in dem Huh7-Zellen die Replikation subgenomischer HCV-RNAs unterstützen (Lohmann et al., 1999), und der erfolgreichen Transfektion des JFH-1-Klons mit Sekretion von infektiösem HCV ins Medium (Kato und Wakita, 2005), sind viele Schritte des Replikationszyklus noch hypothetisch. Eine vereinfachte schematische Darstellung des HCV Infektionszyklus ist in Abbildung 1.6 dargestellt.

#### 1.3.1 Anheftung und Eintritt in die Wirtszelle

Für die Bindung und Aufnahme des Virus in die Wirtszelle scheinen mehrere zelluläre Oberflächenproteine verantwortlich zu sein. Das am meisten erforschte Rezeptor-Molekül ist CD81, das mit einem Molekulargewicht von 25 kDa auf der Oberfläche von mehreren Zelltypen zu finden ist. HCV scheint durch eine Interaktion von CD81 und dem viralen Protein E2 zu binden (Pileri et al., 1998). Neben CD81 sind allerdings noch mehrere andere Faktoren auf der Zelloberfläche für die HCV Bindung und Aufnahme verantwortlich, so dass auch vermutet wird, dass CD81 als Korezeptor für den Zelleintritt nach der Anheftung wirkt (Cormier et al., 2004). Neben CD81 wurde auch der Scavenger-Rezeptor Typ I (SR-BI) als möglicher Rezeptor für HCV diskutiert. Es konnte an HepG2 Zellen, die kein CD81 exprimieren, gezeigt werden, dass eine Bindung des viralen E2 an SR-BI trotzdem möglich ist (Scarselli et al., 2002). Antikörper gegen SR-BI zeigen jedoch nur eine partielle Hemmung

der Virusbindung, so dass angenommen werden kann, dass SR-BI nicht der einzige Rezeptor für die Bindung des Virus an die Zielzelle ist (Barth et al., 2005). Die Rolle von DC-SIGN und L-SIGN bei der HCV Bindung ist umstritten. Es konnte gezeigt werden, dass HCV Pseudopartikel an DC-SIGN und L-SIGN durch E2 binden (Ludwig et al., 2004), in einer anderen Studie konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (Lozach et al., 2004). Neben dem Low-density Lipoprotein Rezeptor (LDL-R), der für die Bindung des Virus als wichtiger Faktor nachgewiesen werden konnte (Agnello et al., 1999; Monazahian et al., 1999), wird auch die Bedeutung von Heparansulfat-Proteoglykanen diskutiert. Da dieses aber ubiquitär auf allen Zelloberflächen vorkommt, wird angenommen, dass diese eher für die initiale Anheftung mit anschließender Weiterleitung des Virus an einen anderen spezifischeren Rezeptor genutzt werden (Barth et al., 2003). Ebenfalls werden Claudin-1 und Occludin, Bestandteile von tight-junctions, als Kofaktor für die HCV Bindung diskutiert (Evans et al., 2007; Liu et al., 2009). Allerdings konnte bisher keiner dieser Faktoren für den Tropismus von HCV für Hepatozyten verantwortlich gemacht werden. Als mögliche Erklärung dafür wird die Abwesenheit eines Moleküls auf der Oberfläche von Leberzellen diskutiert (Perreault und Pecheur, 2009). Nach der Anheftung des Virus an die Zielzelle wird es durch Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen (Blanchard et al., 2006). Die Freisetzung des viralen Nukleokapsids erfolgt dann durch die Fusion der HCV-Hüllmembran und der zellulären Membranen. Diese Verschmelzung der Membranen erfolgt durch eine Konformationsänderung der viralen Fusionsprotein bei niedrigem pH-Wert im Endosom (Agnello et al., 1999; Bartosch et al., 2003b; Hsu et al., 2003). Dabei werden sowohl E1 als auch E2 als Fusionsproteine diskutiert. Durch Sequenzanalysen wurde gezeigt, dass E1 wohl ein Fusionspeptid besitzt (Flint und McKeating, 2000; Rosa et al., 1996), allerdings zeigt E2 Strukturgleichheiten mit anderen Fusionsproteinen (Lescar et al., 2001; Yagnik et al., 2000).

### **1.3.2 Translation des Polyproteins und Prozessierung**

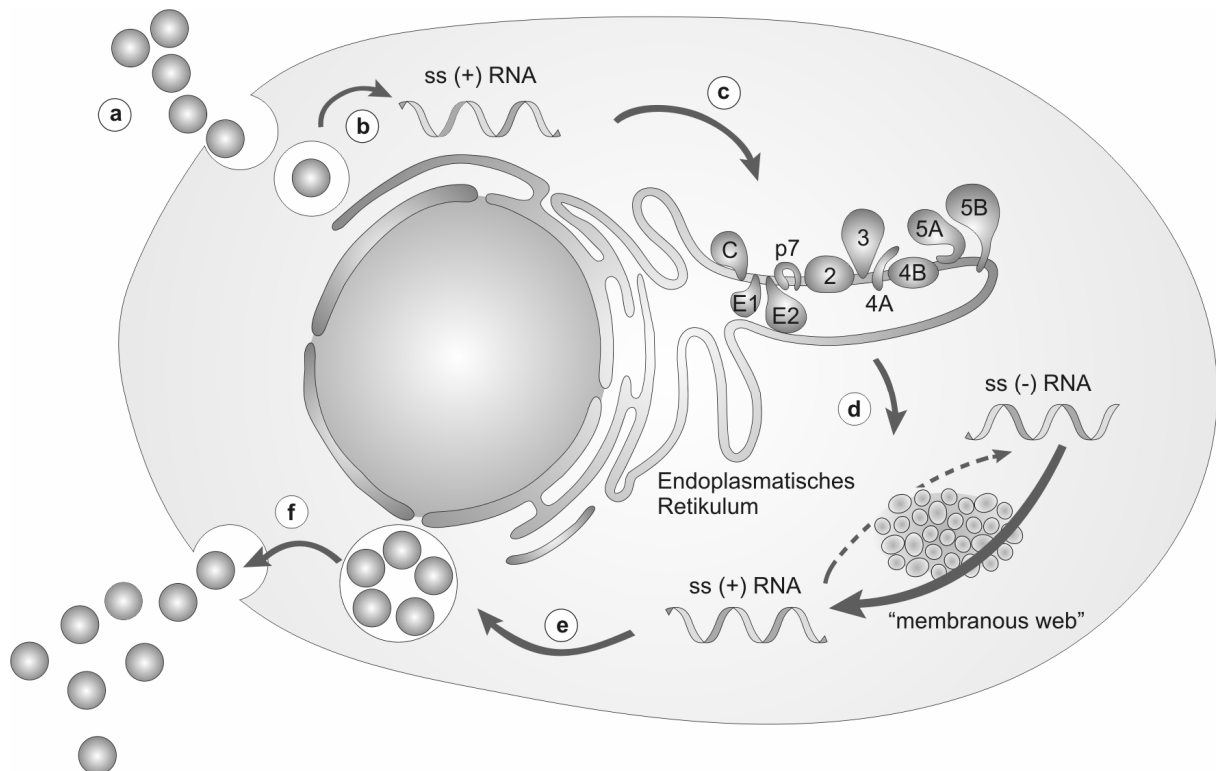
Nach diesem so genannten „Uncoating“ des Virus, also der Freisetzung des viralen Genoms ins Zytoplasma, kann die einzelsträngige RNA direkt translatiert werden. Die Proteinsynthese des viralen Genoms erfolgt an den Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER). Die Translationsinitiation wird hierbei durch die HCV IRES cap-unabhängig vermittelt. Das entstehende Polyprotein, welches in der ER-Membran verankert vorliegt, wird sowohl durch zelluläre Signalasen für die Spaltung von E1, E2 und Core-Protein als auch mit Hilfe der viruskodierten Autoproteasen getrennt. Weitere Reifungsschritte der beiden Oberflächenproteine sind zum Beispiel die N-Glykosylierung und die anschließende Zusammenlagerung zu E1/E2-Heterodimeren (Penin et al., 2004b).

### **1.3.3 RNA Replikation**

Die Replikation der viralen Nukleinsäure erfordert zunächst die Bildung von HCV-Replikationskomplexen. Die RNA bildet zusammen mit den HCV-Nichtstrukturproteinen und



mit vom ER abgeleiteten Membranvesikeln einen membran-assoziierten Komplex (membranous web) (Egger et al., 2002). Dabei spielt unter anderem NS4B eine bedeutende Rolle, da es die Formation eines „membranous webs“ induzieren kann (Egger et al., 2002; Gretton et al., 2005), aber auch NS5A und NS5B scheinen bei der Bildung des Replikationskomplexes von Bedeutung zu sein (Gao et al., 2004; Shi et al., 2003; Tu et al., 1999).



**Abbildung 1.6: Der Infektionszyklus des Hepatitis C Virus.** Nach Bindung und Aufnahme des Virus in die Wirtszelle (a) findet die Freisetzung des einzelsträngigen (ss) viralen RNA-Genoms ins Zytoplasma statt (b). Der nächste Schritt ist die Translation und Prozessierung der viralen Proteine am rauen Endoplasmatischen Retikulum (c). Bei der Replikation im „Membranous web“ wird die Positivstrang-RNA zunächst als Template für die Negativstrang-Synthese verwendet, bevor dann durch semikonservative Replikation neue HCV RNA-Genome transkribiert werden (d). Nach dem Zusammenbau der infektiösen HCV Partikel (e) erfolgt die Ausschleusung über den sekretorischen Weg (f). Abbildung modifiziert nach Moradpour et al., 2007.

Der genaue Mechanismus der HCV Replikation ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Viele Annahmen zu den Replikationsschritten werden in Analogie zu Erkenntnissen aus anderen Flavivirus-Studien gezogen. Das Schlüsselenzym hierbei ist das virale NS5B, die RNA-abhängige RNA-Polymerase, die beide Schritte der Replikation katalysiert. Dieses Enzym kann die RNA-Synthese unter bestimmten Bedingungen *de novo*, also ohne die Verwendung eines Primers synthetisieren (Zhong et al., 2000). Die positivsträngige RNA dient im ersten Schritt der Replikation als Matrize für die Synthese des Negativ-RNA-Stranges. Durch

Zusammenlagerung von Positiv- und Negativ-RNA-Strängen entstehen doppelsträngige replikative RNA-Formen. Im zweiten Schritt erfolgt die Positivstrang Synthese. Diese RNAs können nun erneut translatiert, repliziert oder in neue Viren verpackt werden (Bartenschlager et al., 2004).

### **1.3.4 HCV Zusammenbau und Freisetzung aus der Zelle**

Auch der Zusammenbau und die Freisetzung der Viren sind noch nicht vollständig verstanden. Man nimmt an, dass die Bildung der Nukleokapside durch eine Interaktion des Core-Proteins mit dem 5'-Ende der Virus-RNA initiiert wird (Shimoike et al., 1999). In bakteriellen Systemen konnte in Anwesenheit von bestimmten Nukleinsäuren eine Selbst-Zusammenlagerung von rekombinanten Core-Partikeln nachgewiesen werden (Kunkel et al., 2001). Außerdem wird darüber spekuliert, ob diese RNA-Core-Interaktion eine Rolle bei der Umstellung von Virus- Replikation zu Virus-Zusammenbau spielt.

Die Nukleokapside werden nun am ER, in dessen Membran die viralen Oberflächenproteine eingelagert sind, durch einen Budding-Prozess umhüllt (Cocquerel et al., 1998; Sato et al., 1993). Die reifen, infektiösen HCV-Partikel werden nun über den konstitutiven sekretorischen Weg freigesetzt (Roingard et al., 2004).

### **1.4 Mechanismus der Translation**

Die Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen kann in drei verschiedene Phasen der Translation eingeteilt werden: Initiation, Elongation und Termination. Dabei wird die mRNA von Ribosomen in 5' zu 3' -Richtung abgelesen.

Generell ist die Initiation der Translation gekennzeichnet durch die Bindung von 80S-Ribosomen, die aus einer großen 60S- und einer kleinen 40S-Untereinheit bestehen, an die zelluläre RNA. Das erste zu translatierende Codon der RNA wird nun mit dem Anticodon der tRNA (Transfer-RNA), in der Regel eine tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, in Verbindung gebracht. In der Elongationsphase werden mit Hilfe des Ribosoms und der mit den Aminosäuren beladenen tRNAs der RNA-Sequenz entsprechende Polypeptidketten gebildet. Diese Phase der Translation dauert im Idealfall bis das Ribosom ein Stop-Codon in der Nukleinsäure erreicht. Dieses bewirkt ein Entlassen der neu synthetisierten Polypeptidkette und ein Zerfallen der 80S-Ribosomen in seine Untereinheiten, welche dann für eine neue Translationsrunde wieder verwendet werden können.

Diese einzelnen Schritte der Translation benötigen neben der mRNA, den Ribosomen und der beladenen tRNAs zusätzliche Faktoren, die die Reaktion antreiben. Die werden unter den Namen Initiations- (eIFs), Elongations- (eEFs) und Terminationsfaktoren (eRFs) zusammengefasst.

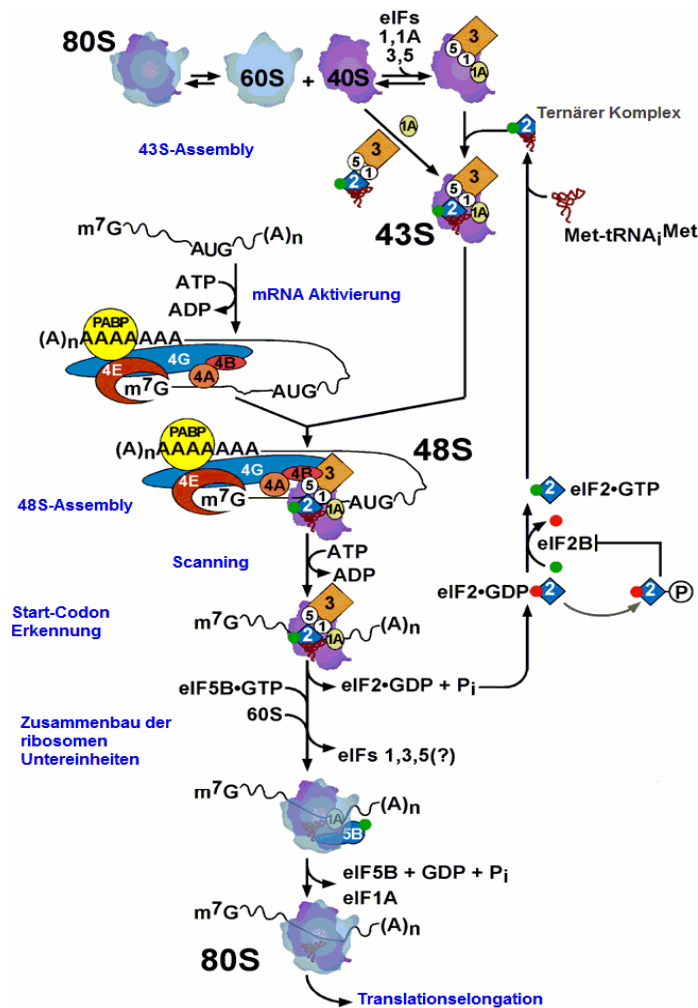
### 1.4.1 Cap-abhängige Translationsinitiation bei eukaryotischen mRNAs

Die Struktur der meisten zellulären eukaryotischen mRNAs wird in der Regel durch das Vorhandensein einer 5'-Cap-Struktur und einen 3'-Poly(A)-Schwanz bestimmt. Das sich am 5'-Ende der RNA befindende Cap-Nukleotid ( $m^7GpppN$ ) ist durch eine 5'-5'-Triphosphatbindung an das erste Nukleotid der RNA gebunden. Diese Cap-Struktur ist unter anderem wichtig als Schutz der RNA gegen Degradation durch Exonukleasen, für den Transport der RNA vom Kern ins Zytoplasma und dient außerdem der Translationsinitiation. Nach der Cap-Struktur folgt eine 5'-UTR, die meist eine Länge zwischen 50 und 120 Nukleotiden besitzt (Suzuki et al., 2000), erst danach findet man den offenen Leserahmen für das codierte Protein.

Die Translationsinitiation ist bei der Kontrolle der Proteinsynthese der entscheidende Schritt. Die eukaryotische Translationsinitiation findet an der 5'-Cap-Struktur statt, indem die kleine ribosomale 40S-Untereinheit daran bindet und entlang der RNA von 5' in 3' Richtung scannt, bis das Start-Codon erreicht ist (Kozak, 1978). Für den Vorgang der Initiation werden hier verschiedene eIFs benötigt (siehe Abbildung 1.7). Eine Übersicht über die eukaryotischen Initiationsfaktoren mit ihren Funktionen ist in Tabelle 2 gezeigt.

Initiationsfaktor	UE	MG (kDa)	Funktion
eIF1	1	12,6	Erkennung d. Start-Codons, Scanning d. Ribosoms
eIF1A	1	16,5	Bindung d. Met-tRNA an 40S-UE, unterstützt Scanning
eIF2	3	126	GTP-abhängige Bindung der Met-tRNA an 40S-UE, GTPase
eIF2B	5	261	Austausch des Guanosin-Nukleotids an eIF2
eIF3	13	~700	Bindung d. mRNA und Met-tRNA an 40S-UE
eIF4A	1	44	RNA-abhängige ATPase; RNA-Helikase
eIF4B	1	70	verstärkt RNA-Helikase-Aktivität von eIF4A
eIF4E	1	26	Bindung der $m^7GpppN$ -Struktur
eIF4G	1	154	Bindung von mRNA, PABP, eIF4E, eIF4A, eIF3
eIF4F	3	223	Heterotrimer aus eIF4E/4G/4A, Bindung der Cap-Struktur
eIF4H	1	27	Kofaktor von eIF4A
eIF5	1	49	Stimuliert GTPase-Aktivität von eIF2
eIF5B	1	139	Zusammenfügen der ribosomalen UE, GTPase

**Tabelle 2: Übersicht der eukaryotischen Initiationsfaktoren.** Aufgezeigt werden die Anzahl der Untereinheiten (UE), das Molekulargewicht (MG) und die Funktion des jeweiligen Faktors. Tabelle modifiziert aus Hellen und Sarnow, 2001.



**Abbildung 1.7: Schematische Übersicht der Translationsinitiation bei eukaryotischen gecappten mRNAs.** Dargestellt ist die Beteiligung der verschiedenen eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIFs) an der Translationsinitiation der gecappten und polyadenylierten mRNA. Abbildung modifiziert aus Sonenberg und Hinnebusch, 2007.

Der Faktor eIF2 bildet zusammen mit GTP-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> den so genannten ternären Komplex, der an die 40S-Untereinheit des Ribosom gebunden wird. Die Bildung des so entstandenen 43S-Präinitiationskomplexes wird durch den Faktor eIF5 unterstützt (Das et al., 2001). Es findet eine zusätzliche Bindung von eIF3, eIF1 und eIF1a an diesem Komplex statt, die hier eine zusätzliche Stabilisierung bewirken und zum Teil wichtig sind für die Erkennung des Start-Codons (Chaudhuri et al., 1999; Majumdar et al., 2003; Pestova et al., 1998). Auch die Cap-Struktur kann Initiationsfaktoren binden. Es findet eine Interaktion des Cap mit eIF4E statt, ein Teil des eIF4F-Komplexes (Sonenberg et al., 1979). Weitere Teile dieses Komplexes sind außerdem eIF4G, welches mit dem cap-bindenden eIF4E und eIF4A interagiert (Prevot et al., 2003). eIF4A besitzt eine Helikase-Aktivität, welche eventuell vorhanden Sekundärstrukturen in der zu translatierenden RNA beseitigt (Pause und Sonenberg, 1992). Der Faktor eIF4B kann als Verstärker dieser Helikase-Aktivität von eIF4A dienen (Altmann et

al., 1993). Die Bindung 43S-Präinitiationskomplexes erfolgt letztendlich über eine Interaktion von eIF3 mit eIF4G und eIF4B. Dieser Komplex scannt nun entlang der RNA, bis dieser das initiale Start-Codon erreicht. Jedoch ist nicht ausschließlich dieses einzelne Codon, sondern auch einige flankierende Nukleotide für die korrekte Auswahl des Initiator-Codons notwendig. Diese Sequenz wird auch „Kozak-Sequenz“ genannt (Kozak, 1986). Bei diesem Prozess der Codon-Auswahl spielen eIF1 und eIF1a eine bedeutende Rolle (Pestova und Kolupaeva, 2002). Durch eIF5 kommt es dann zur Hydrolyse des an eIF2 gebundenen GTPs und dessen Entlassung zusammen mit eIF2 aus dem Initiationskomplex. Die Dissoziation von weiteren gebundenen Initiationsfaktoren im diesem Komplex wird durch eIF5B ermöglicht (Pestova et al., 2000). Dieser Schritt letztendlich bewirkt, dass die große 60S-Untereinheit der Ribosomen daran binden und die Elongationsphase der Proteinbiosynthese beginnen kann.

Eine zusätzliche Stimulation dieses Vorgangs der Initiation wird durch die Interaktion eines Poly(A)-bindenden Proteins (PABP) am polyadenylierten 3'-Ende der RNA mit dem Initiationsfaktor eIF4G, welches sich am 5'-Ende der RNA befindet (Gallie 1991; Otero et al., 1999; Tarun et al., 1996). Hierbei kommt es durch die 5'-3'-Interaktion zu einer Zirkularisierung der mRNA (Wells et al., 1998).

### **1.4.2 Interne Translationsinitiation bei IRES-Elementen**

Ein cap-unabhängiger Mechanismus der Translationsinitiation wurde durch Studien an Poliovirus (PV) und dem Encephalomyokarditis Virus (EMCV) entdeckt (Pelletier et al., 1988; Jang et al., 1988). Schon früh konnte gezeigt werden, dass die virale RNA keine 5'-Cap-Struktur besitzt (Nomoto et al., 1976), sondern eine recht lange und hoch strukturierte 5'-UTR besitzt (Pilipenko et al., 1989). Studien an PV zeigten zunächst, dass hier eine cap-unabhängige interne Translationsinitiation vorliegt, der ein anderer Mechanismus zu Grunde liegt (Pelletier und Sonenberg, 1988d). Diese interne Stelle der Translationsinitiation downstream des 5'-Endes der RNA wird interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) genannt. In Folge wurden auch bei vielen weiteren Viren IRES-Elemente gefunden, wie für das Encephalomyokarditis Virus (EMCV) (Jang et al., 1988) oder das Maul-und-Klauenseuche Virus (FMDV) (Kühn et al., 1990). Eine Übersicht der IRES-Elemente in viralen Genomen ist in Tabelle 3 gegeben. Nach dieser Entdeckung bei Viren wurden neben diesen viralen IRES-Elementen auch in einigen zellulären mRNA interne Ribosomeneintrittsstellen gefunden, wie für das La-Autoantigen (Carter und Sarnow, 2000) oder der Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (FGF2) (Vagner et al., 1995). Allerdings wird die Existenz von zellulären IRES-Elementen von einigen Wissenschaftlern angezweifelt (Shatsky et al., 2010).

Virus	Referenz
Poliovirus (PV)	Pelletier und Sonenberg, 1988
Rhinovirus (RV)	Borman und Jackson, 1992
Encephalomyokarditis Virus (EMCV)	Jang et al, 1988
Maul-und-Klauenseuche Virus (FMDV)	Kühn et al, 1990
Hepatitis C Virus (HCV)	Tsukiyama-Kohara et al., 1992
Klassisches Schweinefieber Virus (CSFV)	Rijnbrand et al., 1997
Bovines Virusdiarrhoe Virus (BVDV)	Poole et al., 1995
Murines Leukämievirus gag mRNA (MLV)	Berlioz und Darlix, 1995; Vagner et al., 1995b
Rous-Sarkom-Virus (RSV)	Deffaud und Darlix, 2000
Humanes Inundefizienz Virus env mRNA (HIV)	Buck et al, 2001
<i>Plautia stali</i> Darmvirus (PSIV)	Sasaki und Nakashima, 1999
<i>Rhopalosiphum padi</i> Virus (RhPV)	Domier et al., 2000
Cricket Paralyse Virus (CrPV)	Wilson et al., 2000b
Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus	Grundhoff und Ganem, 2001 Bieleski und Talbot, 2001

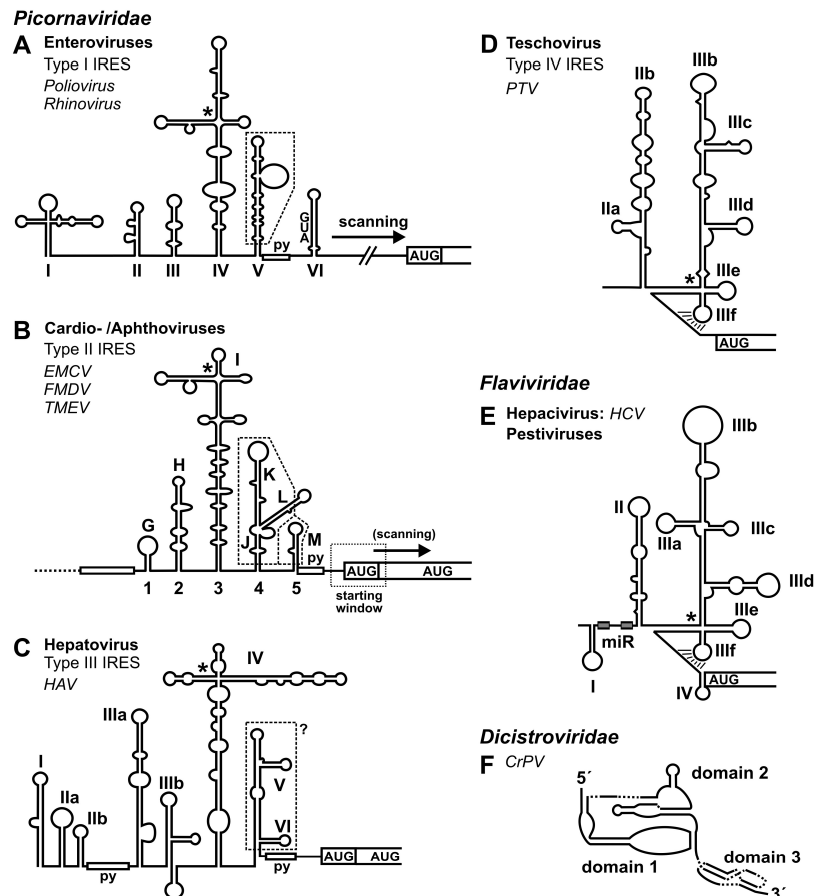
**Tabelle 3: Übersicht einer Auswahl von viralen Genomen, welche IRES-Elemente besitzen, mit dazugehörigen Referenzen.** Tabelle modifiziert aus Hellen und Sarnow, 2001.

Generell ist die interne Translationsinitiation eine Möglichkeit, den Mechanismus der cap-abhängigen Bindung der Ribosomen zu umgehen. Wie genau dieses geschieht und welche zusätzlichen Faktoren wie eIFs oder ITAFs (IRES-Trans-Acting-Factors) dafür gebraucht werden, ist allerdings von der jeweiligen IRES abhängig und kann zwischen den IRES-Elementen sehr divergieren.

#### 1.4.2.1 Einteilung und Struktur von viralen IRES-Elementen

Die bekannten viralen IRES-Elemente unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Sequenz, Sekundärstruktur und ihrem genauen Mechanismus und Bedingungen der Rekrutierung der Ribosomen an den Startpunkt der Translation zum Teil erheblich.

Die IRES-Elemente der Picornaviren können grundsätzlich in 4 Untergruppen eingeteilt werden (siehe Abbildung 1.8). Die IRES des Typ I wird den Enteroviren, zum Beispiel Poliovirus, zugeordnet. Diese sowie die Typ II IRES, zu denen die Cardio- bzw. Aphthoviren mit EMCV oder FMDV als Prototypen gehören, ebenso wie die Typ III IRES-Elemente der Hepatoviren, denen das Hepatitis A Virus zugeordnet wird, unterscheiden sich deutlich von der IRES des Typ IV.



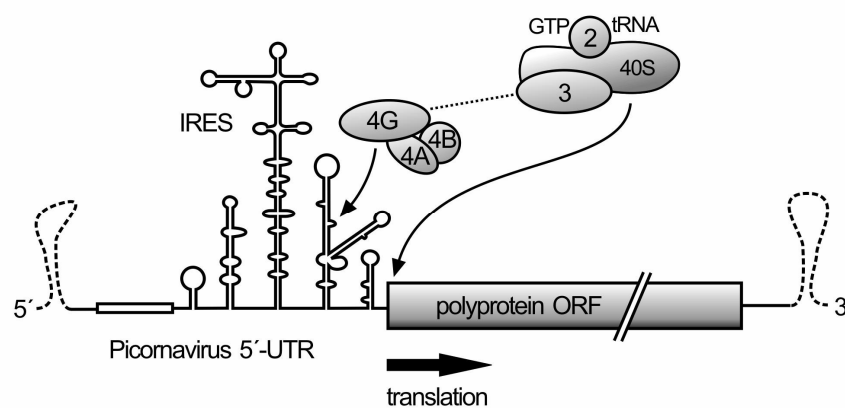
**Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der IRES-Elemente der Picornaviren im Vergleich zu HCV- und CrPV-IRES.** In den Abbildungen A - C sind die Domänen für die Bindung der Initiationsfaktoren mit gestrichelten Linien gekennzeichnet. Die typische „four-way-junction“ ist mit (\*) angegeben. Py= Polypurimidin-Trakt. Abbildung aus Niepmann 2009.

#### 1.4.2.2 Funktionsweise der verschiedenen IRES-Elemente

##### 1.4.2.2.1 Anforderung der IRES-Elemente an eukaryotische Initiationsfaktoren (eIFs)

Die IRES-Typen I - III (siehe Abbildung 1.8) der Picornaviren enthalten alle gemeinsam typische Elemente wie einen Polypurimidin-Trakt stromaufwärts des Start-Codons oder eine „four-way-junction“. Die in der Abbildung 1.8 gestrichelten Domänen zeigen die Bindestelle für eIF4G. Die Translation wird in diesen Fällen wie FMDV oder EMCV durch eine Interaktion der IRES mit eIF4G initiiert (Lopez de Quinto und Martinez-Salas, 2000; Saleh et al., 2001) (siehe Abbildung 1.9). Hier findet die Bindung von eIF4G im Gegensatz zur cap-abhängigen Translation unabhängig von eIF4E und durch andere Domänen des Proteins statt (Kolupaeva et al., 2003). Der Faktor eIF4G wird durch eIF4A und dessen Kofaktor eIF4B gebunden (Meyer et al., 1995; Ochs et al., 2002), und es konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion mit eIF4G die Translation simuliert (Lomakin et al., 2000). Durch die Interaktion der IRES mit eIF4G wird die Bindung von eIF3 und dem ternären Komplex an die IRES vermittelt (Lamphear et al., 1995). Durch diese Unabhängigkeit der Translationsinitiation von

eIF4E kann durch verschiedene virale Mechanismen die zelluläre cap-abhängige Translationsinitiation heruntergefahren werden. Dies kann wie im Fall des Poliovirus durch das Abspalten der eIF4E-Bindedomäne von eIF4G durch die virale Protease 2A geschehen (Etchison et al., 1982) oder wie bei EMCV durch die Dephosphorylierung eines Inhibitors von eIF4E, eIF4E-BP1 (Gingras et al., 1996). Diese Strategien beeinflussen somit nur die zelluläre Translation negativ, wohingegen die eigene virale Translation dadurch nicht inhibiert wird. Eine Ausnahme unter den typischen Picornavirus IRES-Elementen bildet hierbei das Hepatitis A Virus (HAV), welches nur die ungespaltene Form von eIF4G in Verbindung mit eIF4E für die Initiation der Translation nutzen kann (Borman und Kean, 1997; Ali et al., 2001). Dieses nicht-lytische Virus reguliert somit die Translation der Wirtszelle nicht komplett runter und eine Infektion verläuft somit eher langsam und weniger zerstörerisch (Niepmann, 2009). Die ribosomale Untereinheit wird nun zu dem so genannten Startfenster in der RNA geführt, und die Translation beginnt je nach IRES direkt oder nach einem Scanning-Prozess am nächsten Start-Codon (Pilipenko et al., 1994; Belsham, 1992; Pöyry et al., 2001). Interessanterweise wurden in dicistronischen RNA-Konstrukten auch die stimulierende Wirkung einer IRES auf upstream gelegene Gene nachgewiesen, so dass angenommen werden kann, dass Initiationsfaktoren und evtl. auch Ribosomen von der IRES nicht nur in 3'- sondern auch in 5'- Richtung transferiert werden können (Jünemann et al., 2007).



**Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Translationsinitiation an klassischen Picornavirus IRES-Elementen.** Gezeigt ist eine Typ II IRES und die Beteiligung der notwendigen eIFs bei der Initiation der Translation unabhängig vom Faktor eIF4E. Abbildung aus Niepmann 2009.

Die HCV IRES (siehe Abbildung 1.8 E) hingegen unterscheidet sich von diesen klassischen Picornavirus IRES-Elementen sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer Funktionsweise der Translationsinitiation. Die IRES ist Bestandteil der HCV 5'-UTR (vgl. Abbildung 1.4), umfasst die Stem-loops II - IV und ragt in einen Teil des core-kodierenden Bereichs hinein (Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Die Domänen I und II der HCV 5'-UTR sind wichtig für die Replikation der viralen RNA (Friebe et al., 2001; Luo et al, 2003). Auch in der HCV IRES findet man eine typische „four-way-junction“ an den Stem-loops IIIe und IIIf und einen Pseudoknoten. Es konnte in Studien nachgewiesen werden, dass dieser Bereich 40S



ribosomale Untereinheiten direkt binden kann und das AUG Start-Codon direkt in der P-Site des Ribosoms platziert wird. Anders als bei den klassischen Picornaviren kann HCV also die Translation initiieren, ohne dass eIFs oder andere Faktoren dafür gebraucht werden (Pestova et al., 1998; Spahn et al., 2001; Kieft et al., 2001). Die Translation von HCV kann sogar unter bestimmten Bedingungen wie Stress, welche zu einer Phosphorylierung und damit Deaktivierung von eIF2 führt, unabhängig von diesem Faktor und dem ternären Komplex initiiert werden (Terenin et al., 2008; Robert et al., 2006). Die HCV IRES ist allerdings in der Lage, eIF3 durch ihren Stem-loop III zu binden, was die Interaktion der kleinen ribosomalen Untereinheit mit der IRES verstärken und somit zur Translationsstimulation durch Stabilisierung der 48S-Komplexe führen kann (Sizova et al., 1998; Buratti et al., 1998). Die 40S-ribosomale Untereinheit bindet die HCV IRES außerdem zusätzlich über die Domäne III<sub>d</sub> und einen Teil der Domäne II (Babaylova et al., 2009). Außerdem konnte in Studien eine Konformationsänderung der ribosomalen Untereinheit durch die Bindung an die IRES nachgewiesen werden (Spahn et al., 2001). Diese Tatsache führte außerdem zur Vermutung, dass diese Konformationsänderung der 40S Untereinheit die Bildung von 48S-Komplexen unabhängig von eIF2 bewirkt (Hellen, 2009).

Die IRES des Porcinen Teschovirus (PTV) (siehe Abbildung 1.8 D) hat eher Ähnlichkeit mit der HCV IRES als mit den IRES-Elementen der klassischen Picornaviren (Pisarev et al., 2004), obwohl PTV aufgrund seiner Sequenz und Genomstruktur den Picornaviren zugeordnet wird. Es finden sich auch hier die für die Translation wichtigen typischen Elemente der HCV IRES, wie der Pseudoknoten und eine hohe Übereinstimmung in der Sequenz in wichtigen Domänen für die Bindung der Ribosomen an die IRES wie die Stem-Loops III<sub>d</sub> und III<sub>e</sub> (Hellen und De Breyne, 2007; Easton et al., 2009). Auch in ihren Anforderungen an Faktoren für die Initiation der Translation weist die PTV IRES hohe Ähnlichkeiten zur HCV IRES auf (Chard et al., 2006). Innerhalb der Picornaviren wurde neben PTV jedoch auch noch andere Viren, die eine solche HCV-ähnliche IRES besitzen gefunden, wie z.B. das Simian Picornavirus Typ 9 (SP9) (Hellen und de Breyne, 2007). Auch innerhalb der Flaviviren zeigen neben HCV mehrere Viren einen solchen IRES-Typ, wie z.B. das klassische Schweinefieber Virus (CSFV). Dieses Auftreten eines sehr ähnlichen IRES-Elements bezüglich Sequenz, Struktur und Funktionsweise wird durch einen rekombinanten Austausch von IRES-Elementen zwischen Virusfamilien während der Evolution erklärt (Hellen und de Breyne, 2007). In welche Richtung dieser Austausch stattgefunden hat, ist nicht weiter untersucht. Da jedoch alle Picornaviren im Gegensatz zu den Flaviviren eine IRES besitzen, wird vermutet, dass die letzteren die IRES während ihrer evolutionären Entwicklung von den Picornaviren erhalten haben (Belsham, 2009).

Obwohl die HCV IRES ihre Anforderungen an Initiationsfaktoren zur Translationsinitiation schon recht stark minimiert hat, existiert eine IRES, die ganz ohne die Verwendung von eIFs und Initiator-Met-tRNA 80S-Ribosomen zur Translation binden kann. Dabei handelt es sich um die IRES des Cricket Paralyse Virus (CrPV), welches Insekten befällt und den

Dicistroviren zugeordnet wird (siehe Abbildung 1.8 F) (Jan und Sarnow, 2002; Sasaki und Nakashima 2000). Durch die Nutzung eines alternativen Start-Codons, Alanin statt üblicherweise Methionin, in der A-Site des Ribosoms, ist eine methionin-unabhängige Translationsinitiation möglich (Wilson et al., 2000). Die generelle Struktur dieser intergenischen IRES kann in drei Domänen eingeteilt werden, die alle einen Pseudoknoten enthalten (Kanamori und Nakashima, 2001). Außerdem zeigt die CrPV IRES eine Struktur, die eine tRNA imitiert und somit die Initiation der Translation ermöglicht (Costantino et al., 2008).

### **1.4.2.2 Anforderung der IRES-Elemente an IRES-trans-acting factors (ITAFs)**

Neben der Verfügbarkeit von eIFs benötigen die verschiedenen IRES-Elemente oftmals weitere zelluläre Faktoren, um die Translation optimal zu initiieren. Dabei handelt es sich um so genannte ITAFs (IRES-trans-acting factors), die ebenso wie die eIFs individuell für jeden IRES-Typ genutzt werden (Pacheco et al., 2008). Diese zellulären Faktoren sind normalerweise nicht am cap-abhängigen Translationsprozess, sondern an anderen Funktionen im RNA Metabolismus der Zelle beteiligt. Erst bei der IRES-abhängigen Translation spielen sie auch in diesem Bereich eine Rolle. Dabei können sie sowohl eine stimulatorische als auch eine inhibitorische Rolle bei der IRES Translation spielen, was je nach IRES-Element und ITAF sehr unterschiedlich sein kann (zusammengefasst in Niepmann 2009). Viele ITAFs besitzen zahlreiche Bindedomänen und können somit mehrere Interaktionen mit der jeweiligen IRES eingehen. Dies wurde z.B. für die Bindung von PTB (Polypyrimidin-Trakt-Bindeprotein) an die FMDV IRES gezeigt (Song et al., 2005). PTB wirkt hier als RNA-Chaperon, welches durch seine Bindung die Sekundär- und Tertiärstruktur der IRES stabilisiert (Belsham und Sonenberg, 2000; Pilipenko et al., 2000). Die verschiedenen IRES-Elemente der Picornaviren werden ebenso vielfältig durch die Interaktion mit ITAFs beeinflusst. Die in dieser Hinsicht sehr gut untersuchte Typ I IRES des Poliovirus (PV) wird mindestens durch 6 weitere Proteine in ihrer Translationsfähigkeit beeinflusst. Dazu gehören Unr (upstream of n-ras), PTB, La-Autoantigen, PCBP2, SRp20 und DRBP76. Eine genaue Übersicht der ITAFs an den jeweiligen IRES-Elementen und ihre Wirkung ist in Tabelle 4 gezeigt.

Obwohl die HCV IRES die kleine ribosomale Untereinheit ohne eIFs oder andere Faktoren binden kann, werden ITAFs beschrieben, welche an der HCV Translationsinitiation und deren Regulierung beteiligt sind. Dies konnte z.B. für das humane La Autoantigen gezeigt werden, welches die HCV IRES am Stem-loop IV um das Start-Codon bindet (Ali und Siddiqui, 1997; Ali et al., 2000). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass ebenso wie bei PV auch bei HCV La für eine optimale Translationsinitiation gebraucht wird (Costa-Mattioli, 2004).

Die Wirkung von PTB, einem zellulären prä-mRNA Spleiß-Faktor (Patton et al., 1991), auf die HCV IRES-abhängige Translation konnte noch nicht klar gezeigt werden. In einigen

Studien konnte eine Bindung und stimulierende Wirkung des Proteins an der HCV IRES nachgewiesen werden (Ali und Siddiqui, 1995; Gosert et al., 2000), wohingegen andere Studien keinen Einfluss von PTB zeigen konnten (Kaminski et al., 1995; Brocard et al., 2007). Im Gegensatz dazu zeigen andere Versuchsreihen sogar eine mögliche inhibitorische Wirkung von PTB auf die HCV IRES Translation (Tischendorf et al., 2004). Auch eine mögliche Rolle von PTB bei der HCV-5'-3'-UTR-Interaktion wird dabei diskutiert (Ali und Siddiqui, 1995; Ito und Lai 1999).

Das heterogene nukleare Ribonukleoprotein L (hnRNP L) ist ein weiterer zellulärer Faktor, für den durch die Bindung der HCV IRES eine stimulierende Wirkung nachgewiesen werden konnte (Hahm et al., 1998; Hwang et al., 2009). Die Bindung von hnRNP L findet in räumlicher Nähe der Bindung des La-Proteins an der HCV IRES statt, in der 5'-Region des core-kodierenden Bereichs. Daher wird auch eine Interaktion dieser beiden ITAFs miteinander vermutet, und auch eine Interaktion zwischen hnRNP und PTB konnte nachgewiesen werden (Hahm et al., 1998).

Für das Poly(rC)-Bindepotein (PCBP), welches in den zwei Isoformen PCBP1 und PCBP2 vorliegt, konnte bisher eine intrazelluläre Interaktion mit der HCV 5'-UTR nachgewiesen werden (Spångberg und Schwartz, 1999). Ob diese Bindung von PCBP auch bei HCV eine Wirkung auf die Translation hat, wird bisher nur vermutet, konnte aber noch nicht experimentell nachgewiesen werden.

Weitere Faktoren, für die eine Bindung an die HCV IRES und eine translationsstimulierende Wirkung nachgewiesen werden konnte, sind z.B. NSAP1 (NS1-assoziiertes Protein 1), welches ebenfalls in der core-kodierenden Region bindet (Kim et al., 2004), oder hnRNP D, welches an den Stem-loop II der HCV IRES bindet und ebenfalls die Translation der viralen RNA verstärkt (Paek et al., 2008). Auch hier konnte eine zusätzliche Interaktion von hnRNP D mit hnRNP L gezeigt werden (Park et al., 2007).

Neben diesen hier beschriebenen ITAFs konnten jedoch auch noch viele weitere Proteine, die eine Interaktion mit der HCV IRES eingehen, nachgewiesen werden, z.B. Nucleolin (Izumi et al., 2001). Es konnten durch Methoden wie Shotgun-Peptid-Sequenzierung eine Vielzahl an Proteinen, die an die HCV IRES binden, identifiziert werden, jedoch ihre Funktion ist häufig noch ungeklärt (Lu et al., 2004).

Man kann jedoch vermuten, dass ITAFs eine wichtige Rolle bei der Regulierung der IRES-abhängigen Translation durch sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Wirkungsweisen spielen. Da diese Proteine auch oftmals untereinander interagieren konnten, scheint es bei der Bindung an die IRES-Elemente zu einer netzartigen Interaktion zu kommen. Da die verschiedenen IRES-Elemente auch unterschiedliche Anforderungen an ITAFs besitzen, wird ebenso diskutiert, ob diese Faktoren auch ein weiterer Schlüssel für die Zelltypspezifität von Virusinfektionen sein können. Dies wurde z.B. bei der Interaktion von DRBP76 mit der HRV (Humanes Rhinovirus) IRES (Merrill et al., 2006) oder bei der Bindung einer neuronalen Form von PTB (nPTB) an die Poliovirus IRES diskutiert. Dies ist jedoch in

den meisten Fällen nur eine Vermutung und konnte außer im Fall der stimulierenden Interaktion von FMDV mit dem zellzyklusabhängigen Protein Ebp1 (Pilipenko et al., 2000) noch nicht klar gezeigt werden. Oftmals können neben den ITAFs eben auch andere Faktoren, die an einer Virusinfektion der Zelle beteiligt sind, dafür verantwortlich gemacht werden (Niepmann 2009).

ITAFs	Effekt auf Translation	Ziel-IRES
PTB	Stimulation	FMDV, EMCV, TMEV, PV, HRV, HAV, HCV
DRBP76:NF45	Repression	HRV, HCV
Ebp1/ PA2G4/ ITAF <sub>45</sub>	Stimulation	FMDV, EMCV*
Unr	Stimulation	PV, HRV, HCV
HSC70		FMDV, HCV
SRp20	Stimulation	PV
PCBP2	Stimulation	PV, HRV, HAV, CVB3, FMDV*, EMCV*, HCV
Gemin5	Runterregulierung	FMDV, HCV
hnRNP U		FMDV
hnRNP K		FMDV
DAZ1		FMDV
G3BP		FMDV
Gpiap1		FMDV, HCV
Nucleolin	Stimulation	PV, HRV, FMDV, HCV
FBP2	Repression	EV71
eIF2C/Ago		FMDV
DHX9		HRV, FMDV, HCV
DDX1		FMDV
RACK1		HCV
IGF2BP1	Stimulation	HCV
La	Stimulation	PV, EMCV, HAV <sup>#</sup>
NSAP1/ hnRNP Q	Stimulation	HCV
hnRNP L	Stimulation	HCV
hnRNP D	Stimulation	HCV
hnRNP A/B		EV71, HCV
GAPDH	Repression	HAV
YB-BP1		HCV

**Tabelle 4: Übersicht der ITAFs und ihre Wirkung an den unterschiedlichen IRES-Elementen.**

FMDV = Maul-und-Klauenseuche Virus; EMCV = Encephalomyokarditis Virus; TMEV = Theilers Murines Encephalomyokarditis Virus; PV = Poliovirus; HRV = Humanes Rhinovirus; HAV = Hepatitis A Virus; HCV = Hepatitis C Virus; CVB3 = Coxsackie Virus B3; EV71 = Enterovirus 71; (\*) = kein Effekt; (<sup>#</sup>) = Suppression. Tabelle modifiziert aus Pacheco und Martinez-Salaz, 2010.

## 1.5 Polyadenylierung von RNAs am 3'-Ende

### 1.5.1 Polyadenylierung zellulärer mRNAs

Obwohl bei weitem nicht alle RNAs polyadenyliert werden, wie beispielsweise Histon-mRNAs (zusammengefasst in Marzluff et al., 2008), erfolgt die Polyadenylierung der Mehrheit zellulärer RNAs an ihrem 3'-Ende in einem ko- bzw. posttranskriptionellen Reifungsschritt. Die Reifung zellulärer Prä-mRNA beinhaltet neben der Polyadenylierung auch das Capping am 5'-Ende sowie das Splicing der RNA, um intronische Sequenzen zu entfernen. Der Schritt der Polyadenylierung beeinflusst dabei nicht nur die Termination der Transkription, sondern auch den Transport der RNA aus dem Zellkern (Huang et al., 1996), wobei in einigen Studien auch eine Polyadenylierung von RNAs im Zytoplasma gefunden wurde (Bilger et al., 1994; Barnard et al., 2004). Dieser Poly(A)-Anhang zusammen mit dem Poly(A)-bindenden Protein (PABP) stimuliert außerdem die Translation und die mRNA Stabilität (Ford et al., 1997; Preiss und Hentze, 1998; Sachs et al., 1997). Eine fehlerhafte Polyadenylierung von zellulären RNAs wird in der Literatur oft in Verbindung mit Defekten in Zellviabilität und Entwicklungsstörungen gebracht (Zhao et al., 1999). Bei Menschen wird dadurch beispielsweise die Krankheit der Thalassämie, einem Defekt des Hämoglobins, ausgelöst (Higgs et al., 1983; Orkin et al., 1985).

Der Prozess der 3' Polyadenylierung besteht dabei aus mehreren Schritten, an denen eine Vielzahl von Proteinen beteiligt sind (siehe Abbildung 1.10). Für Säugerzellen sind bisher über 14 Proteine identifiziert, die an diesem zunächst einfach anmutenden Schritt der Spaltung und Polyadenylierung von Prä-mRNAs beteiligt sind (Mandel et al., 2008). Zunächst beinhaltet die RNA nach der Transkription eine Polyadenylierungs-Signalsequenz, ein AAUAAA, 10-30 Nukleotide stromaufwärts der späteren Spaltungs- und Polyadenylierungsstelle (Proudfoot und Brownlee, 1976; Proudfoot, 1991; Wahle und Kuhn, 1997). Ein zweiter, jedoch nicht so hoch konservierter Bereich ist eine G/U-reiche Sequenz, die sich 20-40 Nukleotide stromabwärts der Spaltungsstelle befindet. Diese beiden Sequenzen und ihr relativer Abstand zueinander sind wichtige Determinanten für exakte Stelle der RNA-Spaltung und Polyadenylierung (MacDonald et al., 1994; Chen et al, 1995). Neben diesen beiden wichtigen Sequenzbereichen wurde zum Teil zusätzlich Hilfselemente in den Sequenzen gefunden, die den Spaltungs -und Polyadenylierungsprozess stimulieren können (Mandel et al., 2008).

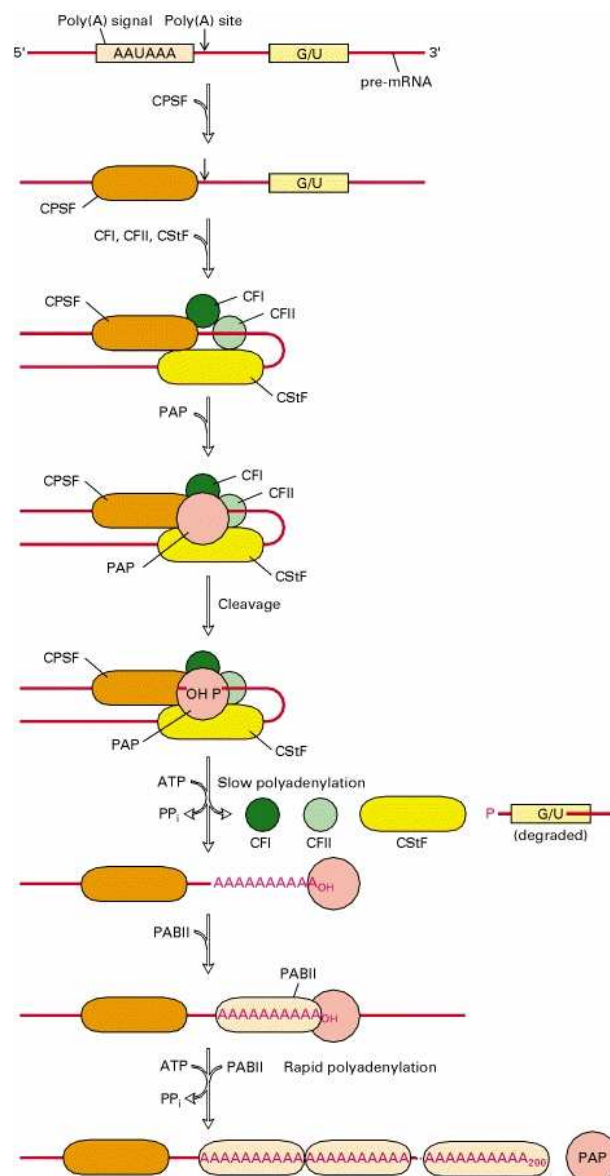
Die zahlreichen Proteine, die zum Polyadenylierungs-Komplex gehören, bestehen zum Teil aus mehreren Untereinheiten, so dass ein großer Komplex von verschiedenen Faktoren für diesen Prozess notwendig ist. Einer der bedeutendsten Faktoren ist der so genannte „cleavage/polyadenylation specificity factor“ (CPSF). Dieses Protein erkennt das Polyadenylierungssignal in der neu synthetisierten RNA, bindet die RNA allerdings nur sehr schwach (Takagaki, 1988; Keller et al., 1991). Diese Bindung wird durch einen zweiten Faktor, dem „cleavage stimulation factor“ (CstF) durch eine kooperative Bindung an die downstream gelegene Signalsequenz verstärkt (Gilmartin und Nevins, 1989; MacDonald et

al., 1994, Wilusz et al., 1990). Dieser Komplex ist nun in der Lage, weitere Faktoren an diese Stelle der RNA zu rekrutieren. CPSF interagiert neben CstF auch mit der Poly(A)-Polymerase (PAP), durch deren enzymatische Aktivität die Poly(A)-Synthese aus ATP stattfinden kann (Colgan und Manley, 1997; Wahle und Kuhn 1997). Hierbei wird auch diskutiert, dass die größte Untereinheit von CPSF die Aktivität der PAP inhibieren kann, so dass dieser Faktor nicht nur an der Poly(A)-Synthese, sondern auch an dessen Termination beteiligt ist (Murthy und Manley, 1995; Wahle, 1995). Außerdem konnte gezeigt werden, dass CPSF eine Schlüsselrolle in der Verbindung von Transkription und Polyadenylierung spielt. CPSF interagiert mit dem Transkriptionsfaktor TFIID und wird dadurch zu dem RNA Polymerase II Prä-Initiationskomplex rekrutiert. CPSF wird nun auf die elongierende Polymerase II übertragen und verbleibt mit dieser in einem Komplex, bis das Polyadenylierungssignal erreicht wird (McCracken et al., 1997; Dantonel et al., 1997).

Neben CPSF und CstF spielen zwei weitere Faktoren mit mehreren Untereinheiten in diesem Prozess eine bedeutende Rolle. Dabei handelt es sich um die Cleavage Faktoren I und II (CF I<sub>m</sub> und CF II<sub>m</sub>). Diese sind nur für die Spaltung der Prä-mRNA und nicht für die Polyadenylierungsreaktion direkt zuständig (Takagaki et al., 1989). Für CF I<sub>m</sub> konnte nachgewiesen werden, dass es RNAs mit einem Polyadenylierungssignal bindet und dass es zur Stabilisierung von CPSF-RNA Komplexen beiträgt (Ruegsegger et al., 1996).

Der am besten untersuchte Faktor des Komplexes ist die Poly(A)Polymerase. In Zellen kommt diese in unterschiedlich gespleißten Varianten vor (Raabe et al., 1991; Wahle et al., 1991). Die längsten Formen PAP I und PAP II sind enzymatisch aktiv, wobei auch einige inaktive Formen der PAP nachgewiesen werden konnten (Raabe et al., 1991; Zhao und Manley, 1996). Allerdings zeigt die PAP ohne weitere Faktoren unter physiologischen Bedingungen nur eine schwache Enzymaktivität (Wahle und Keller, 1992). Durch ihre Interaktion mit CPSF wird die PAP in den Spaltungs- und Polyadenylierungskomplex rekrutiert und katalysiert hier spezifisch die Synthese des Poly(A)-Anhangs aus ATP.

In vivo wird eine ungefähre Poly(A)-Länge von ca. 250 Nukleotiden in neu synthetisierten RNAs erreicht. Um eine solche Längenrestriktion und auch gleichzeitig einen Schutz gegen zelluläre Nukleasen zu erreichen, wird ein Poly(A)-Bindepotein (PABII) eingesetzt. Dieses Protein bindet mit einer hohen Affinität an Poly(A)-Sequenzen (Wahle et al., 1993). Schon sobald nur 8-20 As angehängt wurden, binden mehrere PABPs gleichzeitig an den Poly(A)-Schwanz (Herold et al., 2001; Patel et al., 2005). Dabei bildet PABP auch einen Komplex mit CPSF und PAP, was eine zusätzliche Stabilisierung der PAP an der RNA bewirkt und somit zu einer erhöhten Prozessivität dieses Enzyms führt (Bienroth et al., 1993). Die Limitierung der Poly(A)-Länge kommt dann nach ca. 250 Nukleotiden durch einen Abbruch der Interaktion von PABII, CPSF, PAP und der RNA zu Stande, so dass die PAP vom RNA Substrat dissoziiert (Wahle, 1995).



**Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der Polyadenylierungsreaktion am 3'-Ende neu synthetisierter RNAs in eukaryotischen Zellen.** Der Cleavage/Polyadenylation Faktor (CPSF) bindet an das Poly(A)-Signal, der Cleavage stimulation Faktor (CstF) an die G/U-reiche Region. Eine Interaktion dieser beiden Faktoren führt zu einer Zirkularisierung der RNA, Cleavage Faktoren I und II stabilisieren den Komplex. Die Poly(A)-Polymerase (PAP) stimuliert die Trennung der RNA, und die gebundenen Faktoren bis auf CPSF und die PAP dissoziieren. Eine zunächst langsame Polyadenylierung der RNA durch die PAP findet solange statt, bis PABII Moleküle den Poly(A)-Anhang binden. Die dann folgende schnellere Reaktion der Polyadenylierung wird nach ca. 250 Nukleotiden gestoppt. Abbildung aus Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al., *Molecular Cell Biology*, 4th Edition, 2000.

Neben den oben aufgeführten Faktoren, die an diesem Prozess beteiligt sind, gibt es eine Reihe zusätzlich an diesem Komplex bindende Proteine. Dazu gehört beispielsweise Symplekin, welches zur Komplexstabilisierung beiträgt. Außerdem ist zu bemerken, dass andere Organismen, wie zum Beispiel Hefe, einen leicht abweichenden Mechanismus und beteiligte Faktoren entwickelt haben (zusammengefasst in Mandel et al., 2008).

Neben den Funktionen des im Zellkern synthetisierten Poly(A)-Anhangs als RNA-Stabilisator gegen Exonukleasen konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine Polyadenylierung einer RNA das Gegenteil, nämlich eine Degradation bewirken kann. Auch ein „gewöhnlicher“ Poly(A)-Anhang von ca. 250 Nukleotiden wird nach dem Export aus dem Kern ins Zytoplasma langsam vom 3'-Ende der RNA her abgebaut, was sich an der Halbwertszeit der spezifischen mRNA messen lässt (Meyer et al., 2004; Parker und Song, 2004). Die Poly(A)-Anhänge, welche eine solche Degradation im Exosom stimulieren können, sind nur wenige Nukleotide lang. Dabei wird bisher nur spekuliert, ab alleinig die Länge des Poly(A)-Endes den Unterschied der Stabilisierung oder Destabilisierung der RNA ausmacht, weil beispielsweise kurze Poly(A)-Anhänge stabilisierende Proteine nicht binden können (Eckmann et al., 2010). Neben den Poly(A)-Polymerasen im Zellkern befinden sich ebenfalls Poly(A)-Polymerasen im Zytoplasma der Zellen. Diese regulieren die spezifische Poly(A)-Länge der RNAs in Konkurrenz mit den sich ebenfalls im Zytoplasma befinden Deadenylasen, was zu einer genaueren Fein-Einstellung der Poly(A)-Länge führt (Eckmann et al., 2010).

Auch einige Viren machen sich die Mechanismen der Zelle zum RNA-Abbau zu Nutze, um ihre eigene RNA effektiver replizieren und translatieren zu können (Sokoloski et al., 2009). Ein sehr anschauliches Beispiel dafür ist das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV), was häufig Tumore bei AIDS-Patienten auslöst. Dieses Virus stimuliert den zellulären mRNA-Abbau durch das virale „Shut-Off und Exonuklease“ (SOX) Protein, indem dieses die zellulären polyadenylierten mRNA hyperadenyliert und ebenso zu einem Transport von PABPC1 in den Zellkern führt (Glaunsinger und Ganem, 2004; Lee und Glaunsinger, 2009). Neben diesem Transport von PABPC1 in den Kern zeigen einige Viren andere Mechanismen, um dieses Protein für die Zelle unbrauchbar zu machen. Dazu gehört z.B. die proteolytische Spaltung des Proteins mit Hilfe von viralen Protease wie bei Poliovirus oder HIV (Joachims et al., 1999; Alvarez et al., 2006). Das Rötelnvirus hingegen kann PABPC1 direkt an sein eigenes Kapsid binden und entzieht dieses somit dem zellulären Mechanismus (Ilkow et al., 2008), wohingegen beispielsweise das Dengue-Virus dieses Protein an seine eigene 3'-UTR bindet und es somit für seine eigene RNA nutzen kann (Polacek et al., 2009).

### **1.5.2 Polyadenylierung viraler RNAs**

Auch bei einigen Viren findet ebenfalls eine Polyadenylierung der RNAs statt, allerdings sind auch Viren bekannt, z. B. Reoviren oder Arenaviren, die statt eines Poly(A)-Anhangs zur Stabilisierung ebenso wie HCV eine terminale Stem-loop-Struktur besitzen.

Dieser Prozess der viralen Polyadenylierung kann je nach Virustyp leicht unterschiedlich ablaufen. Einige Virusfamilien wie Adenoviren, Herpesviren oder Polyomaviren benutzen zelluläre Enzyme zur Polyadenylierung ihrer Prä-mRNAs. Hier findet, wie bei der Reaktion an zellulären mRNAs, zunächst eine Spaltung und danach die Polyadenylierung statt. Dabei



befinden sich hier ebenfalls die spezifische Polyadenylierungssequenz AAUAAA und die G/U-reiche Sequenz in der Nähe der Spaltungsstelle (Fitzgerald und Shenk, 1981). Die Länge der Poly(A)-Anhänge beträgt auch hier ungefähr 250 Nukleotide.

Etwas unterschiedlich zu diesem zellulären, eukaryotischen Mechanismus verhält es sich in den Virusfamilien, die virale Enzyme für die Polyadenylierung der Prä-mRNA mitbringen und verwenden. Auf der einen Seite ist das Vacciniavirus zu finden, welches die Polyadenylierung nach der Termination der Transkription durchführt (Nevins und Joklik, 1977), auf der anderen Seite befinden sich die Viren, welche eine Polyadenylierung während der mRNA-Synthese zeigen. Dazu gehören beispielsweise Picornaviren, Rhabdoviren und Orthomyxoviren.

Vacciniavirus benutzt dabei seine eigene Poly(A)-Polymerase gemeinsam mit der viralen 2'-O-Methyltransferase, die auch im Prozess der Transkription gebraucht wird, nach Spaltung der Prä-mRNA in einem ähnlich den zellulären RNAs durchgeführten Polyadenylierungsprozess (Gershon et al., 1991; Gershon und Moss, 1993).

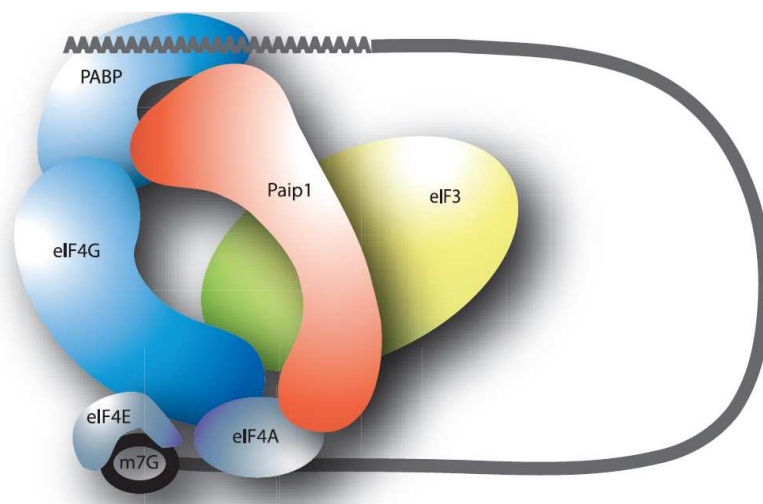
Das Anhängen von Poly(A)-Enden während der RNA-Synthese wird nach einem anderen Mechanismus durchgeführt. Beispielsweise ist bei den positivsträngigen Picornaviren in ihrem Template-Negativstrang eine Poly(U)-Sequenz am 5'-Ende vorhanden, so dass bei erneuter Transkription neuer Positivstränge eine Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende der RNA entsteht (Dorsch-Häsler et al., 1975). Negativstrang-RNA Viren beispielsweise das Influenzavirus oder das Vesikuläre Stomatitis Virus können durch ein wiederholtes Transkribieren einer eher kurzen Poly(U)-Sequenz im Template ihre RNAs polyadenylieren solange bis die Gesamtlänge an Poly(A)-Anhang erreicht ist (Mikulášová et al., 2000; Ehrenfeld, 1974)).

### **1.5.3 Stimulation der cap-abhängigen Translation durch einen 3'-Poly(A)-Anhang**

Die Translation zellulärer gecappter mRNA wird durch die Anwesenheit eines 3'-Poly(A)-Anhangs deutlich stimuliert. Sowohl das 5'-Cap als auch der 3'-Poly(A)-Anhang sind wichtige regulatorische Elemente der Translation und zudem verantwortlich für die Stabilität der mRNA sind (Banerjee, 1980; Sonenberg, 1988; Jackson und Standart, 1990; Munroe und Jacobson, 1990). Die Translationseffizienz der mRNAs wird dabei synergistisch durch die 5'-Cap-Struktur und den 3'-Poly(A)-Anhang stimuliert werden, wohingegen die Stabilität der RNA nur additiv erhöht wird (Gallie, 1991; Preiss und Hentze, 1998; Kahvejian et al., 2001).

Mechanistisch wird die Translationsstimulation durch das Poly(A)-Ende durch eine Proteininteraktion, die das 5'- und 3'-Ende der mRNA zusammenfügt, erklärt. Eine Zirkularisierung der gecappten und polyadenylierten RNA wurde mit Hilfe von hochauflösenden Mikroskop-Aufnahmen gezeigt (Wells et al., 1998). Bei diesem Mechanismus ist die Interaktion von PABP mit dem 3'-Poly(A)-Anhang der RNA von Bedeutung. Mehrere PABP-Moleküle binden an den Poly(A)-Anhang und vermitteln somit

den stimulatorischen Effekt auf die Translationsinitiation (Deo et al., 1999; Kahvejian et al., 2001; Sachs, 2001). In der Literatur wird die Bindung eines Moleküls PABP alle 27 Adeninreste am 3'-Ende beschrieben, allerdings reicht wohl ein Poly(A)-Anhang von 12 A schon für die Bindung aus (Baer et al., 1983; Sachs et al., 1987). Außerdem ist die Anwesenheit und Bindung von PABP an den 3'-Poly(A)-Anhang für die Stabilität der mRNA als Schutz gegenüber Degradation durch Nukleasen von Bedeutung (Bernstein et al., 1989). Weiterhin kann PABP mit weiteren PABP-bindenden Proteinen (Paip = Poly(A)-binding protein-interacting protein) interagieren (Craig et al., 1998; Khaleghpour et al., 2001; Berlanga et al., 2006). Paip1 stimuliert die cap-abhängige Translation zusätzlich (Craig et al. 1998) und diese Stimulation kommt durch eine Interaktion mit eIF3 zu Stande (Martineau et al., 2008). Paip2 hingegen ist ein Inhibitor der 80S-Komplex-Bildung und wirkt somit reprimierend auf die Translation (Kaleghpour et al., 2001). Eine Translationsstimulation durch den 3'-Poly(A)-Anhang findet allerdings, wenn auch etwas geringer, auch in Abwesenheit von Paip1 statt. Hier spielt die Interaktion von PABP mit eIF4G die entscheidende Rolle für die Zirkularisierung der RNA und somit für den Stimulationseffekt durch den Poly(A)-Anhang (Tarun und Sachs 1996; Le et al., 1997; Imataka et al., 1998). eIF4G wiederum bindet innerhalb des multifaktoriellen Komplexes eIF4F weitere Faktoren wie eIF4E und eIF4A, wobei eIF4E direkt an die Cap-Struktur der RNA bindet. Außerdem findet an dieser Stelle auch die Bindung von eIF3 statt, was die Rekrutierung der 40S-ribosomalen Untereinheit an die Cap-Struktur der RNA ermöglicht. Eine schematische Darstellung des Modells der Zirkularisierung einer gecappten und polyadenylierten mRNA durch die verschiedenen Initiationsfaktoren bzw. Poly(A)-Anhang-bindende Proteine ist in Abbildung 1.11 gezeigt.



**Abbildung 1.11: Schematische Darstellung des Modells der Zirkularisierung einer gecappten und polyadenylierten mRNA.** Die 5'-Cap-Struktur der RNA wird durch eIF4E direkt gebunden. eIF4G bindet sowohl eIF4E, eIF4A sowie eIF3 und vermittelt zusätzlich die Interaktion mit PABP, dem Poly(A)-bindenden Protein. Paip1 stabilisiert diesen entstanden Komplex, und die Translationsstimulation durch den Poly(A)-Anhang wird zusätzlich stimuliert. Abbildung aus Martineau et al., 2008).

Neben der Zirkularisierung spielen wahrscheinlich auch weitere Mechanismen bei der Stimulation der cap-abhängigen Translation durch den Poly(A)-Anhang eine Rolle (Kahvejian et al., 2005). Beispielsweise wird in diesem Zusammenhang ein effizienteres Recycling der translatierenden Ribosomen durch eine Interaktion von eRF3 und PABP diskutiert (Jacobson 1996; Kahvejian et al., 2001; Uchida et al., 2002; Lopez-Lastra et al., 2005). Eine weiterer möglicher Mechanismus für die Erhöhung der Translationseffizienz durch den Poly(A)-Anhang ist eine verbesserte Assoziation der ribosomalen Untereinheiten am Start-Codon der RNA durch PABP (Searfoss et al., 2001; Kahvejian et al., 2005).

Dieser Mechanismus der synergistischen Translationsstimulation durch 5'-Cap-Struktur und 3'- Poly(A)-Anhang bietet somit auch die Möglichkeit der Regulation der Translation. Dies spielt beispielsweise während der Entwicklung eine Rolle, indem Poly(A)-Anhänge verlängert oder verkürzt werden (Wickens et al., 1996; Muckenthaler et al., 1997). Bei der Regulierung der Poly(A)-Länge während des mRNA-Abbau ist die Cap-Struktur von hoher Bedeutung, da die Poly(A)-spezifische Ribonuklease (PARN) mit diesem 5'-Ende der RNA interagiert und so ihre Aktivität für den Abbau des Poly(A)-Anhangs erhöht (Dehlin et al., 2000). Eine Herunterregulierung der Translationseffizienz geschied allerdings nicht allein durch die Poly(A)-Längen Kontrolle, sondern Faktoren wie Paip2 oder 4E-BPs (4E binding proteins), welche die Zirkularisierung der RNA durch Kompetition beeinflussen (Gingras et al., 1999; Kaleghpour et al., 2001; Seal et al., 2005; Lopez-Lastra et al., 2005)

### 1.6 Der Zellzyklus

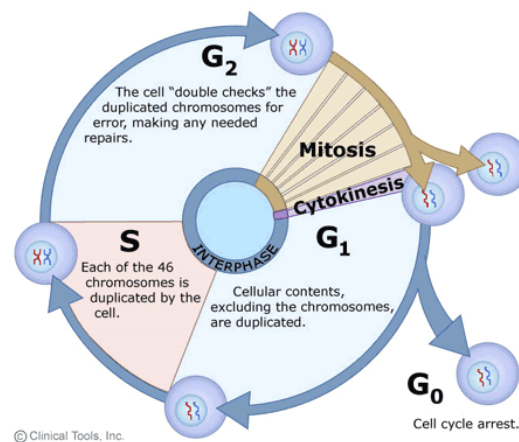
Um sich zu vermehren, durchlaufen Zellen den Zellteilungszyklus oder kurz Zellzyklus. Darin wechseln sich die Mitosephase (M-Phase), in der die eigentliche Teilung der Zelle vonstatten geht, und die Interphase, eine Wachstumsphase der Zellen, ab.

Im Zellzyklus ist die Phase der Mitose zeitlich gesehen der kürzeste Teil. Dieser kann nochmals grob in verschiedene Phasen aufgeteilt werden, die Prophase, die Metaphase, die Anaphase und die Telephase.

Die nachfolgende Interphase besteht aus der G<sub>1</sub>-Phase (Gap<sub>1</sub>-Phase), der S-Phase (Synthese-Phase) und der G<sub>2</sub>-Phase. Außerdem können Zellen in die G<sub>0</sub>-Phase eintreten. Hier findet keine weitere Zellteilung mehr statt, und die Zellen sind sozusagen „arretiert“.

In der G<sub>1</sub>-Phase findet das eigentliche Zellwachstum statt. Hier werden die zellulären Bestandteile, außer den Chromosomen verdoppelt werden. Die Synthese beziehungsweise die Verdopplung der chromosomalen DNA findet in der darauf folgenden S-Phase statt. In der G<sub>2</sub>-Phase bereitet sich die Zelle auf die bevorstehende Teilung vor und kontrolliert die neu synthetisierte DNA auf Fehler. Die Teilung der Zelle in die zwei Tochterzellen findet dann in der M-Phase statt. Innerhalb des Zellzyklus gibt es verschiedenen Kontroll-Punkte, die über den weiteren Verlauf entscheiden. So wird beispielsweise in der G<sub>1</sub>-Phase darüber entschieden, ob die Zelle einen weiteren Zyklus durchläuft oder in die G<sub>0</sub>-Ruhephase übergeht. Dies hängt häufig von äußeren Faktoren beispielsweise der Zelldichte oder dem

Vorhandensein von Wachstumsfaktoren ab. Unter Umständen kann es durch diese Kontrollpunkte auch zur Apoptose der Zellen kommen, falls nicht behebbare Fehler auftreten.



**Abbildung 1.12: Schematische Darstellung der einzelnen Phasen des Zellzyklus.** Die Mitose wechselt sich mit der Interphase, bestehend aus G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>-Phase ab. In der Mitose teilt sich der Zellkern und die Chromosomen. In der Zytokinese findet die Teilung des Zytoplasmas statt. Die G<sub>0</sub>-Phase bezeichnet den Zustand des Zellarrests.

Die zeitliche Regulation des Zellzyklus erfolgt mit Hilfe von Proteinkinasen bzw. Phosphatasen, welche für eine Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Zyklinen zuständig sind. Diese werden daher auch zyclinabhängige Proteinkinasen (cyclin-dependent kinases = CdKs) genannt. Die Konzentration der einzelnen CdKs ist während des gesamten Zellzyklus konstant, eine Regulierung findet nur auf der Ebene des jeweiligen Zyklins statt.

### 1.6.1 Einfluss von Viren auf den Zellzyklus

Mittlerweile ist von einer Vielzahl von Viren bekannt, dass sie bei einer Infektion der Zelle Einfluss auf deren Zellzyklus nehmen. Dies ist besonders häufig bei den kleinen DNA-Viren zu beobachten, da diese die zellulären Enzyme und Mechanismen für die Replikation ihrer eigenen DNA benutzen (Shadan et al., 1994). Dies ist beispielsweise bei den Parvoviren der Fall. Aber ebenfalls einige große DNA-Viren und auch RNA-Viren greifen in die Regulation des Zellzyklus der Wirtszelle ein. Dies kann auf vielfältige Weise geschehen, beispielsweise durch Bindung des Proteins p53, welches ebenfalls an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist. Zu finden ist dieser Mechanismus unter anderem beim Simian Virus 40 (SV40), beim humanen Papillomavirus oder beim Hepatitis B Virus (Lin und Simmons, 1991; Thomas et al., 1996; Benn und Schneider, 1995). Auch die Manipulierung des Retinoblastomproteins (pRb) ist ein häufig anzutreffender viraler Mechanismus, um den Zellzyklus zu regulieren. Dies ist beispielsweise bei SV40, humanen Papillomaviren oder humanen Adenoviren zu finden (Chellappan et al., 1992).

Die Mechanismen von Viren bezüglich ihres Eingreifens in den Zellzyklus sind allerdings sehr vielfältig und komplex. Eine kurze Übersicht darüber ist in Schafer (1998) gegeben. Mit

Hilfe dieser Manipulationswege des Wirtszellzyklus ist auch die onkogene Wirkungsweise von manchen viralen Infektionen zu erklären (Vousden und Farrel, 1994; Vousden 1995).

Auch eine Infektion mit dem Hepatitis C Virus beeinflusst den Zellzyklus seiner Wirtszelle und kann somit unter Umständen zum Hepatozellulärem Karzinom (HCC) führen (McGivern und Lemon, 2009). Hier wurden beispielsweise ebenfalls eine Interaktion mit p53 (Anzola und Burgos, 2003) oder dem pRb-Pathway gefunden (Cho et al., 2001).

In der Literatur wird auch ein Effekt des Zellzyklus auf die Translation diskutiert. Bei einigen zellulären IRES- als auch für einige virale IRES-Elemente konnte gezeigt werden, dass die Translation in der G2/M-Phase erhöht ist (Cornelis et al., 2000; Pyronnet et al., 2000; Honda et al., 2000). Die erhöhte Aktivität der IRES von HCV in dieser Phase des Zellzyklus konnte allerdings in anderen Studien nicht bestätigt werden (Venkatesan et al., 2003).

### 1.7 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte zunächst der Effekt der viralen HCV 3'-UTR auf die IRES abhängige Translation des Hepatitis C Virus *in vitro* und *in vivo* getestet werden, da in der Literatur sehr unterschiedliche Ansichten zu diesem Effekt vorliegen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war außerdem, den Einfluss der verschiedenen Regionen der HCV 3'-UTR auf die Translationsinitiation zu untersuchen.

Ebenso sollte die Frage beantwortet werden, ob bei HCV IRES-verwandten IRES-Elementen, wie beispielsweise die des Porcinen Teschovirus, ebenfalls ein ähnlicher Effekt durch die HCV 3'-UTR auftritt und ob der Effekt der HCV 3'-UTR auf die Translation spezifisch für diese Art von IRES ist, oder ob es sich hierbei eher um einen generellen Mechanismus der Translationsbeeinflussung handelt. Zusätzlich stellte sich die Frage, ob es sich hierbei um einen zelltyp-spezifischen Effekt handelt.

Da neben der IRES-abhängigen Translationsinitiation in Zellen hauptsächlich die cap-abhängige Translation verwendet wird, soll hier ebenfalls der Effekt der HCV 3'-UTR auf die Translation getestet werden.

Aufgrund des Nachweises, dass ein Poly(A)-Anhang am 3'-Ende einer RNA die cap-abhängige Translation stimulieren kann, sollte in dieser Arbeit auch getestet werden, ob diese Art des 3'-Endes auch einen Effekt auf die IRES-abhängige Translation von verschiedenen IRES-Elementen haben kann. Ein besonderes Augenmerk galt dabei der Länge des Poly(A)-Anhangs am 3'-Ende und deren Auswirkung auf cap- und IRES-abhängige Translation *in vivo* und *in vitro*.

Die gezeigten Effekte der HCV 3'-UTR und des Poly(A)-Anhangs auf die IRES- und cap-abhängige Translation sollte außerdem im Verlauf des Zellzyklus gezeigt werden. Dies geschah, um zu testen, ob der gezeigte Effekt in einer bestimmten Phase des Zellzyklus besonders ausgeprägt ist, und um somit eventuell zusätzliche Rückschlüsse auf den zu Grunde liegenden Mechanismus ziehen zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Mikrobiologie

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Der *E.coli* Stamm XL1-Blue besitzt eine Tetrazyclin-Resistenz als Selektionsmarker. Außerdem hat er keine Endonuklease (*endA*) Aktivität, was die Qualität der präparierten DNA erhöht, sowie keine Rekombinase (*recA*) Aktivität, was sich positiv auf die Stabilität des Inserts auswirkt.

#### 2.1.2 Nährboden und Flüssigmedium

Agar-Platten aus LB-Medium und 1,5 % (w/v) Bacto-Agar wurden von der Nährbodenküche der Medizinischen Mikrobiologie (Universitätsklinikum Gießen) bezogen.

Luria-Broth(LB)-Medium wird aus folgenden Bestandteilen angesetzt und direkt danach autoklaviert:

Bestandteile	Endkonzentration	Firma
Hefeextrakt	5 g/L	Roth, Karlsruhe
Bacto-Trypton	10 g/L	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	10 g/L	Roth, Karlsruhe

#### 2.1.3 Antibiotika

Der für Transformationen verwendete Bakterienstamm XL1-Blue trägt zur Selektion eine Tetrazyclin-Resistenz. Die transformierten Plasmide tragen alle eine Ampicillin-Resistenz. Daher wurden sowohl den Agarplatten als auch den Flüssigmedien beide Antibiotika zugesetzt.

Antibiotikum	Endkonzentration	Firma
Tetrazyclin	250 µg/ml	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	15 µg/ml	Roth, Karlsruhe

#### 2.1.4 Herstellung von elektrokompetenten Bakterien

Einige Milliliter einer Bakterienübernachtskultur werden in 100 ml frisches LB-Medium gegeben und bei 37 °C unter Schütteln so lange inkubiert bis die OD<sub>600</sub> der Kultur bei 0,6 liegt. Dann wird die Kultur bei 5.000 rpm für 5 min pelletiert und der Überstand abgeschüttet. Die Zellen werden nun in 50 ml eiskalten bidestilliertem Wasser aufgenommen und bei 5.500 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschschritt wird danach noch zweimal wiederholt. Der Überstand wird nun bis auf ca. 2 ml abgenommen und das verbleibende Pellet darin gelöst. Die Bakterien werden nun mit Glycerin (Endkonzentration 15 %) versetzt

und als 80 µl Aliquots bei -70 °C eingefroren. Die kompetenten Zellen sind nun ca. ein halbes Jahr haltbar.

### **2.1.5 Transformation von Plasmid DNA in elektrokompetente Bakterien**

Die elektrokompetenten Bakterienzellen werden langsam auf Eis aufgetaut. In die für die Transformation verwendeten Elektroporationsküvetten werden 50 µl bidestilliertes Wasser vorgelegt. Transformiert werden in der Regel 0,001 pmol Plasmid DNA oder 10 µl der Ligationsansätze. Die DNA wird mit je einem *E.coli*-Aliquot gut gemischt und in die Elektroporationsküvette pipettiert. Die Küvette wird in den Elektroporator gestellt, wo durch einen Stromimpuls von 2.200 V die Bakterien dazu gebracht werden, die DNA aufzunehmen. Danach werden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 h bei 37 °C inkubiert. In der Zwischenzeit werden die Antibiotika für die Selektion gleichmäßig auf die Agarplatten verteilt (Tetrazyclin für die Selektion der XL1-Blue-Zellen und Ampicillin für die Selektion der transformierten Plasmide). 100 µl der Ansätze beziehungsweise bei Ligationstransformationen der ganze Ansatz werden nun auf den Nährböden ausplattiert, die Platten mit Parafilm verschlossen und kopfüber über Nacht bei 37°C inkubiert, bis Kolonien deutlich sichtbar werden. Bei allen Transformationen wurde als Negativkontrolle ein Ansatz ohne DNA mitgeführt.

### **2.1.6 Herstellung von Bakterien-Glycerin-Stocks**

Um Bakterien langfristig aufbewahren zu können, werden Glycerin-Stocks angelegt. Dies hat den Vorteil, dass zum Beispiel Plasmide nicht immer wieder neu transformiert werden müssen und eine entsprechende Kultur schneller wieder hochgezogen werden kann. Dazu wird die Bakterienkultur mit kaltem Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15 % versetzt und gut gemischt. Bei -70 °C gelagert halten die Bakterien mehrere Jahre. Um eine Kultur des Stocks hochwachsen lassen zu können, wird dann mit einer Impf-Öse etwas gefrorenes Material von der Oberfläche abgekratzt und damit das Medium direkt angeimpft.

## **2.2 Molekularbiologie**

### **2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA**

#### **2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)**

Zur Präparation von kleineren Mengen DNA aus Bakterien wird das „Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Kit“ der Firma Promega verwendet.

Dazu werden ca. 3 ml einer Übernacht-Bakterienkultur bei 5.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das entstandene Pellet nun sorgfältig in 250 µl der „Cell resuspension solution“, die RNase A enthält, resuspendiert.

Die Zelllyse erfolgt durch Zugabe von 250 µl der SDS-haltigen „cell lysis solution“. Das Reaktionsgefäß wird zum Durchmischen 4 mal invertiert und ca. 2 Minuten inkubiert, bis die

Suspension klar geworden ist. Dann erfolgt die Zugabe von 10 µl der „alkalischen Protease Solution“ und eine kurze Inkubation von 5 Minuten. Die Protease inaktiviert zelluläre Endonukleasen und andere Proteine, welche durch die Lyseschritte frei geworden sind und die Plasmid-DNA beschädigen könnten. Nach Zugabe von je 350 µl des Neutralisationspuffers und erneutem Invertieren des Eppendorfgefäßes werden ausgefallene Bestandteile bei 13.000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert.

Der Überstand, der nun die Plasmid-DNA enthält, wird nun auf eine im Kit enthaltene Säule gegeben und bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die DNA bleibt nun an der Säulenmatrix gebunden, und der Durchfluss wird verworfen. Die DNA wird nun mit 750 µl des Ethanolhaltigen Waschpuffers gewaschen. Dieser Schritt wird mit weiteren 250 µl Waschpuffer wiederholt. Die Säule wird danach nochmal für eine Minute bei 13.000 rpm trocken zentrifugiert. Die Elution erfolgt mit 100 µl ddH<sub>2</sub>O bei ebenfalls 13.000 rpm für eine Minute. Die DNA kann nun bei -20 °C oder kälter für mehrere Jahre gelagert werden.

### **2.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräparation)**

Um größere Mengen Plasmid-DNA aus Bakterienzellen zu extrahieren, wurde das Kit „NucleoBond AX 100“ der Firma Macherey-Nagel verwendet.

Dazu wird zunächst eine 100 ml Bakterien-Übernachtskultur bei 5.000 rpm für 4 min und 4 °C in der Kühlzentrifuge pelletiert und der Überstand verworfen. Das so entstandene Pellet wird in 4 ml des Puffers S1, dem zusätzlich 40 µl RNase A (10 mg/ml) zugegeben wurde, resuspendiert.

Die Zellyse erfolgt durch Zugabe von 4 ml des SDS-haltigen Puffers S2, und der Zentrifugenbecher wird zur besseren Durchmischung 6 - 8 mal invertiert.

Durch Hinzufügen von 4 ml des Puffers S3 und Invertieren des Bechers wird die Reaktion neutralisiert. Hierbei denaturieren die komplexe chromosomale DNA und zelluläre Proteine, und die kleinere Plasmid-DNA bleibt in Lösung. Durch erneute Zentrifugation bei 9.000 rpm für 30 min bei 4 °C werden die denaturierten Bestandteile pelletiert, und der Überstand enthält die Plasmid-DNA. Dieser wird über einen mit ddH<sub>2</sub>O befeuchteten Faltenfilter filtriert und in einem Falcontube aufgefangen.

Die Anionen-Austauscher-Säulen werden mit 2,5 ml des Puffers N2 equilibriert, bevor das Filtrat zweimal durch die Säule gegeben wird. Hierbei bindet die DNA an die Säulenmatrix. Die Säule wird nun mit 10 ml des Puffers N3 gewaschen. Die Elution der DNA von der Säule erfolgt durch den Puffer N5, wobei die ersten 0,4 ml davon verworfen werden. Je 4 mal werden weitere 1 ml des Puffers N5 auf die Säule gegeben und in 2 ml Eppendorfgefäßen aufgefangen. Durch Zugabe von je 700 µl Isopropanol pro Eppendorfgefäß wird die DNA präzipitiert und anschließend bei 13.000 rpm für 30 min bei 4 °C pelletiert. Die DNA-Pellets werden danach zweimal mit je 500 µl kaltem 80 %igem Ethanol gewaschen und der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Dann erfolgt die Trocknung der Pellets bei



Raumtemperatur. Die Pellets aller 4 Reaktionsgefäße werden in insgesamt 100 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wird verwendet, um DNA-Abschnitte mit einem definierten Anfang und Ende zu generieren. Somit ist diese Methode geeignet, um gezielt DNA-Fragmente zu vermehren, die dann als Matrize für die *in vitro*-Transkription genutzt oder auch für Klonierungen verwendet werden können.

In die Reaktion werden neben der DNA, aus der die Zielsequenz stammt, zwei Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, welche die zu amplifizierende Sequenz flankieren. Im ersten Schritt der PCR wird der DNA-Matrizenstrang bei 95 °C aufgeschmolzen. Darauf folgt ein Absenken der Temperatur, was das komplementäre Binden (Annealing) der Oligonukleotide an die DNA Einzelstränge ermöglicht. Die freien 3'OH-Enden können dann von einer hitzestabilen DNA Polymerase als Startpunkt für die DNA Synthese verwendet werden (Elongation). Durch mehrfache Wiederholung dieser Schritte erfolgt eine exponentielle Vermehrung des DNA-Abschnitts.

In einem Standard-Reaktionsansatz werden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

<u>Bestandteil</u>	<u>Endkonzentration</u>
GoTaq Flexi Puffer	1 x
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
dNTPS	250 mM
Primer forward	0,5 µM
Primer reverse	0,5 µM
Template	10 ng/µl
GoTaq Flexi DNA Polymerase	0,15 U/µl
ddH <sub>2</sub> O	

#### Standard- PCR Programm

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit (min)</u>	
Denaturierung	95 °C	2:00	
Annealing	95 °C	0:30	} 30 x
	nach Primer T <sub>m</sub>	1:00	
	72 °C	1:00	
Polymerisation	72 °C	3:00	

Auch für Klonierungen kann die Methode der PCR angewendet werden. Dabei ist es jedoch wichtig, dass die eingesetzte Polymerase eine Korrekturlesefunktion („proof-reading“) hat,

damit die Wahrscheinlichkeit von Mutationen im Fragment heruntergesetzt wird. Dazu wird die „Combizyme“ DNA-Polymerase mit ihrem entsprechenden Puffer verwendet.

### 2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Im Agarose-Gel werden Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. Dabei wandern kleine Fragmente schneller durch das grobmaschige Netz aus Agarose als große Fragmente. Durch den Vergleich der Banden mit einem Standard können sowohl Größe als auch Menge der Nukleinsäuren abgeschätzt werden.

Zunächst wird die entsprechende Menge Agarose (soweit nicht anders angegeben 1 % w/v) in Elektrophoresepuffer gegeben und autoklaviert. Nach Einsetzen der Kämme in die Elektrophoresekammer und Aufkochen der Agarose in der Mikrowelle wird die Lösung in die Kammer gegossen und abkühlen gelassen bis die Agarose fest ist. Nach Einfüllen des E-Puffers, werden vorsichtig die Kämme gezogen.

Zum Auftragen der Proben müssen diese zuvor auf ein Stück Parafilm mit einem Ladepuffer versetzt werden. Als Vergleichsstandard für DNA dient „Hyperladder I“ der Firma Bioline, der eine Bandbreite von 200 bp bis 10.000 bp besitzt. Der RNA-Marker „RiboRuler“ von Fermentas beinhaltet Fragmente von 200 bp bis zu 6.000 bp. Dieser muss jedoch vor der Verwendung für 10 min bei 70 °C erhitzt und auf Eis wieder abgekühlt werden.

Das Gel wird nun an eine Stromquelle angeschlossen, so dass ein elektrisches Feld entsteht, in dem die negativ geladene Nukleinsäure zum (+)-Pol läuft. Die Elektrophoresezeit beträgt ca. 25 min bei 230 mA.

Um die Fragmente unter dem UV-Licht sichtbar zu machen, wird das Gel nun mit Ethidiumbromid für ca. 30 min gefärbt. Die Banden im Gel können nun auf dem UV-Tisch angeschaut und fotografiert werden.

Für präparative Gele, zum Beispiel für die Aufreinigung von DNA Fragmenten für Klonierungen, wird 1,5 %ige Agarose verwendet und das Gel für ca. 60 - 90 min bei 150 mA gefahren. Nach der Anfärbung werden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell vorsichtig ausgeschnitten und mit Hilfe des „GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in Aqua bidest eluiert.

### 2.2.4 Klonierungen

Um bestimmte DNA-Fragmente wie IRES-Elemente punktgenau in ein anderes Plasmid zu klonieren, wird die Methode der PCR angewendet. Dazu wird der umzusetzende Teil der DNA zunächst durch eine präparative PCR mit einer proof-reading Polymerase vermehrt. Die Primer können dabei so gestaltet werden, dass zusätzliche Schnittstellen für Restriktionsenzyme, welche die Einklonierung in einen anderen Vektor erleichtern, enthalten sind.

Wenn sowohl des PCR-Fragment als auch der Vektor passende Restriktionsschnittstellen für die Klonierung besitzen, werden entsprechend beide geschnitten und wenn nötig über ein

präparatives Agarosegel aufgereinigt. Nach der Dephosphorylierung der 5'-Enden des Vektors und anschließender Ligation der Fragmente wird die DNA in kompetente Bakterien transformiert.

### 2.2.4.1 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Da das Schneiden des Vektors 5'-Phosphatreste hinterlässt, wird das Fragment nun mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) behandelt. Dies verhindert somit eine Selbstligation des Vektors. Die Inkubation beträgt 10 min bei 37 °C. Danach wird das Enzym für 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

### 2.2.4.2 Ligation von DNA Fragmenten

Die Ligation der entstandenen DNA-Fragmente erfolgt mit Hilfe der Bakteriophagen T4-DNA-Ligase. Dazu werden verschiedene Verhältnisse von Vektor und einzuklonierendem Fragment pipettiert (Konzentrationen Vektors: Fragment von 1:0 bis 1:20), wobei die Menge des Vektor konstant bei 0,03 pmol bleibt.

#### Standard-Ligationsansatz:

<u>Bestandteil</u>	<u>Endkonzentration</u>
Vektor	0,03 pmol
Fragment	0,09 – 0,6 pmol
Ligase Puffer	1x
rATP	0,5 mM
T4-DNA-Ligase	0,5 U
A. bidest	ad 20 µl

Die Reaktionen werden zunächst 4 Stunden bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Je 10 µl eines Ansatzes werden dann in elektrokompente *E.coli* XL1-Blue transformiert. Zur Kontrolle der neuen Klone wird die DNA nach der erneuten Isolation zum Sequenzieren geschickt (GATC-Biotech, Konstanz).

### 2.2.5 Herstellung von DNA-Templates für die *in vitro*-Transkription

Um transkriptionsfähige Templates der Plasmid DNA zu bekommen, wird die zu transkribierende DNA zunächst per PCR amplifiziert. Diese Methode hat gegenüber dem Schneiden eines Plasmids den Vorteil, dass hierbei die Enden der Fragmente beliebig durch die Sequenz des Primer bestimmt werden können. Dies ist wichtig, da so authentische Enden der RNA generiert werden können. Außerdem können hierbei auch zusätzliche Sequenzen wie PolyT oder Promotorsequenzen angehängt werden.

Nach der PCR wird das Template so aufgereinigt, dass es keine RNasen enthält. Dafür wird ein Proteinase-K Verdau mit anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation durchgeführt. Das in Aqua bidest gelöste Template wird nun direkt in die *in vitro*-Transkription eingesetzt.

### 2.2.5.1 Reinigung von Nukleinsäuren

#### 2.2.5.1.1 Proteinase-K Verdau

Damit eine DNA als Template für die *in vitro*-Transkription fungieren kann, muss sie frei von Nukleasen sein. Um dies zu erreichen, wird dem Ansatz Proteinase-K zugesetzt. Die Reaktion wird zusammen mit 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-Cl (pH 7,5) und 0,2 µg/µl der Proteinase für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung des Enzyms wird eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt.

#### 2.2.5.1.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zu dem Ansatz wird 1 Volumen Phenol zugegeben und bei 13.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Durch das Phenol werden Proteine denaturiert und befinden sich nun in der unteren, organischen Phase des Gemischs. Die obere, wässrige Phase enthält die DNA. Diese Phase wird in ein neues Eppendorftube überführt und mit einem Volumen eines 1:1 Gemischs aus Phenol/Chloroform vermischt. Um Phenolreste zu entfernen, wird nach erneuter Zentrifugation nun wiederum die obere Phase abgenommen und mit einem Volumen Chloroform gemischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wird die obere Phase mit der Nukleinsäure in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und die enthaltene DNA mit Hilfe von Ethanol gefällt.

#### 2.2.5.1.3 Ethanol-Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Fällung der DNA wird dem Ansatz Natriumacetat von einer Endkonzentration von 0,3 M sowie 3 Volumen 99 %iges Ethanol zugegeben. Die Präzipitation erfolgt hierbei in der Regel bei -20 °C über Nacht oder für 2 Stunden bei -70 °C . Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm für 30 min bei 4 °C wird der Überstand vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet zweimal mit 80 %igem Ethanol gewaschen. Danach wird der Überstand möglichst vollständig abgenommen und das Pellet getrocknet. Die Nukleinsäure wird dann in ddH<sub>2</sub>O gelöst und kann nun für die *in vitro* Transkription verwendet werden.

### 2.2.6.0 *In vitro*-Transkription

Die durch PCR oder Restriktionsverdau entstandenen DNA-Templates werden nach der Aufreinigung durch Proteinase-K Verdau, Phenol-Chloroform-Extraktion sowie anschließender Ethanolpräzipitation in eine Transkriptionsreaktion eingesetzt. Dabei wird mit Hilfe einer RNA-Polymerase RNA synthetisiert.

Soweit nicht anders beschrieben werden alle Transkriptionsansätze nach folgendem Standardschema pipettiert:

<u>Bestandteil</u>	<u>Endkonzentration</u>
Transkriptionspuffer	1 x
DTT	10 mM
rNTPs	250 $\mu$ M
DNA-Template	x $\mu$ g
T7 RNA-Polymerase	1 U/ $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	

Die Ansätze werden für 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und die RNA-Synthese auf einen Agarosegel kontrolliert.

### **2.2.6.1 *In vitro*-Transkription von gecappter RNA**

Die Synthese von gecappter RNA erfolgt prinzipiell wie die von nicht-gecappter RNA (s. Kap. 2.2.6.0). Dazu wird hier allerdings die Konzentration von rGTP auf 50  $\mu$ M herabgesetzt und zusätzlich ein Cap-Nukleotid (m<sup>7</sup>GpppG, Promega) mit einer Endkonzentration von 500  $\mu$ M eingesetzt. Bei der Transkription dieser RNA wird nun eine 7-methyl-Guanosin-Kappe an das 5'-Ende der RNA angehängt. Der Ansatz wird aufgrund der schlechteren Transkriptionsreaktion ca. 90 min bei 37 °C inkubiert und danach auf einem Agarosegel kontrolliert.

### **2.2.6.2 Polyadenylierung von *in vitro*-transkribierter RNA**

Um RNAs nach der Transkription Poly(A)-tails anhängen zu können, werden die RNAs zunächst über das RNeasy-Kit (Qiagen) aufgereinigt und in Wasser eluiert, da so die überschüssigen Bestandteile der Transkriptionsreaktion entfernt werden. Da nach diesem Aufreinigungsschritt oftmals eine RNA-Doppelbande auf dem Agarosegel zu sehen ist, wird die RNA nun für 5 min bei 70 °C erhitzt und dann so fort auf Eis abgekühlt, was den Effekt hat, dass die Doppelbande verschwindet. Es lässt sich vermuten, dass sich durch die Aufreinigung der RNA ein Teil der Nukleinsäure anders faltet und sich die ursprüngliche RNA-Faltung durch den Erhitzungsschritt und anschließender Abkühlung wieder herstellt.

Die Polyadenylierung erfolgt, wenn nicht anderes beschrieben, durch den Einsatz einer Poly(A)-Polymerase (rekombinant aus Hefe, USB), die unspezifisch an RNAs je nach Inkubationszeit verschieden lange Poly(A)-tails anhängt.

<u>Bestandteil</u>	<u>Endkonzentration</u>
Aufgereinigte RNA	x $\mu$ l
Poly(A)-Polymerase Puffer	1 x
rATP	1 mM
Poly(A)-Polymerase	1 U
ddH <sub>2</sub> O	

Die Inkubationszeit bei 37 °C hängt von der Länge der anzufügenden Poly(A)-tails und der Menge der eingesetzten RNA ab. Standardmäßig wurden Inkubationszeiten zwischen 2 und 60 min gewählt. Das Enzym wird anschließend durch einen Hitzeschritt bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Die Polyadenylierungsreaktion wird anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert, indem nicht-polyadenylierte und polyadenylierte RNA nebeneinander aufgetragen werden und der Längenunterschied deutlich sichtbar wird.

Die Längenbestimmung der angefügten PolyA-tails durch das Enzym wurde mit Hilfe des RNA-Markers „RiboRuler“ (Fermentas) und einer Auswertung der Banden mit CorelDrawX3 durchgeführt. Dazu wird das RNA-Gelbild mit Hilfe von CorelDraw auf dem PC-Bildschirm gerade ausgerichtet. Damit die Abmessung der RNA-Banden möglichst genau durchgeführt werden kann, wird die größtmögliche Vergrößerung des Bildes gewählt. Anhand der Bemaßungsfunktion in CorelDraw werden nun sowohl die Abstände der polyadenylierten RNA-Banden als auch die Abstände der Banden des RNA-Markers zu einer gesetzten Linie abgemessen. Mit Hilfe von Excel werden die angegebenen Größen der Markerbanden in Relation zu den bemessenen Abständen gesetzt und eine Eichkurve erstellt. Anhand der Formel der Eichkurve werden nun die Größen der polyadenylierten RNAs berechnet.

### 2.2.7 RNA Aufreinigung

#### 2.2.7.1 Aufreinigung aus Lösungen mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen

Die Extraktion von RNA aus Lösungen wie Transkriptionsansätzen erfolgt mit Hilfe des „RNeasy® Mini Kits“ der Firma Qiagen. Das Prinzip beruht auf einer selektiven Bindung der Nukleinsäure an eine Silica-basierte Matrix. Durch Hochsalzbuffer wird RNA, die größer als 200 Basen ist, an die Membran gebunden. Die Bindekapazität der Säule beläuft sich auf 100  $\mu$ g RNA.

Der aufzureinigende Ansatz wird zunächst bis zu einem Volumen von 100  $\mu$ l mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Dann werden 350  $\mu$ l des Guanidin-Thiocyanat-haltigen Puffers RLT zugesetzt und gut gemischt. Um optimale Bindebedingungen zu erreichen, werden 250  $\mu$ l 99 %iges Ethanol zugesetzt und der Ansatz sofort auf die Säule gegeben. Nach kurzer Zentrifugation von ca. 15 Sekunden bei 13.000 rpm wird der Durchfluss verworfen und die Säule zweimal mit je 500  $\mu$ l des Waschpuffers RPE gewaschen. Die Säule wird nun für 2 Minuten bei 13.000 rpm trocken zentrifugiert und in ein Eppendorftube gesetzt. Die Elution der gebundenen RNA

erfolgt durch Zugabe von 50 µl RNase freiem Wasser und erneuter Zentrifugation bei 13.000 rpm für eine Minute.

### **2.2.7.2 Aufreinigung durch LiCl-Fällung**

Alternativ zur Aufreinigung von RNA über eine Silica-Matrix kann RNA auch mit Hilfe von LiCl gefällt und somit von anderen Bestandteilen gereinigt werden. Es handelt sich hierbei um eine sehr schnelle, effektive und vor allem günstige Art der Aufreinigung.

Die Reaktion wird zunächst mit einer LiCl-Lösung versetzt, so dass die Endkonzentration 2 M beträgt. Das Reaktionsgefäß wird nun ca. 1,5 h auf Eis inkubiert und die gefällte RNA danach bei 13.000 rpm für 15 min bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wird zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und trocken gelassen. Je nach Größe des ursprünglichen Ansatzes wird die Nukleinsäure nun in der entsprechenden Menge RNase-freiem Wasser gelöst.

### **2.2.7.3 RNA-Aufreinigung aus Zelllinien**

Um eine in Zellen transfizierte RNA wieder zu reextrahieren, wird ebenfalls das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet.

Die Zellen sind zuvor in einer 24-well Platte transfiziert und inkubiert worden. Um die Zellen zu lysieren, werden 350 µl des Puffers RLT in die Vertiefung gegeben und die Platte leicht geschüttelt. Das Zelllysate wird in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 350 µl 70 %igem Ethanol versetzt, um optimale Bedingungen für die selektive Bindung der RNA an die Matrix zu erreichen. Dieses Gemisch wird nun auf die RNeasy-Säule gegeben und bei 13.000 rpm kurz für 15 sek. zentrifugiert. Die Säule wird nun mit 700 µl des Ethanolhaltigen Puffers W1 gewaschen. Nach diesem Schritt erfolgen zwei weitere Waschschrte mit je 500 µl des Puffers RPE. Die Säule wird nun bei 13.000 rpm für 1 min trocken zentrifugiert. Die Elution der RNA von der Matrix erfolgt mit 50 µl RNase freiem Wasser. Die RNAs werden bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

### **2.2.8 In vitro-Translation**

#### **2.2.8.1 Translation in Kaninchen-Lysat**

*In vitro*-Translationen werden im „Rabbit Reticulocyte Lysate“ (RRL) der Firma Promega durchgeführt. Die Retikulozyten, Vorläufer von Erythrozyten, werden aus anämischen Kaninchen gewonnen. Nach der Zellyse wird der Extrakt mit einer Mikrokokken-Nuklease behandelt, um endogene mRNAs abzubauen, so dass die im Lysat enthaltenen Komponenten des Translationsapparats (wie z.B. tRNA, Ribosomen, Aminosäuren und verschiedene Translationsfaktoren) im vollen Umfang für die Translation der gewünschten RNA eingesetzt werden.

Pro *in vitro* Translationsansatz von insgesamt 20 µl werden 8,8 µl RRL verwendet. Der Gesamtansatz wird durch Zugabe von KCL auf eine physiologische Endkonzentration von 135 mM KCL gebracht, da das Lysat nur eine Salzkonzentration von 113mM besitzt. Die

Menge der verwendeten Reporter-RNAs liegen je nach Konstrukt zwischen 200 und 600 ng pro Ansatz.

Der Ansatz wird nun für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert und danach auf Eis gestellt, um die Translationsreaktion zu stoppen.

### **2.2.8.2 Translation in Pierce Thermo Scientific Lysat**

Dieses *in vitro*-Translationssystem basiert auf einem Lysat aus humanen HeLa-Zellen. Laut Hersteller kann durch Zugabe von RNA und der im Kit enthaltenen Supplements in kürzester Zeit eine hohe Proteinausbeute erzielt werden.

Die Translationsreaktionen wurden entsprechend der Herstellerangaben zusammenpipettiert und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden bis zur Messung des Reporterproteins auf Eis gestellt.

### **2.2.9 Messung der Luciferase-Aktivität**

Bis zur Messung der Luciferase-Aktivität werden die Proben auf Eis gehalten. Die Schläuche des Luminometers werden mit Aqua bidest gewaschen. Für die Messung der Firefly Luciferase-Aktivität wird das Firefly Luciferase-Substrat im Verhältnis 1:5 mit dem Firefly Luciferase-Puffer verdünnt. Das darin vorhandene Luciferin wird durch die Firefly Luciferase umgesetzt, und freigesetztes Licht wird vom Luminometer gemessen. Wenn nur sehr niedrige Werte an Luciferase zu erwarten sind, zum Beispiel wenn nur wenige Zellen transfiziert werden, kann das Substrat auch unverdünnt eingesetzt werden.

Bei der Messung von Renilla Luciferase wird als umzusetzendes Substrat Coelenterazin verwendet. Die Substanz wird im Verhältnis 1:100 in Renilla Luciferase-Puffer verdünnt. Auch hierbei erfolgt eine Messung von Licht, welches bei der Umsetzung des Substrats durch die Renilla Luciferase abgegeben wird.

Wenn nicht anders angegeben, wurden bei *in vitro*-Translationen je 8 µl im Luminometerröhrchen gemessen, bei Zelllysaten nach Transfektionen wurden standardmäßig 20 µl gemessen. Eine Messung erfolgte für je 20 Sekunden, und für jede Probe wurde eine Doppelmessung durchgeführt.

## **2.3 Zellkultur**

### **2.3.1 Verwendete Zelllinien**

Für die Transfektion der Reporter RNAs werden verschiedene Zelllinien aus unterschiedlichen Geweben verwendet.

Als Hepatomzelllinie standen naive Huh7 zur Verfügung. Als Nicht-Leberzellen dienten HeLa-Zellen (Zevixkarzinomzellen) und HEK293-Zellen (menschliche embryonale Nierenzellen).



### 2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen für längere Zeit aufbewahren zu können und da sich Eigenschaften wie gute Transfizierbarkeit der Zelllinie im Laufe der Passagen ändern können, sollten sie nach wenigen Passagen erneut eingefroren werden.

Dazu werden ca. 80 % konfluente Zellen, die sich in einem guten Wachstumszustand befinden, mit Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellsuspension wird nun bei 550 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das entstandene Zellpellet in 1/5 Volumen kaltem Einfriermedium (DMEM/ 20 % FBS/ 20 % DMSO) resuspendiert. Die Zellen werden nun 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in vorgekühlte Cryo-Röhrchen aliquotiert. Damit die Zellen nur langsam einfrieren, werden die Röhrchen zunächst für einige Stunden in einem Isopropanol-Tank bei -20 °C eingefroren. Dieser Tank bewirkt eine langsame Abkühlung von ca. 1 °C/h. Über Nacht werden die Zellen im Isopropanol-Tank bei -70 °C eingefroren und am nächsten Tag in den Stickstoffbehälter überführt, wo die Zellen nun über Jahre haltbar sind.

Um die Zellen wieder aufzutauen, wird das Cryo-Röhrchen möglichst schnell in das auf 37°C warme Wasserbad gestellt bis der Inhalt etwas angetaut ist. Nun wird vorgewärmtes DMEM + 10 % FBS dazugegeben und der Inhalt in eine Zellkulturflasche mit ebenfalls warmem Medium überführt. Sobald sich die Zellen abgesetzt haben (ca. 4 – 6 Stunden) wird das Medium durch frisches ersetzt, um Reste des im Einfriermedium enthaltenen toxischen DMSO zu entfernen.

### 2.3.3 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle Zelllinien werden standardmäßig in 25 cm<sup>2</sup>-Flasks bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Medium wird DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit Glutamin und 4.500 mg/L L-Glukose (Invitrogen) verwendet. Dem Medium werden zusätzlich noch 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen) als Antibiotika und 10 % fötales Rinderserum zugesetzt.

Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 90 % aufweisen, werden die Zellen passagiert. Dazu wird das Medium abgenommen und die Zellen mit gleichem Volumen PBS gewaschen, um Reste des FBS zu entfernen, da dieses die Wirkung des Trypsins beeinträchtigt. Dann werden 800 µl Trypsin (Invitrogen) auf die Zellen gegeben und diese ca. 3 - 5 Minuten im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche lösen. Durch Zugabe von 5 ml DMEM mit FBS wird die Reaktion gestoppt. Ein Teil dieser sich im Medium befindenden Zellen wird nun in eine neue Zellkultur-Flasche pipettiert und mit 5 ml Medium im Brutschrank weiterkultiviert.

### 2.3.4 Aussäen von Zellen für Transfektionen

Für Transfektionen der Reporter RNAs werden die Zellen wie oben beschrieben von der Oberfläche des Flasks durch Trypsin-Behandlung abgelöst und dann in DMEM ohne die

Zugabe von Antibiotika aufgenommen. Soweit nicht anders beschreiben, wurden die Transfektionen in 24-well-Platten durchgeführt. In jede Vertiefung werden nun 500 µl der Zellsuspension pipettiert und über Nacht bis zur Transfektion bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### **2.3.5 Transfektion von Reporter-RNA in Zelllinien**

#### **2.3.5.1 Transfektion durch Lipofektion**

Die am Vortag ausgesäten Zellen weisen zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 70 - 90 % auf. Die Zellen werden zunächst mit PBS gewaschen, da Reste des Serums die Transfektion behindern können. Pro Vertiefung wird nun 500 µl Medium ohne die Zugabe von Antibiotika oder Serum gegeben.

Die Transfektion der RNA erfolgt nach dem Prinzip der Lipofektion. Hierfür wird das Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 (Invitrogen) verwendet. Die RNA wird hierbei nach Angaben des Herstellers mit Zellkulturmedium und Lipofectamine vorinkubiert, so dass sich in dieser Zeit Komplexe der Lipide mit der RNA bilden können. Die Ansätze werden dann auf die Zellen gegeben und, wenn nicht anders beschrieben, 3,5 h im Brutschrank inkubiert. Zur Messung der Zellviabilität wird vor der Zellyse mit je 150 µl passiver Lysis buffer (Promega) ein WST1-Test durchgeführt (s. Kap. 2.3.7). Die Messung der Reporteraktivität erfolgt wie in Kapitel 2.2.9 beschrieben.

#### **2.3.5.2 Transfektion durch Elektroporation**

Eine weitere Methode neben der Lipofektion, Nukleinsäuren in Zellen zu transfizieren, ist die Elektroporation. Dazu werden die Zellen am Tag der Transfektion mit Trypsin-Behandlung abgelöst und in 5 ml DMEM + 10 % FBS aufgenommen. Die Zellsuspension wird nun für 5 min bei 550 rpm zentrifugiert und das Pellet 1 x mit PBS gewaschen. Die Zellen werden nun in der Zählkammer gezählt und auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Je 400 µl dieser Zellsuspension werden nun mit der RNA gemischt und in die Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgt bei 160 V und 500 µF in einer Küvette mit 4 mm Durchmesser. Die Zellen werden nun in einer 24-Well Platte in je 1 ml DMEM mit 10 % FBS bis zur Bestimmung der Zellviabilität und anschließender Zellyse im Brutschrank inkubiert.

### **2.3.6 Synchronisation von Zellen in verschiedenen Zellzyklus-Phasen**

Um die Huh7- und HeLa-Zelllinien in die verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu bringen, werden die Zellen zunächst in einer großen 75 cm<sup>2</sup> Flasche kultiviert bis sie ca. 90 % Konfluenz erreicht haben. Die Zellen werden nach der Trypsin-Behandlung in 12 ml Medium aufgenommen. Je 2 ml dieser Zellsuspension werden in jeweils 2 große 152 cm<sup>2</sup> Schalen in

insgesamt 20 ml Medium gegeben und für weitere 3 Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### **2.3.6.1 Synchronisation in der G2-/M-Phase durch Nocodazol-Behandlung und Shake-Off**

Um die Zellen in der G2-/M-Phase zu synchronisieren werden sie zunächst mit Nocodazol behandelt, das direkt in das Medium gegeben wird. Huh7-Zellen werden mit je 400 ng/ml, HeLa-Zellen mit 300 ng/ml Nocodazol für 18 Stunden behandelt. Bei diesem Schritt findet eine Depolymerisierung der Mikrotubuli statt, so dass der Vorgang der Mitose in der Zelle nicht weiter stattfinden kann. Die Zellen haben sich nun abgerundet und werden nun von der Schale abgeklopft. Dazu wird das Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Es werden ca. 5 ml Medium in die Schale gegeben und dann die Zellen durch kräftiges Klopfen der Schale (Shake-Off) gegen die Tischplatte abgelöst. Die nun schwimmenden Zellen aus beiden Schalen werden dabei vereinigt.

Um die Zellen zu transfizieren, werden je ca. 100 µl der Suspension gleichmäßig in eine 24-Well-Platte ausgesät und nach 2 Stunden Inkubation im Brutschrank mit Lipofectamine transfiziert.

### **2.3.6.2 Synchronisation in der G1-/S-Phase durch Nocodazol, Shake-Off und Thymidin**

Die übrige Zellsuspension der in der M-Phase arretierten Zellen werden in eine neue große Schale gegeben und mit Medium auf 20 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Zellen werden nun für 8 Stunden im Brutschrank inkubiert. Um die Zellen in der G1-/S-Phase zu arretieren, werden sie für weitere 18 Stunden mit 2 mM Thymidin behandelt. Nach dieser Inkubation werden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und nach der Trypsin-Behandlung gleichmäßig in eine 24-Well-Platte ausgesät. Dabei wird die Zelldichte optisch unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach 2 Stunden Inkubation werden die Zellen nach dem Standardprotokoll transfiziert.

### **2.3.6.3 Synchronisation in der G0-Phase durch Wachstum bis zu 100 %iger Konfluenz**

Die G0-Phase des Zellzyklus wird erreicht durch Wachstum der Zelllinien bis zur 100 %igen Konfluenz. Dazu werden ca. 4 - 5 Tage vor der Transfektion der G0-Zellen die Huh7- oder HeLa-Zellen in eine kleine 25 cm<sup>2</sup> Flasche passagiert und in üblichem Zellkulturmedium inkubiert, bis die Zellen eine 100 %ige Konfluenz erreicht haben. Die Zellen werden danach noch für weitere 24 Stunden im Brutschrank stehen gelassen. Dann wird auch hier vorsichtig das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die G0-Zellen werden nun mit Trypsin behandelt und wie oben beschreiben in 24-Well-Platten ausgesät. Die Transfektion erfolgt auch hierbei nach weiteren 2 Stunden.

Als Kontrolle (unsynchronisierte Zellen) wird parallel eine Flasche mitkultiviert, die bei einer Konfluenz von ca. 70 – 80 % ebenfalls wie die synchronisierten Zellen transfiziert wird.

### 2.3.7 WST1-Test

Zur Normalisierung der gemessenen Firefly Luciferase-Werte wurde ein WST1-Test durchgeführt. Das WST1-Reagenz besteht aus einem rötlich gefärbten Tetrazoliumsalz, welches durch die zelluläre Succinatdehydrogenase der mitochondrialen Atmungskette in Formazan umgesetzt wird. Dieses wird durch eine Gelbfärbung des Zellkulturüberstands sichtbar, so dass durch das Ausmaß der Gelbfärbung auf die Zellviabilität im Well geschlossen werden kann.

Zur Durchführung des WST1-Tests wird das Zellkulturmedium 30 min vor dem Ende der Inkubationszeit vorsichtig abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. In jede Vertiefung wird nun 200 µl des 1:50 in farblosem DMEM verdünnten WST1-Reagenz pipettiert und die Platte für weitere 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit erfolgt die Gelbfärbung des Überstands. Der Grad der Gelbfärbung wird nun im ELISA Reader bestimmt. Dazu werden je 100 µl des Überstand abgenommen und in eine 96-well-Platte pipettiert. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm.

### 2.4 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	kloniert/bezogen von
<b>Actin d3'-UTR</b>	T7, Actin 5'-UTR, Fluc, Plasmid-Sequenz	C. Bung
<b>Actin HCV 3'-UTR</b>	T7, Actin 5'-UTR, Fluc, HCV 3'-UTR	C. Bung
<b>Actin-SV40</b>	Actin 5'-UTR, Fluc, SV40-Sequenz	I. Shatsky
<b>EMCV-3'-UTR</b>	EMCV IRES, Fluc, HCV 3'-UTR	I. Shatsky
<b>EMCV-SV40</b>	EMCV IRES, Fluc, SV40-Sequenz	I. Shatsky
<b>HCV-3'UTR</b>	HCV IRES, Fluc, HCV 3'-UTR	I. Shatsky
<b>HCV-CLX CMV</b>	T7, HCV 5'-UTR, Fluc, HCV 3'-UTR	Y. Song
<b>HCVd3'-UTR</b>	T7, HCV 5'-UTR, Fluc, Plasmid-Sequenz	C. Bung
<b>HCV-SV40</b>	HCV IRES, Fluc, SV40-Sequenz	I. Shatsky
<b>pHCMVΔ3'UC</b>	T7, HCV 5'-UTR, Fluc, HCV 3'-UTRΔ3'UC	Y. Song
<b>pHCMVΔVR</b>	T7, HCV 5'-UTR, Fluc, HCV 3'-UTRΔVR	Y. Song
<b>pHCMVΔVUC</b>	T7, HCV 5'-UTR, Fluc, HCV 3'-UTRΔVUC	Y. Song
<b>phRLnull</b>	T7, Renilla Luciferase	Promega
<b>pPTVΔUC</b>	T7, PTV IRES, Fluc, HCV 3'-UTRΔ3'UC	C. Bung
<b>pPTVΔVR</b>	T7, PTV IRES, Fluc, HCV 3'-UTRΔVR	C. Bung
<b>pPTVΔVUC</b>	T7, PTV IRES, Fluc, HCV 3'-UTRΔVUC	C. Bung
<b>pPTV-HCV</b>	T7, PTV IRES, Fluc, HCV 3'-UTR	C. Bung
<b>pPTV-Luc</b>	PTV IRES, Fluc	I. Shatsky

<b>PTV-3'-UTR</b>	PTV IRES, Fluc, HCV 3'-UTR	I. Shatsky
<b>PTV d3'-UTR</b>	T7, PTV IRES, Fluc, Plasmid-Sequenz	C. Bung
<b>PTV-SV40</b>	PTV IRES, Fluc, SV40-Sequenz	I. Shatsky

## 2.5 Verwendete Oligonukleotide

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' &gt; 3')</b>
<b>3-UTR-rev</b>	ACATGATCTGCAGAGAGGCCAG
<b>3XA rev</b>	GATGGAGCCACCATTAAAGAAGG
<b>act Luc rev</b>	CTGCCAACCGAACGGACATTTTCG
<b>Actin for</b>	GCGTTACTCGAGACCGCCGAGACCGCGTCCG
<b>A-upstrT7-for</b>	GGTAGGCGTGTACGGTGGGAGG
<b>d3'UTR +200nt rev</b>	GGCACGACAGGTTTCCCGACT GG
<b>D3SL1+2</b>	CTAGGGCTAAGATGGAGCCACC
<b>d3'UTR+200nt rev + 5PA</b>	(T) <sub>5</sub> GGCACGACAGGTTTCCCGACTGG
<b>d3'UTR+200nt rev + 10PA</b>	(T) <sub>10</sub> GGCACGACAGGTTTCCCGACTGG
<b>d3'UTR+200nt rev + 20PA</b>	(T) <sub>20</sub> GGCACGACAGGTTTCCCGACTGG
<b>d3'UTR+200nt rev + 30PA</b>	(T) <sub>30</sub> GGCACGACAGGTTTCCCGACTGG
<b>d3'UTR+200nt rev + 40PA</b>	(T) <sub>40</sub> GGCACGACAGGTTTCCCGACTGG
<b>d3'UTR+200nt rev + 50PA</b>	(T) <sub>50</sub> GGCACGACAGGTTTCCCGACTGG
<b>Fluc Ende rev</b>	CTCTTCGAACTCACAAATTTGGACTTTCCGCCCTTCTTGG
<b>Fluc Mitte for</b>	GATTTGAAGAAGAGCTGTTTTTACGATCCC
<b>GL3r rev</b>	TTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGG
<b>HCMV-4986 for</b>	CCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCC
<b>HCV 3404-3426</b>	GCACACAGCCCAGCTTGGAGCG
<b>HCV reverse</b>	ATTCACGTTTATTATAAATGTGCTTCGCGG
<b>HCV-PTV-3X-rev</b>	ACATGATCTGCAGAGAGGCCAGTATCAG
<b>HCV-PTV-for</b>	CTTTCCAAAATGTGCTAACAACCTCCGCC
<b>HVC forward</b>	GAAACTCACCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGG
<b>pBS172 for</b>	CGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCG
<b>pBS304 for</b>	TCTATCAGGGCGATGGCCCAC
<b>pBSII 698</b>	AATTGTGAGTTTGAAGAGCACTAGAGGATCCCC
<b>polyA-rev</b>	AAC(T) <sub>50</sub> AACCTTGTTTATTGCAGCTTATAATGG
<b>PTV forward</b>	CCGTAGAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTCCG
<b>PTV reverse</b>	GCGTCTTCCATGGTGAGTTTCAACTGACTATACAAAGTACAGAC
<b>PTV-HCV+RD15 rev</b>	ACATAACAAATCTAATCACAAATTTGGACTTTCCGCCCTTCTTGG
<b>RV3</b>	CTAGCAAAAATAGGCTGTCCC

Alle Oligonukleotide wurden von Biomers.net bezogen.

## 2.6 Verwendete Restriktionsenzyme

Name	Erkennungssequenz
<b>AfIII</b>	5' C <sup>↓</sup> TTAAG 3'
<b>AhdI</b>	5' GACNNN <sup>↓</sup> NNGTC 3'
<b>BamHI</b>	5' G <sup>↓</sup> GATCC 3'
<b>BsiWI</b>	5' C <sup>↓</sup> GTACG 3'
<b>BstXI</b>	5' CCANNNNN <sup>↓</sup> NTGG 3'
<b>EcoNI</b>	5' CCTNN <sup>↓</sup> NNNAGG 3'
<b>EcoRV</b>	5' GAT <sup>↓</sup> ATC 3'
<b>HindIII</b>	5' A <sup>↓</sup> AGCTT 3'
<b>NcoI</b>	5' C <sup>↓</sup> CATGG 3'
<b>NdeI</b>	5' CA <sup>↓</sup> TATG 3'
<b>PciI</b>	5' A <sup>↓</sup> CATGT 3'
<b>SfoI</b>	5' GGC <sup>↓</sup> GCC 3'
<b>SgrAI</b>	5' CR <sup>↓</sup> CCGGYG 3'
<b>XbaI</b>	5' T <sup>↓</sup> CTAGA 3'
<b>XhoI</b>	5' C <sup>↓</sup> TCGAG 3'

N = A oder T oder C oder G

R = A oder G

Y = C oder T

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden bei New England Biolabs bestellt.

## 2.7 Lösungen und Puffer

DNA-Probenpuffer („BX“)	75 % (v/v)	Glycerin
	2 mg/ml	Bromphenolblau
	4 mg/ml	Xylencyanolblau
	50 mM	EDTA
E-Puffer (=TAE-Puffer), pH=8,3	40 mM	Tris-OH, pH 8
	40 mM	Natriumacetat
	2 mM	EDTA
PBS (Phosphate buffered saline)	137 mM	Natriumchlorid
	2,7 mM	Kaliumchlorid
	4,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Renilla Luciferase Puffer, pH=7,4	0,1 M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,1 M	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,5 M	NaCl
	1 mM	EDTA
Firefly Luciferase Puffer	25 mM	Glycylglycin, pH 7,8
	15 mM	MgSO <sub>4</sub>
	33,3 mM	DTT
	0,1 mM	EDTA
	1 mM	rATP
Firefly Luciferase Substrat	20 mM	Tricin
	1,07 mM	(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
	2,67 mM	MgSO <sub>4</sub>
	0,1 mM	EDTA
	33,3 mM	DTT
	0,27 mM	Coenzym A
	0,47 mM	Luziferin
	0,53 mM	rATP

### 2.8 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Agarose, high-pure	Roth, Karlsruhe
Capping-Nukleotid (m7GpppG)	Promega, Mannheim
Chloroform	Sigma, Taufkirchen
Coelenterazin	Roche, Mannheim
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM (Farblos, ohne Phenolrot)	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
DNA Marker „Hyperladder I“	Bioline, Luckenwalde
dNTP-Set (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Roth, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Biozym, Oldendorf
Ethanol für die Molekularbiologie	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FBS (fötales Rinderserum)	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Nocodazol	Biotrend
Passive Lysis Buffer (5 x)	Promega, Mannheim
Penicillin/Streptomycinlösung (100 x) (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe

Rabbit Reticolucyte Lysate (RRL)	Promega, Mannheim
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürmbrecht
RNA-Marker „RiboRuler“	Fermentas, St. Leon-Rot
RNA-Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
rNTP-Set (rATP, rUTP, rGTP, rCTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Thymidin	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA (10 x) (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA)	Invitrogen, Karlsruhe
WST1-Reagenz	Roche, Mannheim

### 2.9 Verzeichnis der Verbrauchsmaterialien

Blaukappen-Röhrchen (15 ml + 50 ml)	Greiner Bio-One
Elektroporationsküvetten	Biorad, München
ELISA Platten, 96-well	Greiner Bio-One
Luminometerröhrchen	Sarstedt, Nürmbrecht
Nitrilhandschuhe	Ansell
Pipetten für die Zellkultur (5 ml, 10 ml)	BD Falcon
Pipettenspitzen (lose)	Sarstedt, Nürmbrecht
Pipettenspitzen (vorgesteckt)	Sarstedt, Nürmbrecht
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürmbrecht
Sterilfilter	Millipore Corporation, USA
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One
Zellkulturplatten (6-well, 12-well, 24-well)	Sarstedt, Nürmbrecht
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nürmbrecht

### 2.10 Verzeichnis der verwendeten Geräte

Agarose-Gelkammern	von Keutz, Reiskirchen
CO <sub>2</sub> - Brutschrank Serie CB	Binder, Tuttlingen
Elektroporator, „Easyject Prima“	Equibio, England
Elektroporator, „GenePulser Xcell“	Biorad, München
ELISA-Reader ELx800	BioTek, Bad Friedrichshall
Geldokumentationssystem, „GelDoc XR“	Biorad, München
Heizblock „AccuBlock™“	Labnet International
Isopropanol-Tank	Quallilab, Frankreich
Kühlzentrifuge „Multifuge 3L-R“	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge	Beckmann Instruments, USA
Luminometer, „Lumat LB9501“	Berthold, Bad Wildbach
Mikroskop Leica DM 12	Leica Microsystems
PCR Thermocycler „TProfessional“	Biometra, Göttingen



Sterilbank „Hera Safe“

Tisch-Kühlzentrifuge Biofuge „Fresco“

Tischzentrifuge Eppendorf 5415C

Vortex

Wasserbad

Heraeus, Hanau

Heraeus, Hanau

Eppendorf, Hamburg

Bender und Hobein, Bruchsal

Julabo, Seelbach

### 2.11 Verwendete Kits

GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit

NucleoBond AX 100

Pierce® Human *in vitro* Protein Expression Kit  
for mRNA Templates

RNeasy Mini Kit

Wizard® Plus SV Minipreps

GE Healthcare, München

Macherey-Nagel, Düren

Thermo Fisher Scientific, USA

Qiagen, Hilden

Promega, Mannheim

### 2.12 Andere Enzyme

Alkalische Phosphatase, shrimp

GoTaq Flexi DNA-Polymerase

PolyA-Polymerase

Proteinase K

SP6 RNA-Polymerase

T3 RNA-Polymerase

T4 DNA-Ligase

T7 RNA-Polymerase

Combizyme DNA Polymerase

Roche, Mannheim

Promega, Mannheim

USB Corporation, Staufen

Merck, Darmstadt

Fermentas, St. Leon-Rot

Fermentas, St. Leon-Rot

New England Biolabs

Fermentas, St. Leon-Rot

Invitex, Berlin

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Der Einfluss der Hepatitis C Virus 3'-UTR auf die Translation durch die IRES des Hepatitis C Virus und Porcinen Teschovirus

Die Rolle der Hepatitis C Virus 3'-UTR bei der Translation der viralen RNA wurde in der Literatur bisher widersprüchlich diskutiert. Einige Studien zeigten keinen Effekt dieser Region auf die IRES-abhängige Translation (Fang und Moyer, 2000; Imbert et al., 2003). Andere Wissenschaftler konnten eine inhibitorische Regulation der Translation durch die HCV 3'-UTR nachweisen (Murakami et al., 2001). Allerdings wurde auch schon ein stimulatorischer Effekt der 3'-UTR auf die Translation von HCV gezeigt (Song et al., 2006; Ito und Lai, 1998; McCaffrey et al., 2002), wobei sich einige Studien nur auf eine mögliche Rolle der 3'-X-Region bezogen (Michel et al., 2001). Eine weitere Möglichkeit, die zu den unterschiedlichen Resultaten bezüglich der Rolle der 3'-UTR führen könnte, ist die An- oder Abwesenheit von authentischen 3'-UTR-Enden. Es konnte gezeigt werden, dass zusätzlich an die 3'-UTR angehängte Nukleotide die Stimulation inhibieren können (Song et al., 2006).

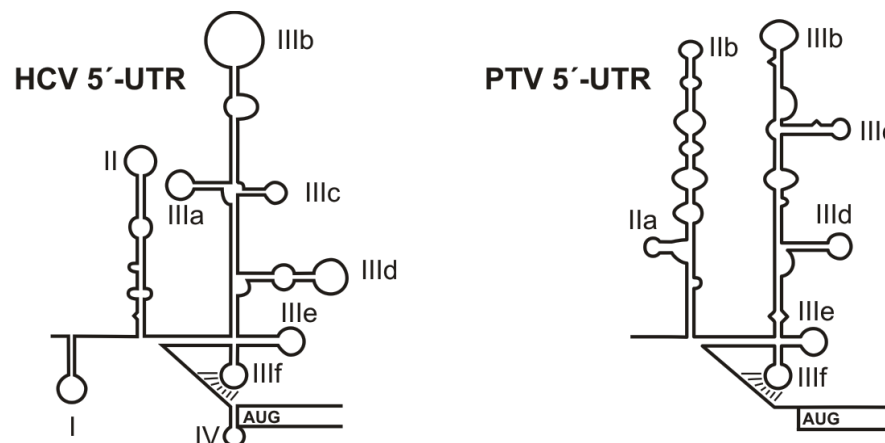
Das Porcine Teschovirus (PTV) wird aufgrund seiner Genomstruktur zwar den Picornaviren zugeordnet, besitzt jedoch eine neue Klasse von IRES-Element innerhalb dieser Familie (Kaku et al., 2001; Kaku et al., 2002). Die PTV IRES ist mit einer Länge von nur 280 Nukleotiden sehr viel kürzer als die klassischen Picornavirus IRES-Elemente mit ungefähr 450 Nukleotiden. Außerdem unterscheidet sie sich von diesen unter anderem durch das Fehlen von typischen Picornavirus IRES-Bereichen wie dem Polypyrimidin-Trakt stromaufwärts des Initiations-Codons (Pisarev et al., 2004). In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass die PTV IRES große Ähnlichkeiten mit der HCV IRES bezüglich der Verwendung von Initiationsfaktoren aufweist, so dass auch diese nur unter alleiniger Verwendung von eIF2 im ternären Komplex die Translation initiieren kann und eIF3 diese verstärkt (vgl. Pestova et al., 1998). Ein Sequenzvergleich zwischen HCV und PTV IRES zeigte eine hohe Identität von 55 %, wobei einige Regionen besonders ähnliche konservierte Bereiche besitzen (Pisarev et al., 2004). Dies ist zum Beispiel in den Bereichen der HCV IRES Domäne III und dem Pseudoknoten der Fall, Regionen, für die eine Interaktion der IRES mit der ribosomalen 40S-Untereinheit und eIF3 nachgewiesen werden konnte (Kieft et al., 2001; Lukavsky et al., 2000, Easton et al., 2009). Die Ähnlichkeiten zwischen HCV und PTV IRES beziehen sich also zum einen auf sequenzielle und strukturelle Gemeinsamkeiten und zum anderen auf funktionelle Ähnlichkeiten bezüglich der Translationsinitiation und des Bedarfs an Initiationsfaktoren (Pisarev et al., 2004, Chard et al., 2006a, 2006b). Computer-Analysen von verschiedenen IRES Elementen innerhalb der Picornaviren zeigen allerdings neben PTV noch weitere Viren, die eine solche HCV-ähnliche IRES besitzen. Dazu zählen zum Beispiel das Seneca Valley Virus (SVV) oder das Simian Picornavirus (SPV), welche in der Struktur des Pseudoknotens und in den Domänen III<sub>d</sub> und III<sub>e</sub> sehr hohe Ähnlichkeiten zu

HCV aufweisen (Hellen und de Breyne, 2007). Hier wird auch die Vermutung eines rekombinanten Austausches von IRES-Elementen zwischen der Familie der Picornaviren und den Flaviviren diskutiert. Ein schematischer Vergleich der beiden IRES-Elemente von HCV und PTV ist in Abbildung 3.1 gezeigt.

#### 3.1.1 Die HCV 3'-UTR stimuliert die Translation von HCV und PTV IRES-abhängiger Translation *in vivo* und *in vitro*

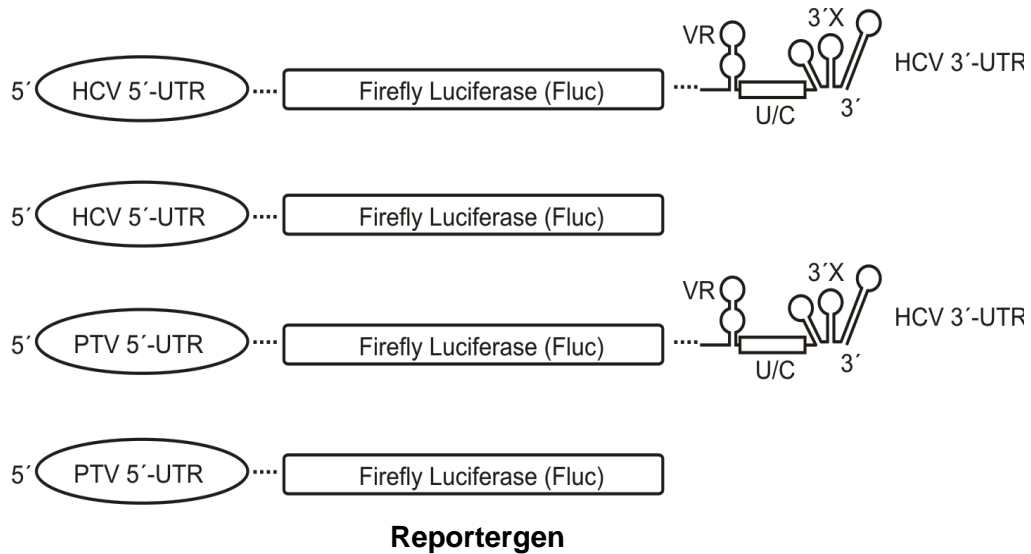
Es soll nun untersucht werden, ob die Stimulation der HCV IRES-abhängigen Translation durch die 3'-UTR spezifisch für die HCV IRES ist oder ob es sich hierbei eher um einen generellen Mechanismus der Translationsstimulation handelt. Durch die zusätzliche Verwendung der PTV IRES soll außerdem geklärt werden, ob sich diese IRES ebenso wie die von HCV durch die HCV 3'-UTR in ähnlicher Form stimulieren lässt.

Dazu wurden zunächst verschiedene Reporter-RNAs verwendet, die entweder die HCV 5'-UTR oder die 5'-UTR des Porcinen Teschovirus als Element der Translationsinitiation besitzen.



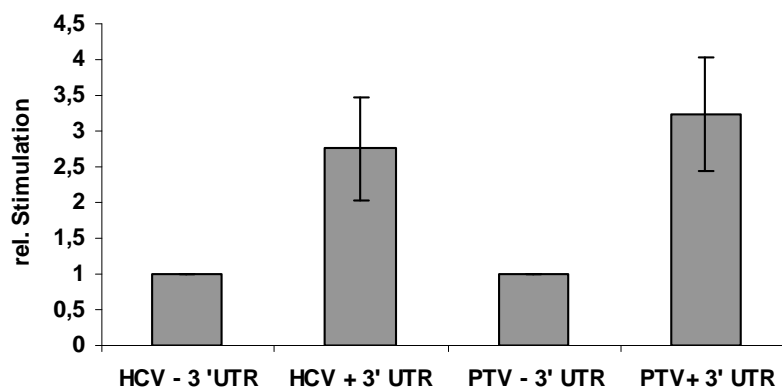
**Abbildung 3.1:** Die Sekundärstrukturen der HCV- und PTV 5'-UTR (Abbildung aus Bung, Bochkaeva et al., 2010).

Um einen möglichen Effekt der HCV 3'-UTR auf die Effizienz der Translation von HCV bestimmen zu können, werden jeweils Reporter-RNAs, die diese 3'-UTR besitzen, verglichen mit RNAs, die direkt nach dem Reporter, der Firefly Luciferase enden (siehe Abbildung 3.2). Um die RNAs zu generieren, wurden deshalb zunächst von den entsprechenden Plasmiden, zwei unterschiedliche PCRs angesetzt, damit die DNA-Templates exakte Enden besitzen. Nach der *in vitro*-Transkription wurden die Mengen der RNAs im Ansatz auf einem Agarosegel bestimmt, da zum direkten Vergleich der RNAs mit und ohne HCV 3'-UTR gleiche Mengen (ca. 200 ng) in die Experimente eingesetzt werden müssen.



**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der verwendeten Reporter-RNAs.** Die 5'-UTR der RNA enthält entweder die HCV- oder die PTV 5'-UTR. Alle Konstrukte enthalten als Reporter das Gen der Firefly Luciferase. Am 3'-Ende befindet sich entweder die HCV 3'-UTR oder die RNA endet direkt nach dem Reportergergen. Abbildung modifiziert nach Bung, Bochkava et al., 2010.

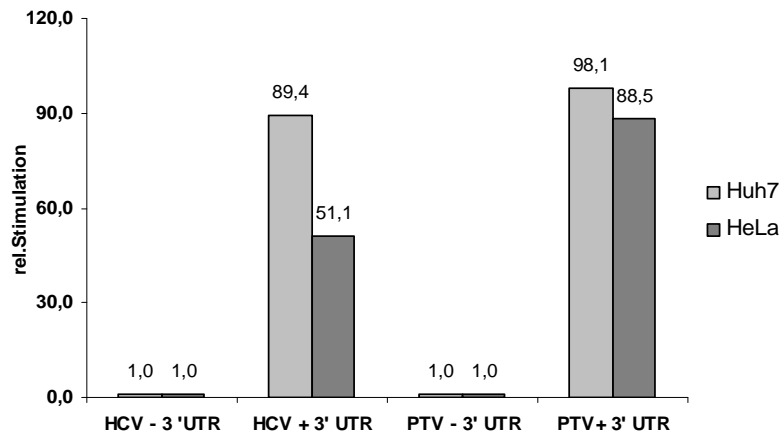
Die verschiedenen *in vitro*-transkribierten Reporter-RNAs wurden nach dem Mengenausgleich mit Hilfe eines Agarose-Gels zunächst in die *in vitro*-Translation eingesetzt. Diese wurde in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (engl. „Rabbit Reticulocyte Lysate“, RRL) durchgeführt und danach die Aktivität des exprimierten Reporterproteins gemessen.



**Abbildung 3.3: *In vitro*-Translation der Reporter-RNAs in RRL.** Vergleich der Reporterexpression (Firefly Luciferase) der RNA-Konstrukte mit HCV- oder PTV 5'-UTR ohne bzw. mit HCV 3'-UTR. Die Werte der RNAs ohne 3'-UTR wurden gleich 1 gesetzt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Der Effekt der HCV 3'-UTR auf die IRES-abhängige Translation wird nun durch den direkten Vergleich der beiden Reporter-RNAs messbar. Im RRL-System zeigt die HCV 3'-UTR eine Stimulation der Aktivität der HCV IRES von 2,8-fach und bei der PTV IRES eine ähnliche Stimulation von 3,2-fach (siehe Abbildung 3.3).

Um zu testen, ob dieser Effekt auch *in vivo* festzustellen ist, wurden die Reporter-RNAs in Zellen transfiziert. Dazu wurden eine Hepatomzelllinie (Huh7-Zellen) und eine Nicht-Hepatomzelllinie (HeLa-Zellen) verwendet, um zusätzlich zu testen, ob eine mögliche Stimulation durch die HCV 3'-UTR zelltypabhängig ist. Die Transfektion in beide Zelllinien erfolgte durch Lipofektion, also die Bildung von RNA-Lipidkomplexen und Aufnahme in die Zelle durch lipid-vermittelte Endozytose. Die Messung der Reporteraktivität erfolgt nach 4 Stunden Inkubation und anschließender Zellyse.



**Abbildung 3.4: Effekt der HCV 3'-UTR auf die Translation in Huh7- und HeLa-Zellen.** Reporter-RNAs mit HCV- oder PTV 5'-UTR jeweils mit oder ohne HCV 3'-UTR wurden in Zellen transfiziert. Die Aktivität des Luciferase-Reporters wurde nach der Zellyse 4 Stunden nach der Transfektion gemessen. Die Werte der RNAs ohne HCV 3'-UTR wurden gleich 1 gesetzt.

In beiden Zelllinien, sowohl in der Hepatomzelllinie Huh7 als auch in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa, konnte ein stimulatorischer Effekt der HCV 3'-UTR gefunden werden. In Huh7-Zellen zeigt sie für die HCV IRES eine fast 90-fache Stimulation; ähnliche Werte wurden auch für die PTV IRES gefunden. In HeLa-Zellen konnte eine Stimulation von ungefähr 50-fach für die HCV- und 90-fach für die PTV IRES gezeigt werden.

Verglichen mit den Stimulationen, die bei der Translation im Retikulozytenlysat gefunden wurden, zeigt sich in beiden Zelltypen *in vivo* eine sehr viel höhere Stimulation, die sich im Vergleich zur *in vitro*-Translation zum Teil um den Faktor 30 unterscheidet.

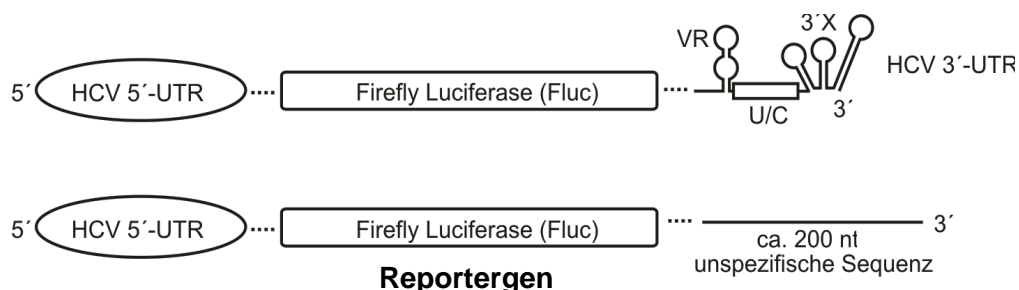
#### Diskussion

Bei dem hier verwendeten Reporterkonstrukt mit HCV 5'-UTR und HCV 3'-UTR handelt es sich das gleiche Plasmid, das bereits in der Studie von Song et al., 2006 eingesetzt wurde. Auch die Herstellung des Templates mit exaktem Ende stromabwärts des Luciferase-Gens beziehungsweise hinter der 3'-UTR durch die PCR erfolgte hier nach dem gleichen Protokoll. Ein experimenteller Unterschied ist hier nur bei der Verwendung der Primer in der PCR für die Herstellung des Templates zu finden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer waren etwas länger und besitzen somit eine höhere Schmelztemperatur, was jedoch auf die Eigenschaften des hergestellten PCR-Fragments keinen Einfluss haben sollte. Nach

Messung der Reporter-Aktivitäten der unterschiedlichen RNAs unterschieden sich die Ergebnisse hier jedoch maßgeblich von denen aus der vorherigen Studie. Zwar konnte hier die stimulatorische Wirkung der HCV 3'-UTR auf die IRES-abhängige Translation bestätigt werden, jedoch unterscheiden sich die Werte der gefundenen Stimulationen wesentlich. In der Studie von Song et al. wird eine zelltypabhängige Translationsstimulation auf die HCV IRES durch ihre 3'-UTR beschrieben, die in Huh7-Zellen 25-fach, in HeLa-Zellen 1,3-fach, in HepG2-Zellen 17-fach und in BHK-21-Zellen 4-fach beträgt. Die Autoren schließen aus den Daten auf eine leberspezifische Stimulation der Translation durch die HCV 3'-UTR. In deren Studie konnte auch ein Effekt der HCV 3'-UTR auf die HCV IRES *in vitro* im RRL nicht nachgewiesen werden, wohingegen hier in dieser Arbeit eine im Vergleich zu den *in vivo*-Experimenten zwar geringe, aber signifikante Stimulation der Translation gefunden wurde. Woraus ein solcher gravierender Unterschied zwischen den beiden Studien resultiert, sowohl bei den *in vitro*- als auch den *in vivo*-Experimenten, konnte letztendlich nicht geklärt werden. Auch die Verwendung der gleichen, kürzeren Primer wie in der Studie von Song et al. brachte hier keine Angleichung der Messergebnisse.

#### 3.1.2 Eine Sequenzverlängerung nach dem Reporter gen wird für eine korrekte Translation benötigt

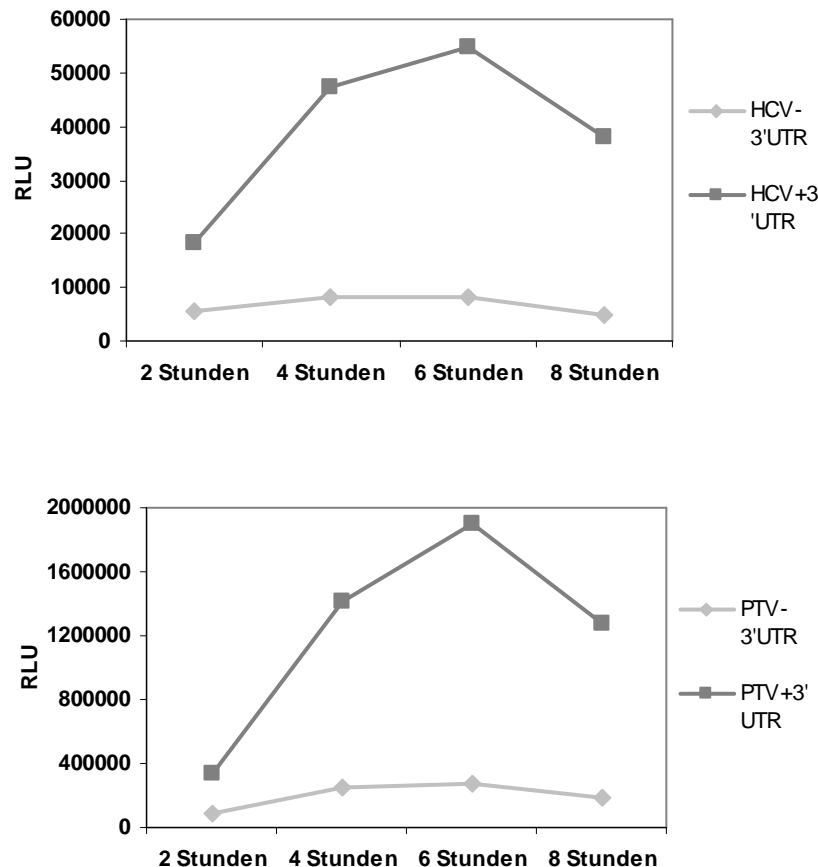
Um zu testen, ob die hier festgestellten recht hohen Stimulationswerte durch die 3'-UTR dadurch zustande kommen, dass in dem Reporter ohne 3'-UTR nach dem Luciferase-ORF gar keine Sequenz mehr folgt, wurde ein Plasmid kloniert, in dem die Sequenz der HCV 3'-UTR durch eine willkürlich ausgewählte Plasmid-Sequenz ohne bekannte Funktion in der Translation ersetzt wurde. Die PCR für die Synthese des neuen DNA-Templates wurde nun mit einem Primer durchgeführt, der im Plasmid ungefähr 200 Nukleotide hinter dem Ende der Firefly Luciferase-Sequenz bindet. Dies entspricht in etwa der Länge der HCV 3'-UTR. Eine Darstellung der HCV RNAs mit Verlängerung ist in Abbildung 3.5 gezeigt. Neben der HCV 5'-UTR wurde auch die PTV 5'-UTR in der gleichen Weise eingesetzt (Konstrukte hier nicht gezeigt).



**Abbildung 3.5: Die HCV-Reporter-RNAs mit 3'-UTR beziehungsweise 200 Nukleotiden Sequenzanhang.** Am 5'-Ende der RNAs befindet sich die HCV 5'-UTR, am 3'-Ende entweder die HCV 3'-UTR oder ungefähr 200 Nukleotide unspezifische Plasmid-Sequenz. Alle Konstrukte tragen die Firefly Luciferase-Sequenz als Reporter gen. Abbildung modifiziert nach Bung, Bochkava et al., 2010.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Die Reporter-RNAs mit HCV- und PTV 5'-UTR und HCV 3'-UTR beziehungsweise der Verlängerung mit unspezifischer Plasmid-Sequenz wurden nun in Zellen transfiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden die Huh7- und HeLa-Zellen lysiert und die Firefly Luciferase Aktivität gemessen, um den optimalen Zeitpunkt für die Messungen zu ermitteln. Die Messung der Reporter-Gen-Aktivität erfolgte nach 2, 4, 6 und 8 Stunden.



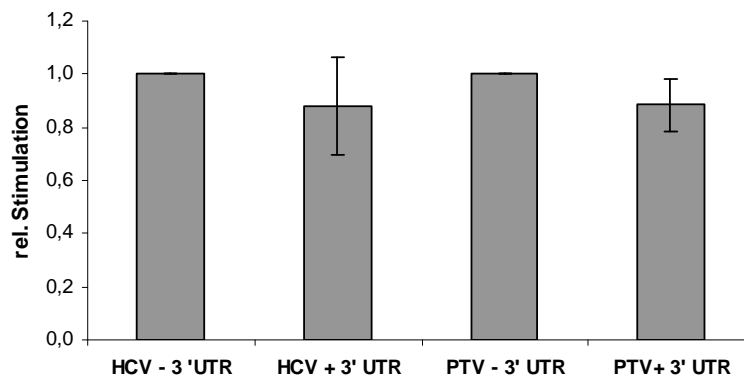
**Abbildung 3.6: Kinetik der HCV- und PTV-Reporter RNAs mit und ohne HCV 3'-UTR in Huh7-Zellen.** Die Reporter-RNAs mit HCV- und PTV 5'-UTR mit und ohne HCV 3'-UTR wurden in Zellen transfiziert, die Zellen nach 2, 4, 6 und 8 Stunden lysiert und die Firefly Luciferase Aktivität in den Extrakten gemessen. Dargestellt sind hier die Kinetiken in Huh7-Zellen. RLU = relative light units

Die Messungen, die im Abstand von je 2 Stunden durchgeführt wurden, zeigen zunächst, dass in Huh7-Zellen die Reporterexpression bis zu 6 Stunden nach der Transfektion ansteigt und danach wieder absinkt (siehe Abbildung 3.6). Dieser Effekt tritt sowohl bei der Translation durch die HCV- als auch durch die PTV-IRES auf und unabhängig davon, ob die HCV 3'-UTR anwesend ist oder nicht. Die Transfektion der gleichen RNAs in HeLa-Zellen zeigte einen Anstieg der Luciferase-Aktivität bis zum Messpunkt von 4 Stunden nach der Transfektion, zu späteren Zeitpunkten fällt die Aktivität wieder ab (Daten hier nicht gezeigt). Der optimale Zeitpunkt für die Zelllyse scheint also zwischen 4 und 6 Stunden nach der Transfektion zu liegen. Für die nachfolgenden Experimente wurde der Zeitpunkt von 4 Stunden nach Transfektion für die Zelllyse gewählt.

Durch den Anhang einer unspezifischen RNA-Sequenz an den ORF des Reportergens hat sich also die Reporter-Expression erhöht, so dass im Vergleich zu den Konstrukten mit der HCV 3'-UTR, die unverändert geblieben sind, die relative Stimulation durch die HCV 3'-UTR auf die IRES abgenommen hat.

Außerdem zeigt hier die Transfektion der verlängerten Reporterkonstrukte mit 200 Nukleotiden unspezifischem Sequenzanhang an der Firefly Luciferase im Vergleich zu den Konstrukten mit HCV 3'-UTR eine sehr viel niedrigere Stimulation durch die 3'-UTR (vergleiche Abbildung 3.4). Die Stimulationswerte liegen hierbei in Huh7-Zellen bei ungefähr 5 - 6-fach, in HeLa-Zellen bei ca. 3 – 4-fach.

Nach dieser Verlängerung der Reporterkonstrukte ohne HCV 3'-UTR wurden die RNAs mit HCV und PTV IRES jeweils entweder mit 200 Nukleotiden unspezifischer Sequenz am 3'-Ende oder mit der HCV 3'-UTR erneut in der *in vitro*-Translation in RRL getestet. Auch hier wurden gleiche Mengen der jeweiligen RNA eingesetzt, um die Expression der Konstrukte miteinander vergleichen zu können.

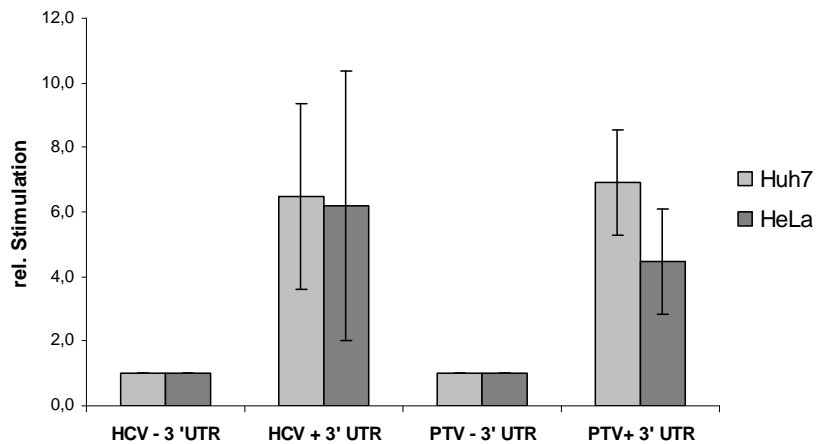


**Abbildung 3.7: *In vitro*-Translation der Reporter-RNAs mit Verlängerung der Konstrukte ohne HCV 3'-UTR in RRL.** Vergleich der Reporterexpression (Firefly Luciferase) der RNA-Konstrukte mit HCV- oder PTV 5'-UTR ohne bzw. mit HCV 3'-UTR. Die RNAs ohne HCV 3'-UTR besitzen einen 200 Nukleotide Anhang. Die Werte der RNAs ohne 3'-UTR wurden gleich 1 gesetzt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Nach der Veränderung der RNA-Konstrukte ohne HCV 3'-UTR zeigt die Translation im Kaninchenlysats keine Stimulation durch die 3'-UTR mehr (siehe Abbildung 3.7). Vor der Verlängerung konnte in diesem System eine Translationsstimulation sowohl auf die HCV-IRES als auch auf die PTV-IRES von ungefähr 3-fach nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3.3). Vermutlich spielt hier eine verbesserte Termination bei den Reporter-RNAs mit Verlängerung nach dem Firefly-Luciferase Gen eine Rolle, so dass die Luciferase-Messwerte dieser RNAs höher wurden. Die bei den RNAs ohne Verlängerung nach dem ORF im RRL gefundenen Stimulationen durch die HCV 3'-UTR scheinen keine Stimulationen der IRES-abhängigen Translation zu sein, sondern eine Repression der Translation der RNAs ohne 3'-UTR.



Wie in den Kinetiken schon gezeigt werden konnte, ist bei der Transfektion der veränderten Reporter-RNAs in Zellen eine höhere Genexpression sowohl bei den HCV- als auch bei den PTV-Konstrukten im Vergleich zu den RNAs ohne 200 Nukleotide Verlängerung am 3'-Ende der RNA zu sehen (siehe Abbildung 3.6). Um dies noch mal zu bestätigen, wurden die Transfektionen in voneinander unabhängigen Experimenten wiederholt. Dazu wurde für jeden Versuch eine neue Transkription aller RNAs mit anschließendem Mengenvergleich auf einem Agarosegel durchgeführt. Die Zellyse erfolgte 4 Stunden nach der Transfektion.

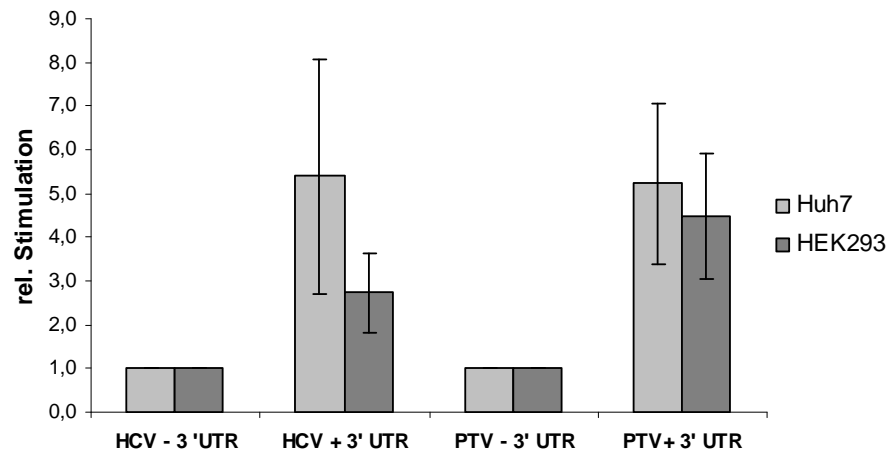


**Abbildung 3.8: Effekt der HCV 3'-UTR auf die HCV- und PTV IRES nach Verlängerung der Konstrukte ohne 3'-UTR *in vivo*.** Translation der RNA Konstrukte mit HCV- bzw. PTV IRES mit oder ohne HCV 3'-UTR in Huh7- und HeLa-Zellen. Die RNAs ohne HCV 3'-UTR enthalten 200 Nukleotide unspezifische Plasmid-Sequenz am 3'-Ende. Die Zellyse und Messung der Firefly Luciferase erfolgte 4 Stunden nach der Transfektion.

Hier konnte in insgesamt acht unabhängigen Experimenten der stimulatorische Effekt der HCV 3'-UTR auf die Translation der HCV und der PTV IRES gezeigt werden. Die Stimulation in Huh7-Zellen beträgt für die HCV IRES 6,5-fach und für die PTV IRES zeigt sich eine ähnliche Stimulation von 6,9-fach. In HeLa-Zellen wird die Aktivität der HCV IRES 6,2-fach stimuliert, die Translation der PTV IRES zeigt eine etwas geringere Stimulierbarkeit durch die HCV 3'-UTR von 4,5-fach (siehe Abbildung 3.8). Die zusätzliche 200-Nukleotid-Verlängerung der Konstrukte ohne HCV 3'-UTR bewirkt eine sehr starke Reduktion der Stimulationswerte. Ohne die Verlängerung lagen die Stimulationen in Huh7-Zellen bei ungefähr 95-fach und in HeLa-Zellen bei 50- bzw. fast 90-fach (vgl. Abbildung 3.4). Die Reduktion der Stimulation kommt durch höhere Firefly Luciferase Werte nach der Veränderung der Konstrukte ohne 3'-UTR zustande, da die Konstrukte mit HCV 3'-UTR unverändert blieben.

Um nun zu überprüfen, ob es bei der Transfektion der RNAs durch Lipofectamine zu den gemessenen Unterschieden in der Expression der Reporter-RNAs kommt, werden die verschiedenen RNA-Konstrukte in Zellen ohne den Einsatz von Lipiden elektroporiert. Somit soll ausgeschlossen werden, dass die gemessenen Stimulationswerte durch die HCV 3'-UTR

nur durch eine effizientere Lipofektion oder Entlassung der RNAs mit HCV 3'-UTR zustande kommen. Die Elektroporation wurde in Huh7- und HEK293 Zellen (menschliche embryonale Nierenzellen) durchgeführt. HeLa-Zellen konnten in der vorliegenden Arbeit nur sehr schlecht durch Elektroporation transfiziert werden und starben überwiegend während oder nach der Elektroporation, so dass diese nur sehr niedrige und nicht auswertbare Daten lieferten.



**Abbildung 3.9: Stimulation von HCV- und PTV IRES durch die HCV 3'-UTR nach Elektroporation.** Gleiche Mengen der jeweiligen RNA-Konstrukte wurden durch Elektroporation in Huh7- und HEK293 Zellen transfiziert. Die Messung der Reporter-Gen-Expression erfolgte nach 4 Stunden.

Durch die Transfektion der RNA-Reporterkonstrukte mit Hilfe der Elektroporation, also lipidunabhängig, konnte die Stimulation durch die HCV 3'-UTR bestätigt werden. Die Stimulationswerte in Huh7-Zellen entsprechen hier in etwa denen, die mit Hilfe von Lipofectamine transfiziert wurden, nämlich 5,4-fach für HCV- und 5,2-fach für PTV IRES-abhängige Translation. Die Transfektion der humanen Nierenzelllinie zeigte eine etwas geringere Stimulation für die HCV IRES (2,7-fach) und eine 4,5-fache Stimulation der PTV IRES.

#### Diskussion

Nach der Verlängerung der Reporter-RNAs um 200 zusätzliche Nukleotide stromabwärts des Firefly-Reportergens sinken die relativen Stimulationswerte durch die HCV 3'-UTR *in vivo* und sind im RRL sogar nicht mehr zu sehen. Dies scheint an einer erhöhten Expression der Konstrukte ohne HCV 3'-UTR zu liegen. Diese Tatsache lässt vermuten, dass bei der Translation ohne RNA-Sequenz nach dem Reporter-Gen, die Ribosomen am 3'-Ende der RNA eventuell nicht effektiv von der Nukleinsäure dissoziieren und recycelt werden können, so dass dabei niedrigere Expressionswerte gemessen werden. In der Studie von Song et al. wurde zwar eine zusätzliche 15 Nukleotid-Sequenz an das Gen der Fluc angehängt, jedoch zeigte diese keinen Unterschied in der Expression im Vergleich zur RNA ohne diese Verlängerung. Dies lässt vermuten, dass 15 zusätzliche Nukleotide nicht ausreichen, um

einen Effekt zu sehen und dass für eine korrekte Termination der Translation mehr Nukleotide hinter dem Reportergen notwendig sind. Die hier anhand der neuen Reporter RNAs ermittelten Stimulationswerte durch die HCV 3'-UTR sind allerdings nun besser mit den Resultaten der Studie von Song et al. zu vergleichen. Auch hier konnte nun keine Stimulation im RRL mehr gefunden werden. Trotzdem kann die dort festgestellte Zelltyp-Spezifität hier nicht nachgewiesen werden, da die sich hier ähnliche Stimulationswerte in Leberzellen und Nicht-Leberzellen zeigen. Wie diese Unterschiede zu erklären sind, konnte nicht gezeigt werden. Der Effekt der Translationsstimulation durch die HCV 3'-UTR ist also auch neben Huh7- und HeLa-Zellen in HEK293 Zellen zu beobachten. Außerdem zeigen die Elektroporations-Experimente, dass dieser Effekt nicht durch Unterschiede in der Transfektion der RNA-Konstrukte zustande kommt, sondern dass es sich um eine tatsächliche Translationsstimulation handelt. Da diese nicht nur in der Hepatomzelllinie, sondern auch in der Zervixkarzinom- und Nierenzelllinie zu erkennen ist, scheint es sich hierbei nicht um einen zelltypabhängigen, sondern eher um einen universellen Effekt der Stimulation zu handeln. Eine erhöhte Translation der viralen RNA durch die HCV 3'-UTR scheint also kein entscheidender Faktor für eine Zellspezifität des Virus zu sein.

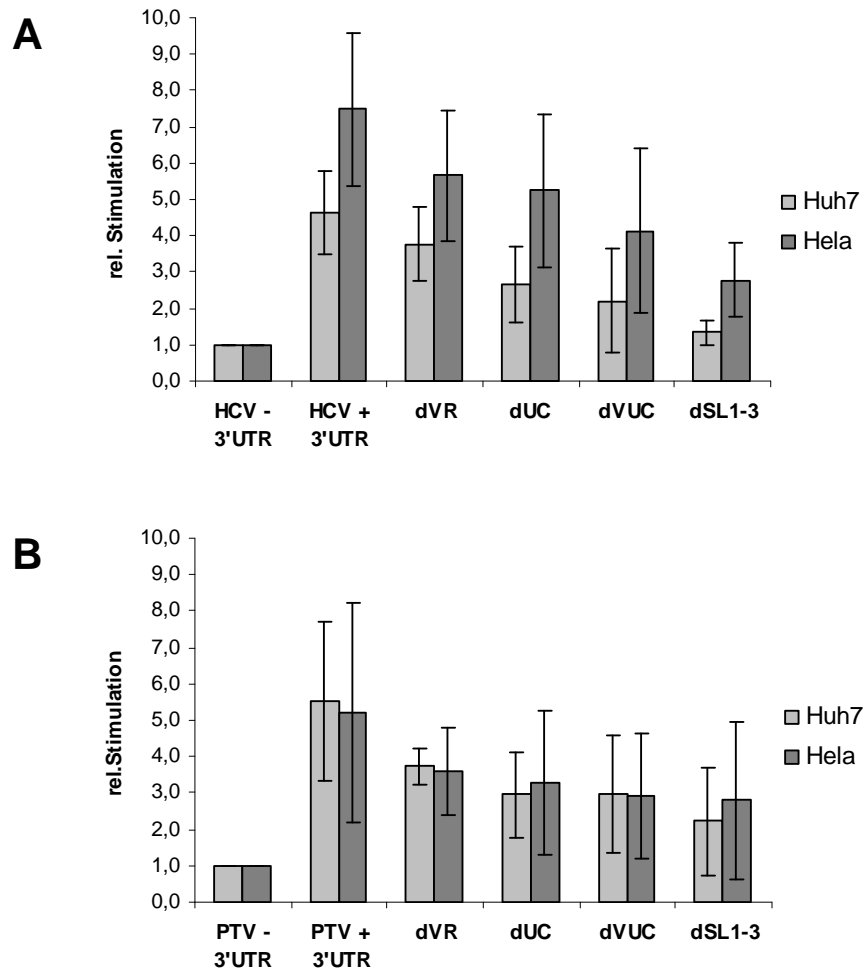
Um zu überprüfen, dass die gemessenen Stimulationen tatsächlich auf Translationsebene stattfinden und nicht durch eine vermehrte Degradation des Konstrukts ohne HCV 3'-UTR zustande kommen, wurde eine RNA-Stabilitätskontrolle durchgeführt. Dafür wurde nach Transfektion der Reporter RNAs nach verschiedenen Zeitpunkten von zwei bis acht Stunden, eine Reextraktion der RNA aus den Zellen und eine Mengenbestimmung mit Hilfe der quantitativen real-time PCR vorgenommen. Die Daten (gezeigt in Bung, Bochkava et al., 2010) lassen keine Unterschiede in der Degradation der unterschiedlichen Konstrukte erkennen. Dies deckt sich mit der Stabilitätskontrolle aus Song et al., wo ebenfalls keine Unterschiede nach Reextraktion der RNA und darauf folgendem „RNase-Protection Assay“ detektiert wurden.

#### **3.1.3 Verschiedene Deletionen innerhalb der HCV 3'-UTR reduzieren die Stimulation der Translation von HCV und PTV IRES**

Bisher konnte hier der stimulatorische Effekt der HCV 3'-UTR auf die IRES von HCV und PTV nachgewiesen werden. Es soll nun überprüft werden, welche Bereiche der HCV 3'-UTR an diesem Effekt beteiligt sind.

Die HCV 3'-UTR besteht aus drei verschiedenen Regionen (siehe Abbildung 1.5), einer variablen Region, einem PolyU/C-Trakt und der 3'X Region mit insgesamt drei Stem-loops, SL1-3. Um zu testen, welcher Bereich für die Translationsstimulation am wichtigsten ist, wurden Mutanten der 3'-UTR hergestellt und in die Konstrukte mit HCV- und PTV IRES kloniert. Es handelt sich hierbei um Deletionen der einzelnen Bereiche der HCV 3'-UTR und um eine Mutation, in der die variable Region zusammen mit dem PolyU/C-Trakt deletiert ist.

Die entsprechenden RNAs wurden zusammen mit der RNA ohne HCV 3'-UTR in Huh7 und HeLa-Zellen transfiziert.



**Abbildung 3.10: Effekt der HCV 3'-UTR Mutanten auf die IRES-abhängige Translation der HCV IRES (A) und PTV IRES (B).** Transfektion der RNA-Konstrukte mit mutierter HCV 3'-UTR im Vergleich zu RNAs ohne oder mit vollständiger HCV 3'-UTR in Huh7- und HeLa-Zellen. Die Werte ohne 3'-UTR wurden gleich 1 gesetzt. dVR = Deletion der variablen Region; dUC = Deletion des PolyU/C-Trakts; dVUC = Deletion der variablen Region und des PolyU/C-Trakts; dSL1-3 = Deletion der 3'X Region, stem-loops 1-3.

Die Deletionen innerhalb der HCV 3'-UTR bewirken in Kombination mit beiden IRES-Elementen (HCV und PTV IRES) in beiden Zelllinien eine Reduktion des translationsstimulierenden Effekts (siehe Abbildung 3.10). Der stärkste Verlust an Stimulation ist durch die Deletion der 3'X-Region zu beobachten. Diese führt zu einer Reduktion der Stimulation von ungefähr 70 % bei der HCV IRES und 50 % bei der PTV IRES. Einen vergleichsweise geringen Effekt zeigt die Deletion der variablen Region, was schließen lässt, dass diese bei der Translationsstimulation nur einen geringen Einfluss hat. Einen etwas stärkeren Effekt zeigt die Mutation des PolyU/C-Trakt, gefolgt von der Kombination aus PolyU/C-Trakt und variabler Region.

#### **Diskussion**

Alle vier Deletionen bewirken eine Reduktion der Translationsstimulation durch die HCV 3'-UTR, allerdings in unterschiedlicher Ausprägung. Ähnliche Versuche für die Stimulation der HCV IRES in Huh7-Zellen wurden auch schon von Song et al. durchgeführt. Dort konnte ebenfalls eine deutliche Reduktion der Stimulation nachgewiesen werden, die jedoch höher ausfällt als in den hier durchgeführten Versuchreihen. Alle oben aufgeführten Mutanten zeigten in der Studie von Song nur noch eine Stimulation von 12 - 17 % im Vergleich zum HCV 3'-UTR Wildtyp, wobei auch dort die Deletion der 3'-X Region die deutlichste Reduktion zeigte. Wie auch hier der quantitative Unterschied zwischen beiden Studien zu erklären ist, konnte nicht gezeigt werden.

Da die hier verwendeten 3'-UTR-Mutanten auch zum Teil eine Änderung der Sekundärstruktur am 3'-Ende beinhalten, ist eine erleichterte Degradation durch Exonukleasen eine mögliche Erklärung für die Reduktion der Translation, da sich eventuell vor exonukleolytischem Abbau schützende Sekundärstrukturen durch die Mutationen verändert haben. Song et al. konnten jedoch durch RNA-Reextraktion und anschließenden „RNase-Protection Assay“ zeigen, dass die Unterschiede in der Translationseffizienz der Mutationen nicht mit Unterschieden in der RNA-Stabilität erklärt werden können. Da außerdem hier auch die Deletionen von internen Regionen der HCV 3'-UTR einen deutlichen Verlust an Translationsstimulation zeigen, lässt sich vermuten, dass nicht die veränderten Bedingungen am 3'-Ende der RNA für 3'-Exonukleasen die Reduktion der Translation auslösen.

Zusätzlich wurden auch hier die Transfektionen, die mit Hilfe von Lipofektion durchgeführt wurden, durch Elektroporationen bestätigt, so dass auch hier Unterschiede zwischen den Reporter-RNAs ausgeschlossen werden können.

Die oben gezeigten Daten weisen also darauf hin, dass alle drei Bereiche der HCV 3'-UTR an der Stimulation der Aktivität der IRES-Elemente beteiligt sind, jedoch in unterschiedlich starkem Ausmaß. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt kann die Bindung von verschiedenen Proteinen an die HCV 3'-UTR sein, die eine 5'-3'-Interaktion vermitteln. Da sowohl die HCV IRES als auch die HCV 3'-UTR eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine binden, kann es im Falle einer Deletion einer bestimmten Region zu einer geschwächten Interaktion der RNA-Enden durch eine fehlende Proteinbindung kommen. Da die ermittelten Daten ähnliche Muster in Leber- und Nicht Leberzellen zeigen, liegt der Verdacht nahe, dass es sich hierbei um eine ubiquitäre Interaktion handelt.

#### **Fazit**

Die HCV 3'-UTR stimuliert die Translation sowohl der HCV- als auch der ihr strukturell und funktional ähnlichen PTV IRES. Diese Stimulation findet in allen getesteten Zelltypen statt, was darauf hinweist, dass die HCV 3'-UTR nicht an der Leberspezifität des Virus beteiligt ist. Die Translationsstimulation konnte allerdings ausschließlich *in vivo* gezeigt werden. Im

Retikulozytenlysat werden die Reporter-RNAs zwar sehr effektiv translatiert, möglicherweise fehlen in diesem Translationssystem jedoch eventuelle Faktoren, die an der Stimulation der Translation durch die HCV 3'-UTR beteiligt sind. Des Weiteren zeigen Deletion innerhalb der HCV 3'-UTR, dass alle Regionen der HCV 3'-UTR an der Stimulation der Aktivität der IRES in unterschiedlichem Ausmaße beteiligt sind.

#### **3.2 Einfluss eines Poly(A)-Anhangs auf die Translation**

Welchen Effekt ein Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der RNA auf die IRES abhängige Translation hat, wird in der Literatur bisher zum Teil kontrovers diskutiert. Schon für verschiedene IRES-Elemente konnte in *in vitro*-Studien eine stimulatorische Wirkung eines Poly(A)-Schwanzes auf die Translation gezeigt werden. Dazu gehören beispielsweise die IRES des Poliovirus, ein Virus, welches natürlicherweise einen Poly(A)-Anhang an seinem 3'-Ende der RNA trägt, oder die IRES von EMCV (Bergamini et al., 2000, Michel et al., 2001). Es konnte auch *in vitro* nachgewiesen werden, dass ein Poly(A)-Anhang von 50 A-Resten einen stimulatorischen Effekt auf die Aktivität der HCV IRES in translationskompetentem HeLa-Extrakt besitzt (Bradrick et al., 2007). In anderen Studien hingegen konnte keine stimulatorische Wirkung eines Poly(A)-Anhangs auf die HCV IRES-abhängige Translation gezeigt werden (Svitkin et al., 2001; Michel et al., 2001; Paulous et al., 2003).

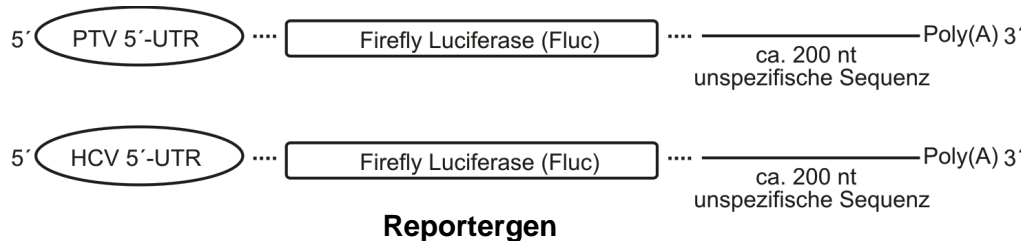
Auch ein Effekt des Poly(A)-Endes auf die cap-abhängige Translation *in vivo* und *in vitro* wurde in der Literatur beschrieben. Dabei zeigt sich oftmals eine synergistische Stimulation der Translation durch die 5'-Cap Struktur und den Poly(A)-Schwanz am RNA 3'-Ende (Gallie 1991; Preiss und Hentze 1998, Michel et al., 2000).

In den folgenden Experimenten wurde der Effekt eines Poly(A)-Anhangs von 50 A-Resten sowohl auf die cap- als auch auf die IRES-abhängige Translation von verschiedenen IRES Typen *in vivo* und *in vitro* getestet.

##### **3.2.1 Ein Poly(A)-Anhang von 50 A stimuliert die IRES-abhängige Translation**

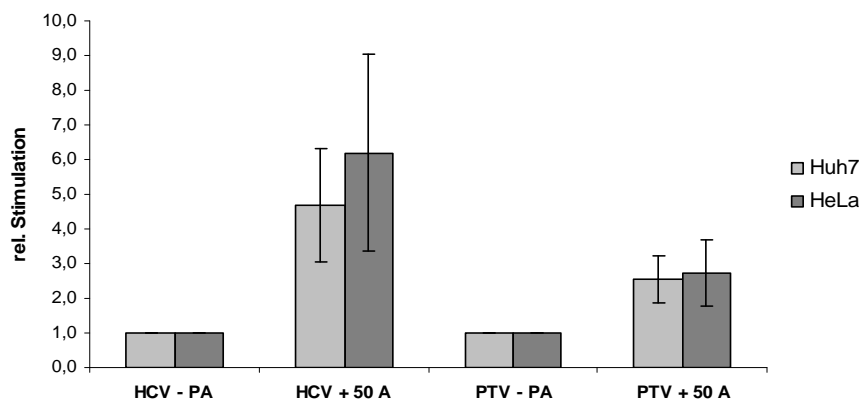
Wie für Picornaviren üblich besitzt das Pociene Teschovirus einen Poly(A)-Anhang an seinem 3'-Ende der viralen RNA. Um nun zu überprüfen, ob wie bei zellulären mRNAs der Poly(A)-Anhang die Translation der HCV und PTV IRES ebenfalls stimulieren kann, wurden die RNAs nach der unspezifischen Sequenz um einen 50(A)-Anhang verlängert. Dieser wurde per PCR hergestellt, so dass das zu transkribierende Template eine Verlängerung von 50(T) hatte. Der Vorteil dieser Methode der Polyadenylierung ist, dass nach der Transkription dieses Templates alle RNAs immer einen identisch langen Poly(A)-Anhang besitzen. Die alternative Methode zur Generierung von polyadenylierten RNAs ist der Einsatz eines Enzyms, der Poly(A)-Polymerase, die unter Einsatz von rATP, je nach Inkubationszeit und eingesetzter RNA distributiv Poly(A)-Schwänze am RNA 3'-Ende anfügt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass es möglich ist, längere Poly(A)-Anhänge zu erzeugen, der Nachteil besteht

allerdings darin, dass bei jeder Polyadenylierung die Länge der erzeugten A-Anhänge im Vorfeld nicht genau bestimmt werden kann. Um sicherzustellen, dass in den folgenden Experimenten immer die gleiche Poly(A)-Anhang-Länge eingesetzt wird und die Versuchsreihen somit untereinander vergleichbar sind, wurden die Versuche zunächst auf einen durch PCR hergestellten 50er Poly(A)-Anhang beschränkt.



**Abbildung 3.11: Die Reporter-Konstrukte mit Poly(A)-Anhang.** Den Reporter RNAs mit HCV bzw. PTV IRES wurden nach der unspezifischen Sequenz eine 50(A)-Verlängerung angehängt. Abbildung modifiziert nach Bung, Bochkaeva et al, 2010.

Die oben dargestellten polyadenylierten RNAs mit HCV- bzw. PTV IRES wurden zusammen mit den RNAs, die ausschließlich die unspezifische Plasmid-Sequenz enthalten, nach der Transkription in Huh7- und HeLa-Zellen transfiziert, um den Effekt des Poly(A)-Anhangs *in vivo* zu überprüfen.



**Abbildung 3.12: Stimulation vom HCV- und PTV IRES durch Poly(A)-Anhang.** Gleiche Mengen der jeweiligen RNA-Konstrukte mit oder ohne Poly(A)-Ende wurden in Huh7 und HeLa-Zellen transfiziert. Die Messung der Reporter-Expression erfolgte nach 4 Stunden.

Die Messung der Reporter-Gen-Aktivität für die RNA-Konstrukte mit beziehungsweise ohne Poly(A)-Ende zeigt in beiden Zelllinien eine Stimulation beider IRES-Elemente durch das Anhängen von 50 A-Resten an die unspezifische Sequenz. Die oben gezeigten Daten für die PTV Konstrukte stammen aus der Veröffentlichung (Bung, Bochkaeva et al., 2010), die im Rahmen der Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Ivan Shatsky im deutsch-russischen Graduiertenkolleg 1384 entstanden ist.

Die Stimulation der HCV IRES-abhängigen Translation durch den Poly(A)-Anhang beträgt in Huh7-Zellen 4,7-fach, in HeLa-Zellen 6,2-fach. Die gemessene Stimulation der Aktivität der PTV IRES hingegen liegt bei beiden Zelllinien bei ungefähr 2,6-fach, was etwas unterhalb der Werte für die HCV IRES ist.

#### **Diskussion**

Ein direkter Vergleich der Stimulation der beiden IRES-Elemente durch den Poly(A)-Anhang ist an dieser Stelle nicht möglich, da sich die Konstrukte neben der IRES auch in anderen Details unterscheiden. In den PTV-Konstrukten („PTV3'UTR“ und „PTVSV40“), welche im Labor der AG Shatsky in Moskau hergestellt und verwendet wurden, befindet sich beispielsweise eine Luciferase-Sequenz, die sich am 3'-Ende in einigen Nukleotiden von der in der AG Niepmann verwendeten Nukleotid-Sequenz unterscheidet. Trotzdem sind beide Luciferasen funktionstüchtig. Ein weiterer Unterschied ist die verwendete unspezifische Sequenz nach dem Reporter-gen. Im Gegensatz zu der hier eingesetzten unspezifischen Plasmid-Sequenz tragen die Plasmide der russischen Arbeitsgruppe eine SV40-Sequenz. Diese Sequenz beinhaltet den Bereich der Nukleotide 2538 – 2759 des Simian-Virus 40, einem Polyomavirus. Die in den Konstrukten verwendete Sequenz von ungefähr 220 Nukleotiden liegt im SV40-Genom zum Teil in den codierenden Regionen des T-Antigens und des viralen Proteins 1 (VP1), beinhaltet aber auch den Sequenzbereich dazwischen, der mehrere Polyadenylierungs-Signale enthält. Da in der vorliegenden Arbeit allerdings *in-vitro*-transkribierte RNAs transfiziert wurden, sollten die Polyadenylierungs-Signale keinen Einfluss auf die Translationseffizienz zeigen.

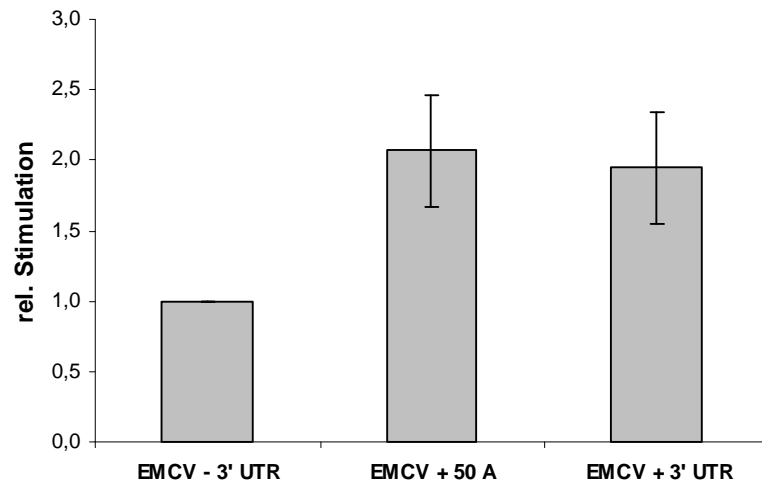
Es lässt sich aber zusammenfassend feststellen, dass sowohl die Translation der HCV als auch der PTV IRES durch einen Poly(A)-Anhang von 50 A stimulierbar sind, nur ein exakter quantitativer Vergleich ist an dieser Stelle nicht möglich. Die Ergebnisse für die Stimulierbarkeit der Translation an der HCV IRES decken sich somit mit den in anderen Studien gefunden Stimulationen. Jedoch ist hier anzumerken, dass diese Studien im Gegensatz zu den hier gezeigten Versuchesreihen oft *in vitro* durchgeführt wurden, beispielsweise in translationskompetenten HeLa- oder Hefe-Extrakten (Preiss und Hentze 1998; Bergamini et al., 2000; Bradrick et al., 2007).

Da die HCV und die PTV IRES sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer Funktion, zum Beispiel bezüglich ihrer Anforderungen an Initiationsfaktoren für die Translation, eine hohe Ähnlichkeit besitzen, wurde die Stimulierbarkeit einer mit diesen beiden IRES-Elementen nicht verwandten IRES untersucht. Dazu diente in unserem Fall die IRES des Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV). Diese Typ II IRES hat sowohl strukturell als auch funktionell keine Verwandtschaft zur HCV IRES (siehe Abbildung 1.8). Durch den Einsatz einer solchen IRES sollte geklärt werden, ob es sich um eine IRES-spezifische oder eher



unspezifische Stimulation der Translation durch die HCV 3'-UTR beziehungsweise durch den Poly(A)-Anhang handelt.

Um dies zu testen, wurde die HCV IRES in den Reporterkonstrukten durch die EMCV IRES ersetzt und die RNAs entweder mit HCV 3'-UTR, unspezifischer Sequenz oder dem 50 A-Anhang in Zellen transfiziert.



**Abbildung 3.13: Transfektion der EMCV RNA Reporterkonstrukte in Huh7-Zellen.** Die Reporterkonstrukte mit EMCV IRES, Firefly Luciferase als Reporter gen und verschiedenen 3'-UTR Enden (unspezifische Plasmid-Sequenz, Poly(A)-Schwanz bzw. HCV 3'-UTR) wurden in Huh7-Zellen transfiziert und die Reporteraktivität nach 4 Stunden gemessen.

Auch die Translation an der IRES von EMCV wird durch die HCV 3'-UTR und den Poly(A)-Anhang stimuliert. Dabei konnte eine Erhöhung der Reporter genexpression von ungefähr 2-fach durch beide 3'-RNA-Enden in Huh7-Zellen beobachtet werden. Die für diese Versuche verwendeten Plasmide stammen ebenfalls aus dem Labor der AG Shatsky und somit sind die für die EMCV IRES gefundenen Stimulationswerte vergleichbar mit der Stimulation der Aktivität der PTV IRES durch den Poly(A)-Anhang (siehe Abbildung 3.12).

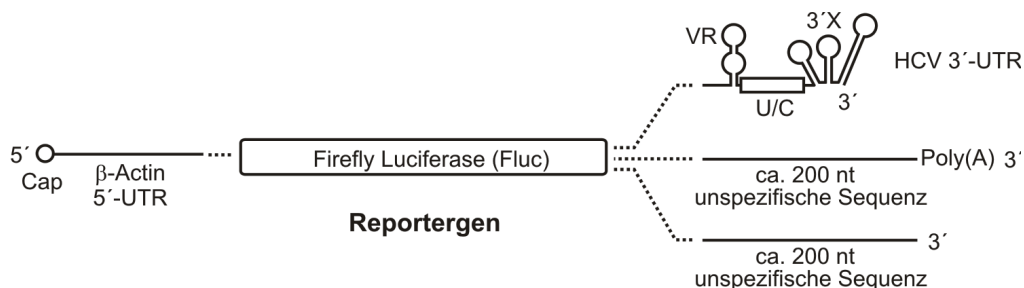
#### Diskussion

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die IRES-abhängige Translation durch die HCV 3'-UTR und einen Poly(A)-Anhang *in vivo* stimulieren lässt. Dies scheint unabhängig zu sein von der Art der IRES und unabhängig von Zelltyp, da sich neben den HCV und PTV IRES-Elementen auch die nicht verwandte IRES von EMCV stimulieren lässt. Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass schon früh der Effekt eines Poly(A)-Anhangs auf die EMCV IRES-abhängige Translation gefunden wurde (Hruby und Roberts, 1977). Auch andere Gruppen, wie Bradrick et al. (2007) zeigten den stimulatorischen Effekt eines 50er Poly(A)-Endes, jedoch sollte auch hier angemerkt werden, dass es sich oftmals um Daten aus *in vitro*-Translationen handelt (Svitkin et al., 2001; Bradrick et al., 2007).

### 3.2.2 Ein Poly(A)-Anhang und die HCV 3'-UTR stimulieren die cap-abhängige Translation *in vivo*

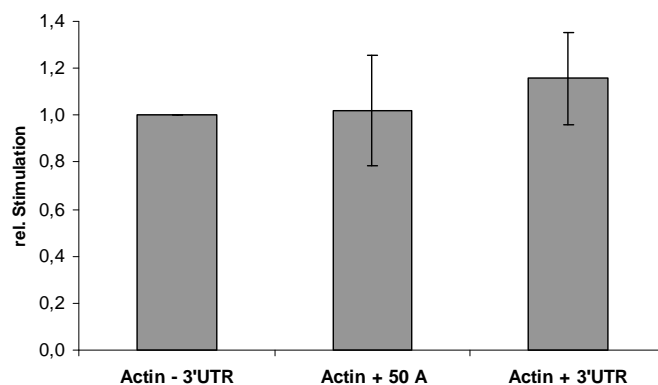
Neben der Initiation von Translation durch eine IRES existiert als weitere Möglichkeit die Initiation durch eine 5'-Cap-Struktur an der RNA. Diese findet man hauptsächlich an den mRNAs (messenger RNAs) von Zellen. Mit Hilfe dieser Cap-Struktur an der RNA werden durch Initiationsfaktoren die ribosomalen Untereinheiten an die RNA rekrutiert und gebunden.

Um zu testen, ob auch die Cap-abhängige Translation ebenso wie die IRES-abhängige Translation durch die HCV 3'-UTR beziehungsweise den Poly(A)-Anhang stimuliert werden kann, wurden Reporterstrukture hergestellt, die anstatt einer IRES-Struktur die 5'-UTR von  $\beta$ -Actin besitzen. Diese RNA wurde *in vitro* kotranskriptional durch den Einsatz eines 5' 7-Methyl-Guanosin-Nukleotids gecappt.



**Abbildung 3.14: Die gecappten Actin-Reporterstrukturen.** Die Reporterstrukturen wurden während der Transkription gecappt und enthalten alle die 5'-UTR von  $\beta$ -Actin sowie die Firefly Luciferase-Sequenz als Reportergen. Neben der 200 Nukleotide langen Plasmid-Sequenz wurden auch die HCV 3'-UTR und ein 50(A)-Anhang als 3'-Ende der RNAs eingesetzt. Abbildung modifiziert nach Bung, Bochkaeva et al., 2010.

Die RNA Konstrukte wurden zunächst in der *in vitro*-Translation in RRL eingesetzt, um zu sehen, welchen Effekt die verschiedenen 3'-Enden hier auf die cap-abhängige Translation zeigen.

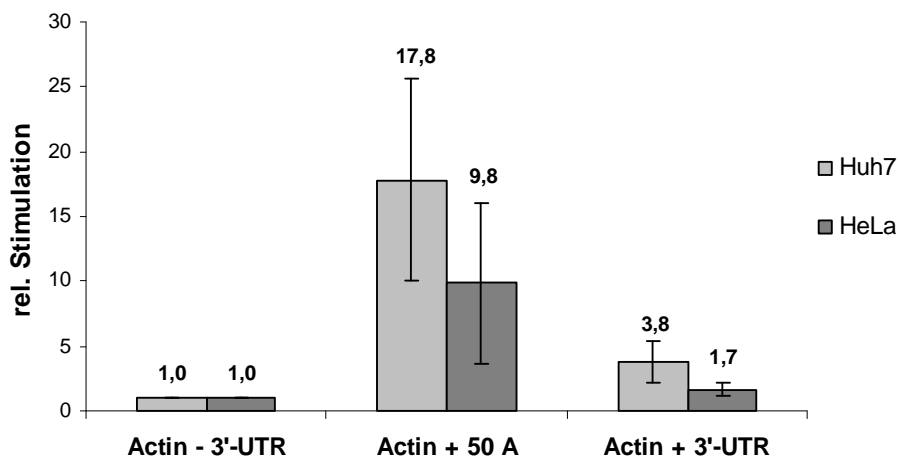


**Abbildung 3.15: *In vitro*-Translation der gecappten Reporter-RNAs in RRL.** Die gecappten Actin-RNAs mit beziehungsweise ohne die HCV 3'-UTR oder einem Poly(A)-Ende wurden in gleichen Mengen in die *in vitro*-Translation eingesetzt und die Reporteraktivität gemessen.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Die hier verwendeten RNAs zeigen zwar eine gute Reporterexpression im translationskompetenten Kaninchenlysat (Rohwerte nicht gezeigt), allerdings kann auch hier keine Stimulierbarkeit durch die HCV 3'-UTR oder den Poly(A)-Anhang gemessen werden. Dies entspricht den Ergebnissen, die bei dem Einsatz der IRES-enthaltenen RNAs gezeigt werden konnten (vergleiche Abbildung 3.7).

Obwohl *in vitro* kein Effekt der verschiedenen 3'-Enden auf die IRES-unabhängige, Cap-abhängige Translation zu zeigen war, wurden die Reporter RNA wieder in verschiedene Zelllinien transfiziert, um den Effekt *in vivo* zu testen.



**Abbildung 3.16: Transfektion der gecappten Actin-RNAs in Zellen.** Die Reporter-RNAs mit Cap-Struktur am 5'-Ende und verschiedenen 3'-UTRs (mit und ohne HCV 3'-UTR oder Poly(A)-Anhang) wurden in Huh7 und HeLa-Zellen transfiziert und die Reporteraktivität nach 4 Stunden gemessen.

Im Gegensatz zur *in vitro*-Translation im Retikulozytenlysat kann in Zellen auch bei RNAs mit Cap-Struktur am 5'-Ende ein stimulatorischer Effekt sowohl durch die HCV 3'-UTR als auch den 50(A)-Anhang gezeigt werden. Dieser ist jedoch in der Hepatomzelllinie Huh7 deutlicher ausgeprägt als in der Nicht-Hepatomzelllinie HeLa. Die Stimulation der Cap-abhängigen Translation durch die HCV 3'-UTR beträgt in Huh7-Zellen 3,8-fach, was etwas niedriger als die der IRES-abhängigen Translation bei HCV und PTV (ca. 7-fach). Der Stimulationsunterschied in HeLa-Zellen ist sogar noch deutlicher. Gecappte RNAs werden hier 1,7-fach stimuliert, wohingegen die HCV IRES durch ihre 3'-UTR in HeLa-Zellen ungefähr 6-fach stimuliert wird.

Eine deutlich höhere Stimulation der Translation der gecappten RNAs im Vergleich zu den RNAs ohne Cap-Nukleotid ist durch das Anhängen eines Poly(A)-Schwanzes zu beobachten. Die HCV IRES wurde durch den 50(A)-Anhang in Huh7-Zellen ungefähr 5-fach, in HeLa-Zellen 6-fach stimuliert. Das Actin-Konstrukt wird in HeLa-Zellen hier fast 10-fach und in Huh7-Zellen sogar fast 18-fach stimuliert. Die stimulatorische Wirkung eines Poly(A)-

Endes auf die Cap-abhängige Translation scheint also deutlich höher zu sein als bei IRES-abhängiger Translation.

#### **Diskussion**

Die stimulatorische Wirkung eines Poly(A)-Anhangs auf die cap-abhängige Translation ist vielfach in der vorhandenen Literatur beschrieben. Hier scheint es sich um einen synergistischen Effekt der Cap-Struktur am 5'-Ende und des Poly(A)-Anhangs am 3'-Ende zu handeln (Gallie, 1991). Diese Stimulation ist auch hier nicht im Retikulozyten-Lysat nachweisbar, sondern ebenfalls nur in Zellen, beispielsweise in CHO-Zellen (engl. „Chinese Hamster ovary“). Andere Gruppen hingegen konnten auch einen Effekt in verschiedenen *in vitro*-Translationssystemen zeigen (Bradrick et al, 2007; Iizuka et al., 1994). Den *in vivo* gefundenen synergistischen Effekt von Cap-Struktur und Poly(A)-Ende auf die Translation konnte in der Literatur im Retikulozytenlysat nur teilweise bestätigt werden. Notwendig sind dazu der Einsatz von Kompetitor-mRNAs beziehungsweise der von partiell Ribosomen-depletiertem RRL, was allerdings zu niedrigen Translationseffizienzen führt (Preiss und Hentze, 1998; Michel et al., 2000). Auch das nicht-nuklease behandelte RRL ist in einer Studie als alternatives *in vitro*-Translationssystem für solche Studien beschrieben worden (Soto Rifo et al., 2007).

#### **Fazit**

Die Anwesenheit eines Poly(A)-Anhangs von 50 A am 3'-Ende der Reporter RNAs zeigt *in vivo* sowohl auf die Translation der HCV als auch der PTV IRES einen deutlichen stimulatorischen Effekt. Auch die Aktivität einer Typ II Picornavirus IRES (EMCV) kann sowohl durch die HCV 3'-UTR als auch einen Poly(A)-Ende in ähnlichem Ausmaß stimuliert werden. Neben der IRES-abhängigen wird auch die cap-abhängige Translation durch die HCV 3'-UTR und den Poly(A)-Anhang in Zellen stimuliert. Auch hier zeigen sich alle Stimulationen zelltypunabhängig. Dieser Effekt konnte jedoch nicht durch *in vitro*-Translationsstudien in RRL gezeigt werden.

#### **Ein längerer Exkurs**

##### **Mögliche Probleme der Normalisierung bei Kotransfektion eines Renilla Reporters**

In vielen Studien wird als interne Normalisierungskontrolle eine Reporter-RNA, die das Gen der Renilla Luciferase (Rluc) beinhaltet, eingesetzt. Nach Lyse der transfizierten Zellen können sowohl Firefly- als auch Renilla Luciferase unabhängig voneinander sehr einfach enzymatisch gemessen werden. Die Aktivitätswerte der kotransfizierten Renilla Luciferase können dann zur Normalisierung der Firefly Luciferase Werte verwendet werden. Mit Hilfe

dieser Methode sollen angeblich Schwankungen in der Transfektionseffizienz ausgeglichen werden. Dies ist unter Wissenschaftlern, die sich beispielsweise mit Transkriptions- oder Translationsvorgängen in Zellen beschäftigen, eine übliche Methode, die oftmals nicht in Frage gestellt wird.

Eine Normalisierung bedeutet in diesen Fällen, dass eine Korrektur der „Well-zu-Well“-Variationen stattfindet und es somit zu einem Ausgleich der Schwankung in der Zellzahl und der Transfektionseffizienz, die innerhalb einer Versuchsreihe zwischen den Ansätzen in den Vertiefungen der Platte auftreten, kommen soll.

Im Fall der in dieser Arbeit gezeigten Experimente wurden die verschiedenen Firefly Reporter-RNAs, die am 5'-Ende entweder die HCV IRES oder die gecappte  $\beta$ -Actin 5'-UTR und am 3'-Ende die HCV 3'-UTR, einen Poly(A)-Anhang oder nur unspezifische Plasmid-Sequenz beinhalten zusammen mit einer gecappten und polyadenylierten Rluc-RNA in die Zellen transfiziert. Die Kotransfektion der beiden Reporter RNAs erfolgte mit Hilfe des lipidhaltigen Reagens Lipofectamine 2000.

Eine weitere Methode, die Anzahl an lebenden Zellen im Well zu bestimmen, ist die Anwendung des so genannten WST1-Tests. Das WST1-Reagenz ist ein Tetrazoliumsalz, welches von lebenden Zellen in das lösliche Formazan gespalten wird und dabei seine Farbe verändert. Diese Reaktion erfolgt mit Hilfe von zellulären Enzymen. Da die Umsetzung in Formazan durch Enzyme der Atmungskette erfolgt, korreliert das Messergebnis des WST1-Tests mit der Masse des mitochondrien-haltigen Zytoplasmas der Zellen. Das WST1-Reagenz wird in farblosem DMEM 1:50 verdünnt und in die Vertiefungen der transfizierten Zellen gegeben. Während der Inkubation im Brutschrank verfärbt sich das Medium gelb und das Ausmaß an Gelbfärbung wird nun photometrisch in einer 96-Well-Platte im ELISA-Reader bei 450 nm bestimmt. Diese Gelbfärbung korreliert mit der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen in einem Transfektionsansatz, so dass durch diese Methode zuverlässig Differenzen in der Zelldichte zwischen den Transfektionsansätzen innerhalb eines Experiments bestimmt werden können.

Um systematisch zu untersuchen, ob es eventuell zu einer gegenseitigen Beeinflussung der beiden Reporter-RNAs während beziehungsweise nach der Transfektion kommt, wurden parallel Versuchsreihen angesetzt, die entweder die entsprechende Fluc-Reporter-RNA mit der Rluc-Reporter-RNA oder die Fluc-Reporter-RNA allein enthalten. Zur Veranschaulichung sind exemplarisch in Tabelle 5 die Messergebnisse für die HCV IRES Fluc Konstrukte mit und ohne HCV 3'-UTR in Huh7-Zellen zusammengefasst dargestellt. Die Experimente an einem bestimmten Tag wurden in der gleichen 24 Well-Platte und mit aus einer Kulturflasche stammenden Zellen durchgeführt.

<b>A Fluc-Aktivität ohne Rluc-Kotransfektion</b>						
1	2	3	4	5	6	7
	<u>ohne HCV 3'-UTR</u>		<u>mit HCV 3'-UTR</u>		(+)/(-)	(+)/(-)
Tag	Fluc	WST1	Fluc	WST1	-	WST1
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	614	0,295	1.953	0,332	3,18	2,83
3	1.627	0,633	15.050	0,645	9,25	9,51
4	1.177	0,389	7.692	0,443	6,54	5,74
5	4.630	0,285	33.570	0,333	7,25	6,21
6	4.820	0,267	12.524	0,288	2,60	2,41
7	12.720	0,251	42.576	0,277	3,35	3,03
8	1.631	0,142	6.733	0,146	4,13	4,02
9	15.423	0,502	32.032	0,521	2,08	2,00
10	20.472	0,390	44.572	0,406	2,18	2,09
sum	<b>63.114</b>		<b>196.702</b>	<b>Mittelw.</b>	<b>4,51</b>	<b>4,20</b>
				<b>SD</b>	<b>2,41</b>	<b>2,37</b>

<b>B Fluc-Aktivität mit Rluc-Kotransfektion</b>							
1	2	3	4	5	6	7	8
	<u>ohne HCV 3'-UTR</u>		<u>mit HCV 3'-UTR</u>		(+)/(-)	(+)/(-)	(+)/(-)
Tag	Fluc	WST1	Fluc	WST1	-	WST1	Fluc/Rluc
1	2.068	0,498	5.901	0,514	2,85	2,77	1,54
2	1.979	0,337	4.697	0,336	2,37	2,38	1,64
3	2.604	0,646	15.480	0,696	5,95	5,52	5,90
4	1.504	0,430	6.764	0,499	4,50	3,88	3,48
5	4.822	0,289	21.943	0,288	4,55	4,57	3,43
6	12.019	0,236	16.188	0,326	1,35	0,98	2,08
7	12.920	0,290	34.221	0,332	2,65	2,31	1,31
8	3.165	0,140	6.532	0,144	2,06	2,01	3,08
9	14.785	0,502	29.634	0,530	2,00	1,90	0,97
10	28.962	0,412	58.755	0,455	2,03	1,84	1,27
sum	<b>84.828</b>		<b>200.115</b>	<b>Mittelw.</b>	<b>3,03</b>	<b>2,81</b>	<b>2,47</b>
				<b>SD</b>	<b>1,39</b>	<b>1,33</b>	<b>1,38</b>

<b>Rluc-Aktivität</b>			
1	2	4	6
	<u>ohne HCV 3'-UTR</u>		(+)/(-)
Tag	Rluc		Rluc
1	249.131		462.506
2	4.006.253		5.804.067
3	1.085.920		1.095.100
4	101.801		131.480
5	1.107.841		1.468.267
6	2.001.344		1.299.000
7	269.688		545.926
8	479.831		321.964
9	445.214		923.727
10	800.802		1.283.512
sum	<b>1.0547.825</b>	<b>13.335.549</b>	<b>Mittelw. 1,40</b>
			<b>SD 0,49</b>

**Tabelle 5: Gemessene Rohwerte nach Transfektion der Fluc Reporter-RNAs mit HCV IRES +/- HCV 3'-UTR mit beziehungsweise ohne Rluc-RNA Kotransfektion in Huh7-Zellen.** Zusammengefasst sind die 10 unabhängig voneinander durchgeführten Experimente. (A) Transfektion der HCV Fluc Reporter ohne Rluc Kotransfektion. Spalte 2 zeigt die Fluc Werte für HCV(-)3'-UTR, Spalte 4 Fluc Werte für HCV(+)3'-UTR. Spalten 3 und 5 zeigen die entsprechenden WST1-Werte. In

Spalte 6 ist die relative Stimulation durch die HCV 3'-UTR angegeben, Spalte 7 zeigt die relative Stimulation nach Normalisierung der Werte auf den WST1-Wert. (B) Gleiches Experiment wie in (A), aber mit zusätzlicher Rluc-Kotransfektion. Oben: Zusätzlich wird hier in Spalte 8 die relative Stimulation durch die HCV 3'-UTR nach Normalisierung der Fluc-Werte auf die Rluc-Werte angegeben. Unten: Spalte 2 und 4 zeigen die entsprechenden Rluc-Rohwerte der Transfektion mit bzw. ohne HCV 3'-UTR, Spalte 6 zeigt das Verhältnis der Rluc-Werte aus Spalten 2 und 4. Tabelle modifiziert nach Bung, Fehr et al., 2011; Manuskript eingereicht.

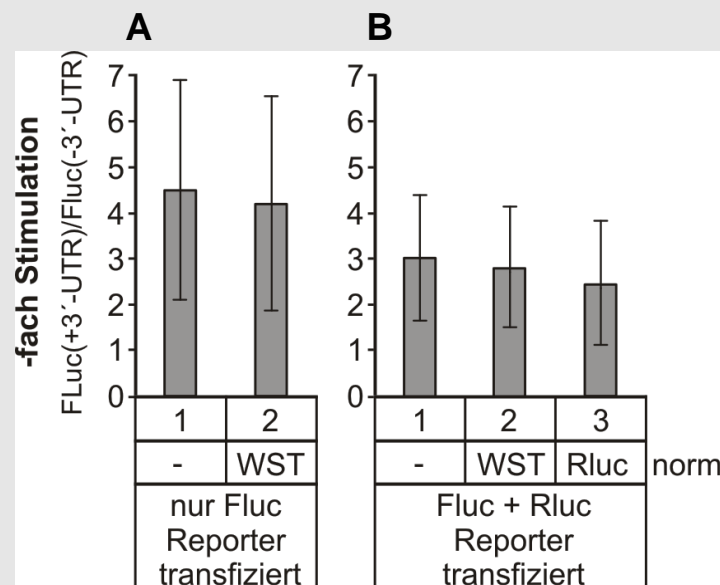
Aus den gezeigten Rohdaten können auf den ersten Blick schon wichtige Schlüsse gezogen werden. Zum einen besteht zwischen den gemessenen Rohwerten der Experimente, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, eine sehr hohe „Tag-zu-Tag“ Variation (vergleiche beispielsweise Einzelwerte in Spalte 2 oder 4). Beim Vergleich der Rohwerte für ein bestimmtes transfiziertes Konstrukt sieht man, dass die Werte von Tag zu Tag und somit von Experiment zu Experiment stark schwanken können. Um die Rohwerte aller durchgeführten Versuche trotzdem miteinander vergleichen zu können, werden zur Ermittlung der relativen Stimulation durch die HCV 3'-UTR ausschließlich die relativen Stimulationen der einzelnen Experimente gemittelt (siehe z.B. Spalte 6). Aus diesen Werten der einzelnen Versuchstage wird anschließend der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Außerdem ist aus den Rohdaten ersichtlich, dass die gemessenen Rluc-Werte höher sind, wenn in der kotransfizierten Fluc-Reporter RNA die HCV 3'-UTR anwesend ist (vergleiche Tabelle 5 (B) unten; Spalte 2 und 4). Dieser Effekt kann nicht aufgrund von Pipettierfehlern aufgetreten sein, da die Rluc-RNA jeweils in einen Mastermix gegeben wurde, um Schwankungen innerhalb der Ansätze möglichst gering zu halten. Die Auswertung ergibt hier eine im Durchschnitt 1,4-fache Erhöhung der Renilla Luciferase, wenn die kotransfizierte Firefly-RNA die HCV 3'-UTR erhält.

Des Weiteren lässt sich eine höhere Expression des Fluc-Reporters ohne HCV 3'-UTR sehen, wenn eine gleichzeitige Rluc-RNA Kotransfektion stattgefunden hat (vergleiche Tabelle 5 B, Spalte 2 mit 5 A, Spalte 2). Diese Tendenz ist sowohl für die Mehrheit der einzelnen Experimente als auch in der Summe aller Versuche zu erkennen. Somit scheint die gecappte und polyadenylierte Rluc-Reporter-RNA oftmals die Expression des Fluc-Reporters in trans positiv zu beeinflussen.

Aus den gezeigten Daten lässt sich schließen, dass es zu einer Beeinflussung der Expression des gecappten und polyadenylierten Rluc-Reporters in Abhängigkeit des kotransfizierten Fluc-Reporters in trans kommt. Durch dieses Muster in der Änderung der Expression des Rluc Reporters ist eine Unabhängigkeit der Translation der beiden Reporter-RNAs nicht gegeben, und eine Normalisierung auf solch einen Reporter würde somit zu Fehlern in der Auswertung der Daten führen.

Ein Beispiel für eine solche fehlerhafte Auswertung aufgrund von nicht-unabhängigen Kotransfektionen von den beiden Reporter RNAs ist in Abbildung 3.17 gezeigt.



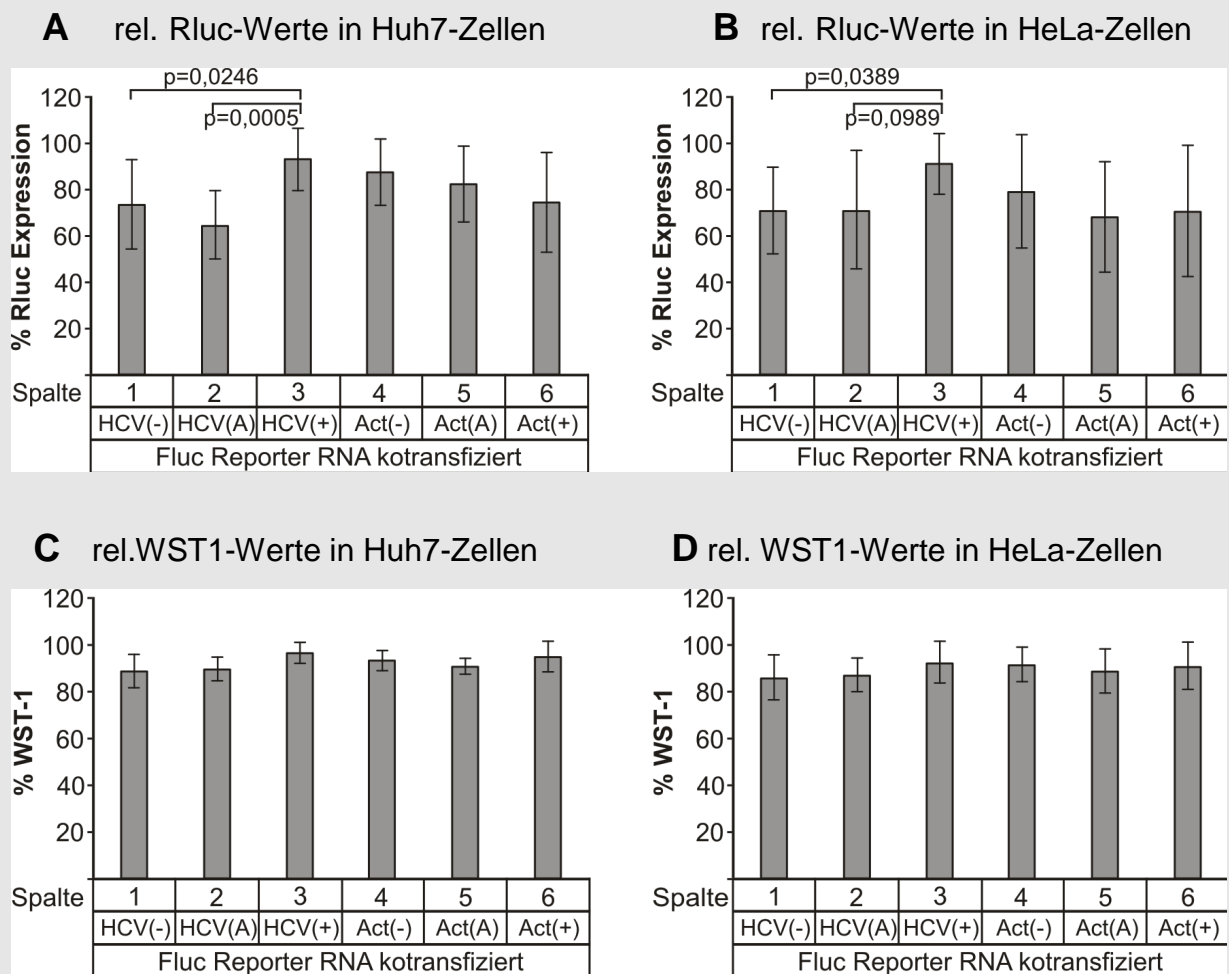
**Abbildung 3.17: Relative Stimulationen durch die HCV 3'-UTR mit oder ohne Renilla Luciferase-RNA Kotransfektion und die Abhängigkeit der Stimulationsergebnisse von unterschiedlichen Normalisierungsmethoden.** Graphische Auswertung der Daten der relativen Stimulation in Tabelle 5. (A) Stimulation der HCV 3'-UTR ohne kotransfiziertes Rluc-Reporter. Spalte 1 zeigt den Wert ohne Normalisierung, Spalte 2 nach der Normalisierung auf WST1. (B) Gleiches Experiment wie in A, allerdings mit Rluc-Kotransfektion. Zusätzlich ist in Spalte 3 die Normalisierung auf den kotransfiziertes Renilla Reporter gezeigt.

Die Auswertung der relativen Stimulationen durch die HCV 3'-UTR aus den Werten der Tabelle 5 zeigt eine deutliche Diskrepanz zwischen den Daten der kotransfiziertes und nicht-kotransfiziertes RNAs bzw. der Art der Normalisierung. Dabei zeigt sich bei der alleinigen Transfektion der Fluc-Reporter-Konstrukte ein nur geringer Unterschied in der relativen Stimulation von unnormalisierten und WST1-normalisierten Werten. Eine relative Stimulation von 4,5-fach wird ganz ohne Normalisierung der Rohdaten erreicht, bei zusätzlicher Auswertung der dazugehörigen WST1-Daten verändert sich der Wert nur leicht auf 4,2-fach. Bei gleichzeitiger Kotransfektion der gecappten und polyadenylierten Rluc-RNA sieht man im Gegensatz zu den nicht kotransfiziertes Konstrukten eine deutlich geringere Stimulation durch die HCV 3'-UTR. Diese liegt bei nur noch 3-fach, wenn keine Normalisierung der Rohdaten vorgenommen wird. Auch hier ergibt sich eine leichte Veränderung bei der Normalisierung der Daten auf den WST1-Test. Die relative Stimulation liegt danach bei nur noch 2,8-fach. Eine Normalisierung auf den kotransfiziertes Rluc-Reporter lässt die relative Stimulation sogar auf 2,5-fach fallen. Es zeigt sich also auch ein deutlicher Effekt auf die Endergebnisse, je nachdem, ob ein zweiter Reporter kotransfiziert wurde und auf welche Weise gegebenenfalls eine Normalisierung vorgenommen wird.

Eine Gesamtauswertung wie oben dargestellt aller getesteten Fluc-Konstrukte, in Huh7- und HeLa-Zellen ist graphisch in Abbildung 3.18 gezeigt. Hier werden die ermittelten relativen



Rluc Werte in Abhängigkeit des kotransfizierten Fluc-Konstrukts dargestellt. Zum Vergleich werden ebenfalls die relativen Werte des WST1-Tests gezeigt.



**Abbildung 3.18: Rluc und WST1-Werte bei Kotransfektion von Fluc und Rluc Reporter-RNAs in Huh7- und HeLa-Zellen.** Relative Rluc-Werte bei gleichzeitiger Kotransfektion mit den entsprechenden Firefly-RNAs in (A) Huh7-Zellen und (B) HeLa-Zellen. Relative WST1-Werte bei Kotransfektion von Rluc-RNAs und den entsprechenden Fluc-RNAs in (C) Huh7-Zellen und (D) HeLa-Zellen. Darstellt sind die Mittelwerte der 10 unabhängigen Experimente und deren Standardabweichungen. Die gezeigten p-Werte in (A) und (B) zeigen die mit Hilfe eines T-Tests ermittelten Werte. (Abbildung modifiziert nach Bung, Fehr et al., 2011, Manuskript eingereicht).

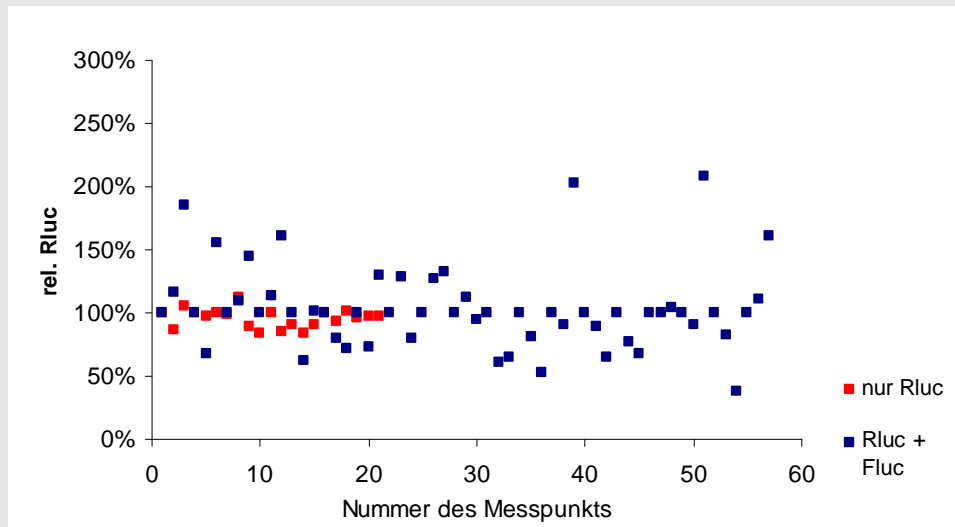
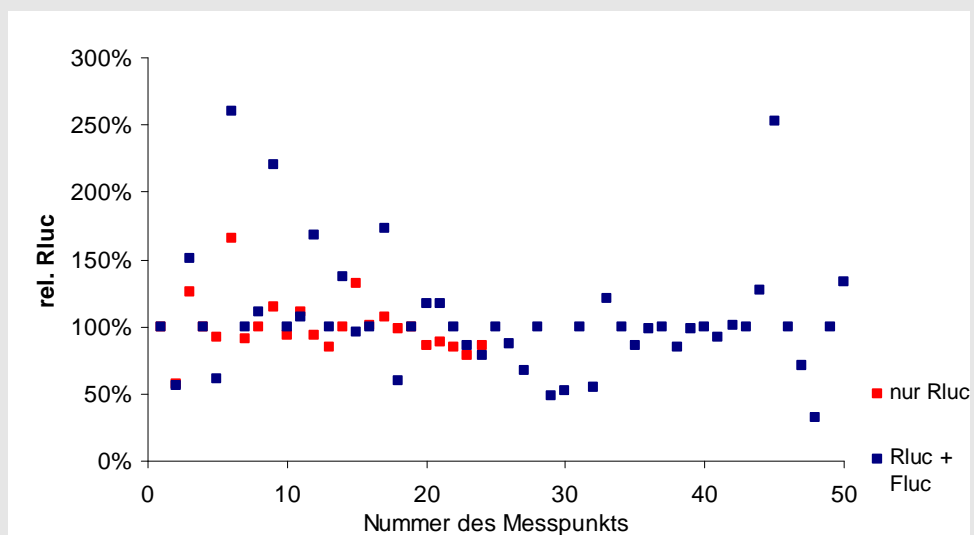
Betrachtet man die relativen Rluc-Werte in Abhängigkeit von kotransfizierten Fluc Reporter, fällt auf, dass im Falle der HCV IRES-Konstrukte die zugehörigen Rluc-Werte in Anwesenheit der HCV 3'-UTR höher ausfallen als bei den RNAs ohne HCV 3'-UTR beziehungsweise mit Poly(A)-Anhang. Dabei ist in Huh7-Zellen eine relative Renilla Luciferase Expression von 93 % in Anwesenheit der HCV 3'-UTR zu 73 % ohne HCV 3'-UTR und 65 % mit einem Poly(A)-Anhang zu sehen. Dieser Effekt ist allerdings mit den gecappten Actin-RNAs so nicht zu beobachten. Hier fällt die Expression des Renilla Reporters in Anwesenheit des Poly(A)-Anhangs oder der HCV 3'-UTR sogar leicht von 88 % auf 82 bzw. 75 %. Sehr ähnliche Werte und das gleiche Muster sind auch bei einer Transfektion in HeLa-

Zellen zu beobachten. Die mittels eines T-Tests berechneten p-Werte liegen alle niedriger als das Signifikanzniveau  $\alpha$  von 5%, so dass die ermittelten Unterschiede als signifikant zu betrachten sind.

Betrachtet man hingegen die dazugehörigen WST1-Werte (Abbildung 3.18 C und D), fällt auf, dass hier kein solches Muster zu finden ist. Die Werte liegen recht konstant und unabhängig von den transfizierten Reporter RNAs im Mittel bei relativen Werten zwischen 89 und 97 % in Huh7-Zellen und 86 bis 93 % in HeLa-Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass die Zelldichte und Wachstumsbedingungen der Zellen in einer Well-Platte ähnlich sind. Die geringen Schwankungen des WST1-Tests sind mit einer leichten Variation der Zellzahl zu erklären, die beim Verteilen der Zellen aus einer Zellkulturflasche in die einzelnen Wells der Platte am Vortag der Transfektion entstehen. Die gefundenen Schwankungen bei der Messung der beiden Reporterproteine sind nicht mit Schwankungen in der Zellzahl zu erklären.

Die hier dargestellten Graphen (Abbildung 3.18) zeigen also eine Veränderung der Expression des gecappten und polyadenylierten Renilla Luciferase-Reporters in Abhängigkeit der kotransfizierten Firefly-RNA. Hier scheinen vor allen Dingen die HCV IRES und HCV 3'-UTR beinhaltenden Konstrukte betroffen zu sein, was auf eine eventuelle Stimulation der Translation der Renilla-RNA durch die HCV 3'-UTR in trans hindeutet. Eine Unabhängigkeit in der Expression beider Reporter scheint hier nicht gegeben zu sein.

In der folgenden Abbildung 3.19 sind zur besseren Veranschaulichung der Schwankungsbandbreite die einzelnen Renilla Luciferase-Werte aus den durchgeführten Versuchsreihen als Punktediagramm dargestellt. Die rot markierten Punkte zeigen die Werte der Expression der Renilla Luciferase, die ohne die Kotransfektion einer der Firefly Reporter-RNAs ermittelt wurden, die blau markierten Punkte zeigen die Renilla-Werte, die in den kotransfizierten Ansätzen gemessen wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte zwischen den einzelnen Versuchsreihen werden nicht die gemessenen Absolutwerte in „light units“, sondern die relativen Renilla-Werte in % angegeben. Dabei wurde für jede einzelne Versuchsreihe ein bestimmter Wert als 100%-Wert angenommen und die anderen Messwerte auf diesen Wert bezogen normalisiert, so dass sich innerhalb einer Versuchsreihe eine gewisse Schwankungsbreite der Renilla-Werte um den 100%-Wert zu Stande kommt. Die einzelnen relativen Renilla Luciferase-Werte aller durchgeführten Versuchreihen können somit zusammengefasst in einer Graphik verglichen werden. Ebenso wurde mit den ermittelten WST1-Werten innerhalb der Versuchsreihen verfahren. Die Abbildungen 3.19 sowie 3.20 dienen der Veranschaulichung der Streuungsbreite aller gemessenen Renilla Luciferase-Werte beziehungsweise der WST1-Werte in Abhängigkeit zur Kotransfektion einer Fluc-Reporter RNA.

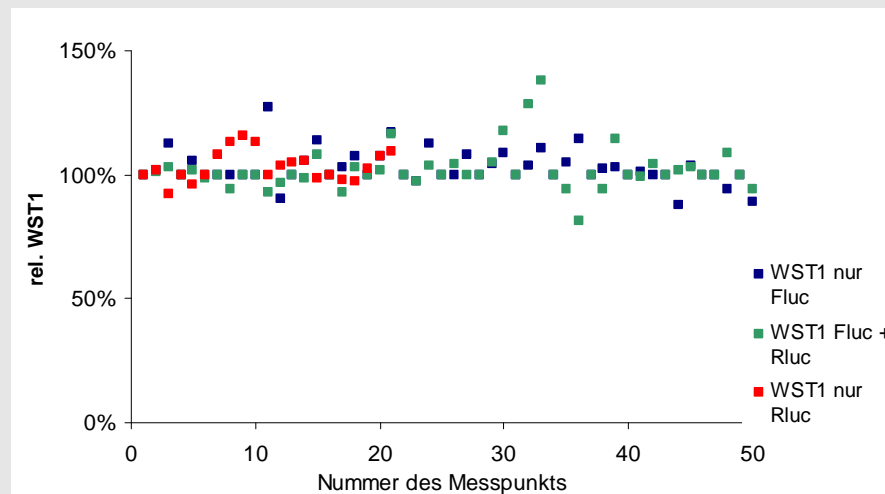
**A** Huh7-Zellen**B** HeLa-Zellen

**Abbildung 3.19: Schwankungen der Renilla Luciferase-Werte nach Transfektion mit und ohne Firefly-RNA in (A) Huh7- und (B) HeLa-Zellen.** Gezeigt werden die gemessenen relativen Renilla-Luciferase-Werte in %. Die roten Markierungen stehen für die Renilla Luciferase-Werte, die ohne Kotransfektion gemessen wurden, die blauen Markierungen zeigen die Renilla Luciferase-Werte mit Kotransfektion einer Firefly-Reporter-RNA.

Die graphische Darstellung der ermittelten relativen Renilla Luciferase-Werte in Abbildung 3.19 verdeutlicht die höhere Streuungsbreite der Renilla-Werte bei gleichzeitiger Fluc-Reporter RNA Kotransfektion im Vergleich zu Renilla-Werten ohne Kotransfektion. Dies ist sowohl in Huh7- als auch in HeLa-Zellen zu beobachten. Die Bandbreite der Streuung der Renilla Luciferase-Werte liegt in Huh7-Zellen für die Transfektion ohne kotransfizierten Firefly-Reporter zwischen 83 % und 112 %, mit Kotransfektion sehr viel höher zwischen 37

% und 207 %. In HeLa-Zellen zeigt sich eine Streuung der Rluc- Werte ohne Kotransfektion zwischen 78 % und 165 %, mit Kotransfektion zwischen 32 % und 260 %.

Um zu zeigen, dass die WST1-Werte dagegen unabhängig von Art der Transfektion nur wenig schwanken, werden im Folgenden die WST1-Werte der Transfektionen, die nur die Firefly-Reporter beziehungsweise die Renilla Reporter oder eine Kotransfektion beider Reporter RNAs enthalten, grafisch dargestellt.



**Abbildung 3.20: Schwankung der relativen WST1-Werte bei Transfektion von nur einem Reporter oder Kotransfektion beider Reporter in Huh7-Zellen.** Die relativen WST1-Werte der Transfektionen in denen nur Firefly-Reporter (blau) bzw. nur Renilla-Reporter (rot) oder beide Reporter (türkis) transfiziert wurden.

Bei der Betrachtung der WST1-Werte zeigt sich, dass diese nicht so starken Schwankungen unterliegen wie die Renilla-Werte. Daraus kann man schließen, dass sich die Zellviabilität nicht durch die Art der transfizierten Reporter-RNAs ändert. Die Schwankungen der ermittelten Renilla-Werte müssen also einen anderen Grund haben als die Anzahl und die Viabilität der Zellen in einem Transfektionsansatz.

In der Literatur finden sich einige Hinweise auf experimentelle Einflüsse kotransfizierter Reporter. Es konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass auf Transkriptionsebene unter bestimmten Bedingungen eine Beeinflussung des kotransfizierten Renilla-Reporters stattfindet, zum Beispiel durch Transkriptionsregulatoren (Thavathiru und Das, 2001; Huszar et al., 2001; Matuszyk et al., 2002; Mulholland et al., 2004). Ebenfalls konnte in einer Studie der Einfluss von zugegebenen Hormonen auf transfizierte Plasmide, die das Gen der Renilla Luciferase enthalten, gezeigt werden (Ibrahim et al., 2000). Auch mit anderen Plasmiden wie  $\beta$ -Galaktosidase-Plasmide, die oftmals als interne Normalisierungskontrolle in Experimenten eingesetzt werden, konnten Effekte durch kotransfizierte Plasmide nachgewiesen werden (Farr und Roman, 1992; Bergeron et al., 1995).

Die Normalisierung auf einen kotransfizierten Renilla Luciferase-Reporter wird hingegen in anderen Studien als eine weniger fehleranfällige Methode als die bisher in der quantitativen Real-Time PCR oft verwendete Normalisierung auf ein internes chromosomal kodiertes Gen beschrieben (Jiwaji et al., 2010). Hier scheint die Expression der Renilla Luciferase von allen betrachteten Parametern am wenigsten anfällig für Schwankungen zu sein. Allerdings beziehen sich all diese Studien in der Literatur nicht auf Transfektionen von RNA, um die Effizienz der Translation in der Zelle zu messen, sondern hier wurden ausschließlich DNA Plasmide, die die Reportergene kodieren, transient in die Zelllinien transfiziert, um die Vorgänge auf Transkriptionsebene zu untersuchen. Hierbei wurden Veränderungen in der Expression des Reporters beispielsweise von Kulturbedingungen und die Aktivität von Effektorgenen auf die Effizienz der Promotoren erklärt (Vesuna et al., 2005).

In all diesen Veröffentlichungen wird darauf hingewiesen, dass sich durch eine Normalisierung auf einen nicht-unabhängigen Reporter systematische Fehler einschleichen, die zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen können. Deshalb ist es von Bedeutung, die Unabhängigkeit des Normalisierungsreporters als interne Kontrolle zu garantieren, und diese Parameter müssen individuell für den jeweiligen Versuchsaufbau bestimmt werden.

In diesen in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchsreihen wurde die Expression der Fluc- und Rluc-Reporter RNAs bei einer lipid-vermittelten Kotransfektion in Zelllinien bestimmt. Dabei konnte eine gegenseitige Beeinflussung der Reporter-RNAs festgestellt werden, so dass hier eine Unabhängigkeit der beiden Reporter nicht gegeben zu sein scheint. Die Anwesenheit der HCV 3'-UTR in der Fluc-Reporter-RNA beeinflusst positiv die Expression der gecappten und polyadenylierten Rluc-RNA, aber auch die Anwesenheit dieser Rluc-RNA erhöht die Expression des Fluc-Reporters ohne HCV 3'-UTR.

Mögliche experimentelle Fehlerquellen wurden so weit wie möglich ausgeschlossen. Dazu gehört beispielsweise das Pipettieren der Renilla-RNA in einen Mastermix, so dass eine weitgehend gleiche Verteilung der RNA in den verschiedenen Ansätzen gegeben sein sollte. Um weitere systematische Fehler auszuschließen, wurde außerdem die zu transfizierenden RNAs für die unterschiedlichen Versuchstage neu synthetisiert und ihre Konzentrationen und Unversehrtheit jeweils mit Hilfe eines Agarose-Gels bestimmt. Auch beim Aussäen der Zellen in die Vertiefungen der 24-Well-Platte wurden diese per Zufallsprinzip pipettiert und nicht immer in der gleichen Reihenfolge. Dass keine großen Unterschiede in der Zellzahl zwischen den einzelnen Wells bestanden, wurde sowohl durch den optischen Eindruck unter dem Mikroskop als auch durch die geringen Schwankungen der WST1-Werte innerhalb einer Versuchsreihe bestätigt. Auch ein Effekt der Lage der Wells innerhalb der 24-Well Platte, beispielsweise durch die Entfernung der jeweiligen Vertiefung vom Plattenrand, konnte nicht beobachtet werden.

Da für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente die Unabhängigkeit der Expression der beiden kotransfizierten Reporter nicht gegeben ist, wurden nach diesem Zeitpunkt keine Renilla Kotransfektionen mehr durchgeführt, um Beeinflussungen der Translationen der Reporter RNAs in trans und daraus resultierende Fehlinterpretationen der Messergebnisse durch Falsch-Normalisierungen zu vermeiden. Um zumindest die Zellviabilität als Faktor zu berücksichtigen, wurde eine Normalisierung der Firefly Luciferase-Werte ausschließlich auf den WST1-Test durchgeführt. Diese Art der Normalisierung ausschließlich auf die Zellviabilität ist sicherlich eine bislang nicht weit verbreitete Methode und nicht frei von möglichen Kritikpunkten wie fehlende Bestimmung der Transfektionseffizienz oder Effizienz der Zellyse. Die Daten zeigen allerdings, dass die üblicherweise angewendete Normalisierung auf einen kotransfizierten Reporter eben nicht nur die Parameter wie Anzahl der transfizierten Zellen und die Transfektionseffizienz misst, sondern auch anfällig ist für unerwünschte gegenseitige Beeinflussung der beiden kotransfizierten Reporter-RNAs in trans.

### 3.3 Einfluss des Zellzyklus auf die Stimulation der Translation

Die Effizienz der Translation von RNAs in der Zelle wird unter Anderem auch durch den Zellzyklus reguliert. Der Zellzyklus lässt sich grob in die Mitosephase (M-Phase), in der die eigentliche Zellteilung stattfindet, und die Interphase, eine Wachstumsphase einteilen. Die Interphase lässt sich weiterhin in die G<sub>1</sub>-Phase, die Synthesephase (S-Phase) und die G<sub>2</sub>-Phase differenzieren. Die so genannte G<sub>0</sub>-Phase bezeichnet die zelluläre Ruhephase, in die die Zellen als Alternative zur G<sub>1</sub>-Phase eintreten können.

Sowohl auf die Translation von gecappten mRNAs als auch für IRES-haltige RNAs wurde ein Einfluss des Stadium der Zelle innerhalb des Zellzyklus gefunden. Hier wurden beispielsweise die Aktivität von IRES-Elementen in Abhängigkeit von der jeweiligen Zellzyklus-Phase untersucht. Auch für die HCV IRES konnte dabei ein Effekt des jeweiligen Zellzyklus-Stadiums auf ihre Translationsaktivität gezeigt werden (Honda et al., 2000; Venkatesan et al., 2003).

Durch die hier gezeigten Versuchsreihen sollte geklärt werden, ob nicht nur die allgemeine Translationseffizienz, sondern auch die vorher beobachtete Stimulation der Translation durch die HCV 3'-UTR bzw. den Poly(A)-Anhang von der Zellzyklus-Phase abhängig ist.

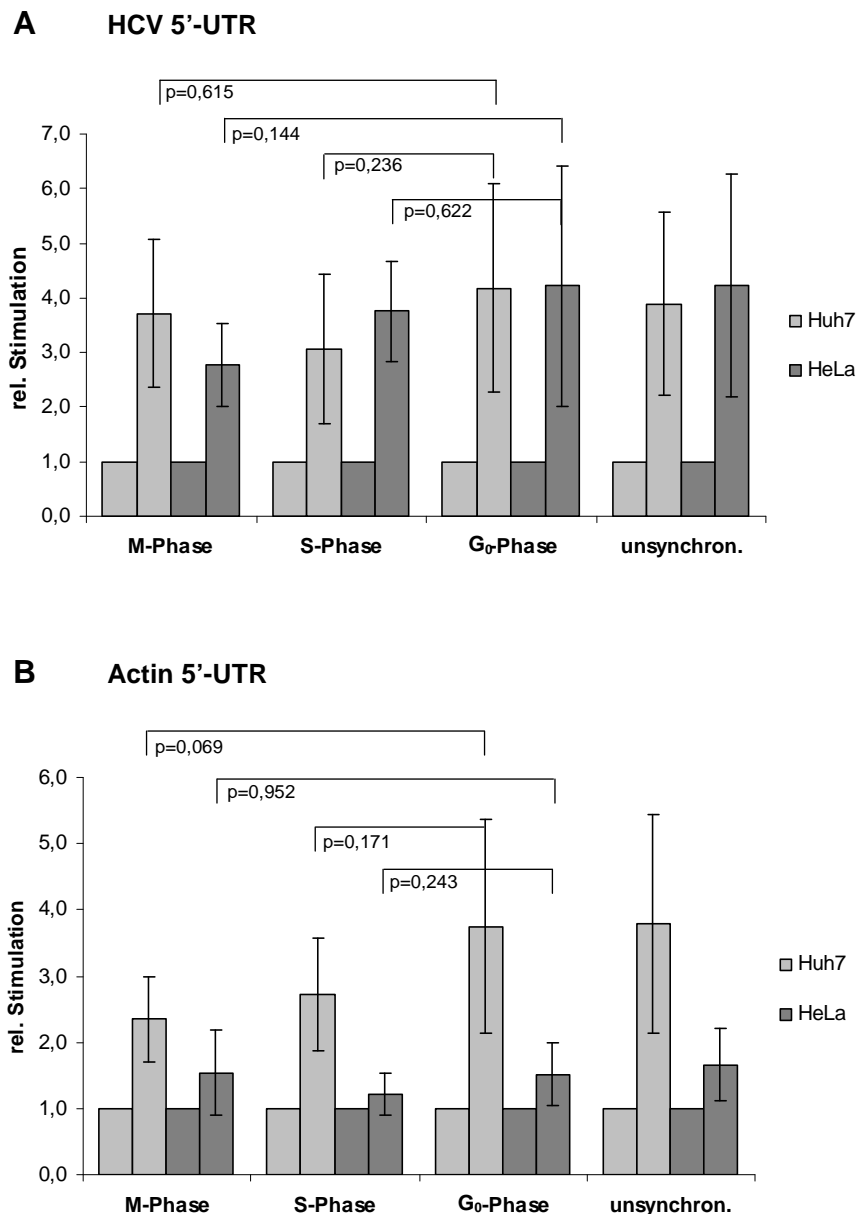
#### 3.3.1 Die Stimulation der Translation durch die HCV 3'-UTR wird durch den Zellzyklus nicht beeinflusst

Zunächst wurde der Effekt der Translationsstimulation durch die HCV 3'-UTR sowohl auf die cap- als auch die IRES-abhängige Translation im Verlauf des Zellzyklus bestimmt.

Dazu wurden neben Huh7- auch HeLa-Zellen in die verschiedenen Phasen des Zellzyklus gebracht. Dies geschah wie im Methodenteil beschrieben (Kapitel 2.3.6) mit Hilfe von

Nocodazol, Thymidin und gezieltem Abklopfen der Zellen beziehungsweise dem Wachstum der Zellen in der Kulturflasche bis zur 100 %iger Konfluenz. Als Vergleich wurden Zellen, die nicht synchronisiert wurden, also eine Misch-Population an Zellen, getestet.

Die Reporter RNAs wurden auch hier mit Hilfe von Lipofektion in die synchronisierten Zellen und als Kontrolle am gleichen Tag in die nicht-synchronisierten Zellen transfiziert. Im Folgenden dargestellt sind die relativen Stimulationswerte der Translation durch die HCV 3'-UTR während der verschiedenen Zellzyklusphasen.



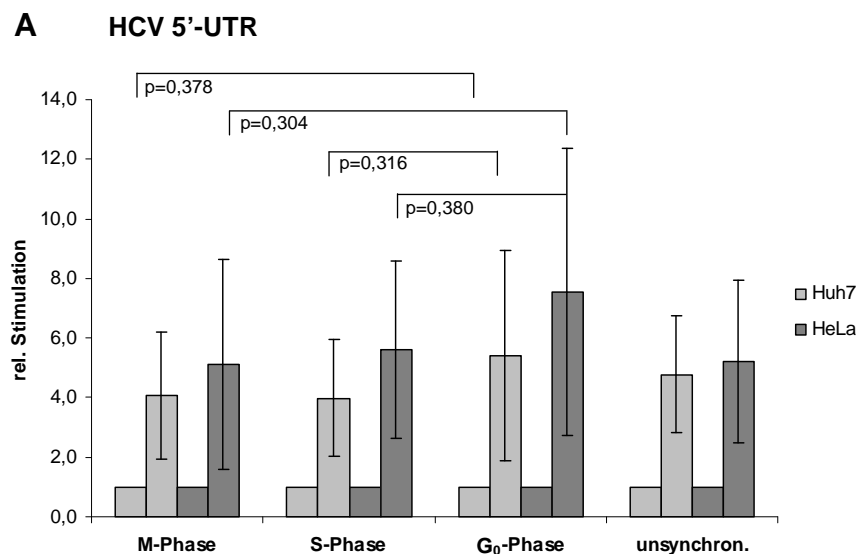
**Abbildung 3.21: Stimulation der Translation durch die HCV 3'-UTR in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus.** (A) Stimulation der HCV IRES durch die HCV 3'-UTR. Anzahl der durchgeführten Experimente = 7 (B) Stimulation der gecappten Actin-RNAs durch die HCV 3'-UTR in Huh7- und HeLa-Zellen. Die gezeigten p-Werte wurden mit Hilfe eines T-Tests ermittelt. Anzahl der durchgeführten Experimente = 6.

Im Vergleich zu den unsynchronisierten Zellen zeigt die Arretierung der Zelllinien in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus nach Transfektion der Reporter RNAs keine höhere Stimulierbarkeit der Translation durch die HCV 3'-UTR. Dies ist sowohl in den Hepatom- als auch in den Nichthepatomzellen der Fall. Die Stimulation der Translation der HCV Reporter-RNAs in den Zellen, die sich in der G<sub>0</sub>-Phase befinden, ist im Vergleich zu den Messungen in asynchron wachsenden Zellen nicht verändert, diese lag bei der HCV IRES abhängigen Translation bei knapp 4-fach in Huh7- und HeLa-Zellen. Ein leichter Rückgang der Stimulation der HCV IRES im Vergleich zu unsynchronisierten Zellen ist für die Huh7-Zellen nur in der S-Phase und für HeLa-Zellen in der M-Phase zu sehen. Hier betragen die ermittelten Stimulationen nur 3-fach (siehe Abbildung 3.21 A).

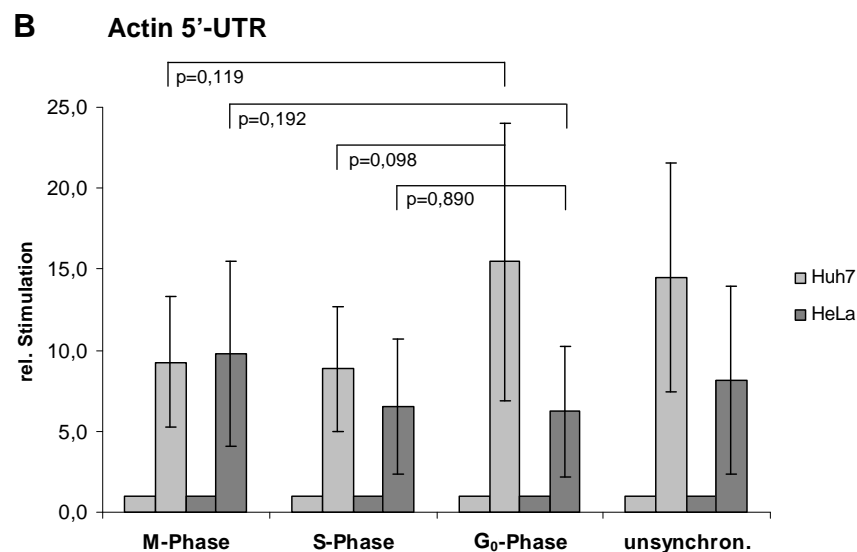
Die gecappte Actin-RNA wird hier in Huh7-Zellen ebenfalls ungefähr 4-fach durch die HCV 3'-UTR stimuliert, in HeLa-Zellen ca. 1,5-fach. In Huh7-Zellen findet man ebenfalls in der M- und S-Phase einen leichten Rückgang der Stimulation auf 2,5- bzw. 3-fach, in HeLa-Zellen ist der Rückgang nur ganz leicht auf 1,2-fach in der S-Phase zu sehen (siehe Abbildung 3.21 B). Es findet also in keiner der getesteten Zellzyklusphasen eine veränderte Stimulation durch die HCV 3'-UTR im Vergleich zu den unsynchronisierten Zellen statt.

#### 3.3.2 Die Translationsstimulation durch einen Poly(A)-Anhang wird im Zellzyklus nicht verändert

Auch die Reporter-RNAs, die neben der HCV IRES beziehungsweise der gecappten Actin 5'-UTR einen 50(A)-Anhang besitzen, wurden in die Zellen der M-, S-, oder G<sub>0</sub>-Phase transfiziert, um zu testen, ob die Stimulation durch den Poly(A)-Anhang in einer bestimmten Phase des Zellzyklus erhöht ist. Auch hier diente als Vergleich eine Mischkultur aus unsynchronisierten Zellen.







**Abbildung 3.22: Stimulation der Translation durch einen Poly(A)-Anhang von 50 A in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus.** (A) Stimulation der HCV IRES durch den Poly(A)-Anhang. (B) Stimulation der gecappten Actin-RNAs durch den Poly(A)-Anhang in Huh7- und HeLa-Zellen. Die gezeigten p-Werte wurden mit Hilfe eines T-Tests ermittelt.

Wenn man sich die Wirkung des 50(A)-Anhangs auf die Stimulation der IRES-abhängigen und cap-abhängigen Translation im Verlauf des Zellzyklus anschaut, sieht man, dass der Effekt des Poly(A)-Anhangs auf die HCV IRES wieder kaum eine Veränderung im Verlauf des Zellzyklus zeigt (siehe Abbildung 3.22 A). Die Stimulation in Huh7-Zellen liegt in allen Zellzyklusphasen zwischen ca. 4 und 5,4-fach, wobei die höchste Wert, in der G<sub>0</sub>-Phase auftritt, auch eine höhere Standardabweichung aufweist. Die ermittelten Werte in HeLa-Zellen zeigen in unsynchronisierten Zellen sowie in der S- und M-Phase eine ca. 5-fach Stimulation durch den Poly(A)-Anhang. Eine leichte Erhöhung des Wertes zeigt auch hier die G<sub>0</sub>-Phase mit einer 7,5-fachen Stimulation mit einer recht hohen Standardabweichung.

Die Stimulierbarkeit der gecappten RNA durch die 50 A am 3'-Ende wird in Abbildung 3.22 B dargestellt. In Huh7-Zellen zeigt sich auch hier ein ähnlicher Wert für die unsynchronisierten Zellen und die G<sub>0</sub>-Phase Zellen. Hier beträgt die Stimulation ca. 15-fach. Die Werte von M- und S-Phase sind auch hier etwas niedriger und liegen beide bei ungefähr 9-fach. In HeLa-Zellen beträgt die Poly(A)-Stimulation in nicht-synchronisierten und in M-Phase Zellen ebenfalls ungefähr 9-fach, niedrigere Werte sind in der S- und G<sub>0</sub>-Phase mit jeweils 6-fach zu beobachten. Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Stimulation der Translation durch einen Poly(A)-Anhang, genauso wie die Stimulation durch die HCV 3'-UTR, nicht abhängig von der Zellzyklusphase ist.

### Diskussion

Allgemeine Studien zur Translation im Verlauf des Zellzyklus zeigen zum Teil sehr unterschiedliche Resultate, sowohl für die cap- als auch die IRES-abhängige Translation. Für

die cap-abhängige Translation wurde in einer Studie keine Änderung der Translation zwischen den verschiedenen Phasen gefunden (Honda et al., 1999), in einer anderen Studie wurde eine Beeinträchtigung dieser in der M-Phase gefunden (Bonneau und Sonenberg, 1987; Pyronnet et al., 2001). Ein Einfluss der Zellzyklus-Phase auf die IRES-vermittelte Translation wird in der Literatur ebenfalls kontrovers diskutiert, dies gilt sowohl für zelluläre als auch virale IRES-Elemente. Einige Studien zeigen hier eine erhöhte Effizienz der Translation in der G<sub>2</sub>/M-Phase (z.B. Pyronnet et al., 2000; Honda et al. 2000), andere zeigen in dieser Phase sogar die niedrigste Aktivität (Venkatesan et al., 2003). Diese Unterschiede zwischen den Studienergebnissen bezieht sich auch auf die Aktivität der Translation von HCV im Verlauf des Zellzyklus.

Die hier untersuchte Stimulation der Translation sowohl durch die HCV 3'-UTR als auch durch den Poly(A)-Schwanz in den einzelnen Zellzyklusphasen zeigt, dass zwischen den einzelnen Phasen keine signifikanten Unterschiede zu finden sind. Die Stimulation der Translation durch die 3'-Enden der Reporter RNAs findet also in jeder Phase in etwa gleich effektiv statt. Damit scheint einer in den vorherigen Studien gefundene erhöhte Proteinexpression in einer bestimmten Zellzyklusphase keine erhöhte Stimulation durch das 3'-Ende der RNA zu Grunde zu liegen.

#### **Fazit**

Die Stimulation der IRES-abhängigen und der cap-abhängigen Translation durch die HCV 3'-UTR oder einen Poly(A)-Anhang am 3'-Ende der RNA zeigt keine erhöhten Werte während der einzelnen Zellzyklusphasen im Vergleich zu unsynchronisierten Zellen. Die Stimulation ist also unabhängig vom Zellzyklus, und eine erhöhte Proteinexpression, die häufig in einzelnen Phasen des Zellzyklus zu finden ist, scheint nicht aufgrund einer erhöhten Stimulation der Translation durch das 3'-Ende der RNA zu entstehen.

#### **3.4 Einfluss der Länge des Poly(A)-Anhangs auf die Translationsstimulation**

In den oben gezeigten Versuchsreihen (siehe Kapitel 3.2) wurde eine Länge von 50 A als Poly(A)-Anhang gewählt, um den Effekt des Poly(A)-Anhangs auf die cap- und IRES-abhängige Translation zu untersuchen. Dies war vor allen Dingen aus experimentellen Gründen der Fall. Um eine Vergleichbarkeit der Stimulation durch einen Poly(A)-Anhang zwischen den Experimenten zu gewährleisten, sollte die Länge des Poly(A)-Endes in allen Ansätzen exakt gleich sein und keinen großen Schwankungen unterliegen.

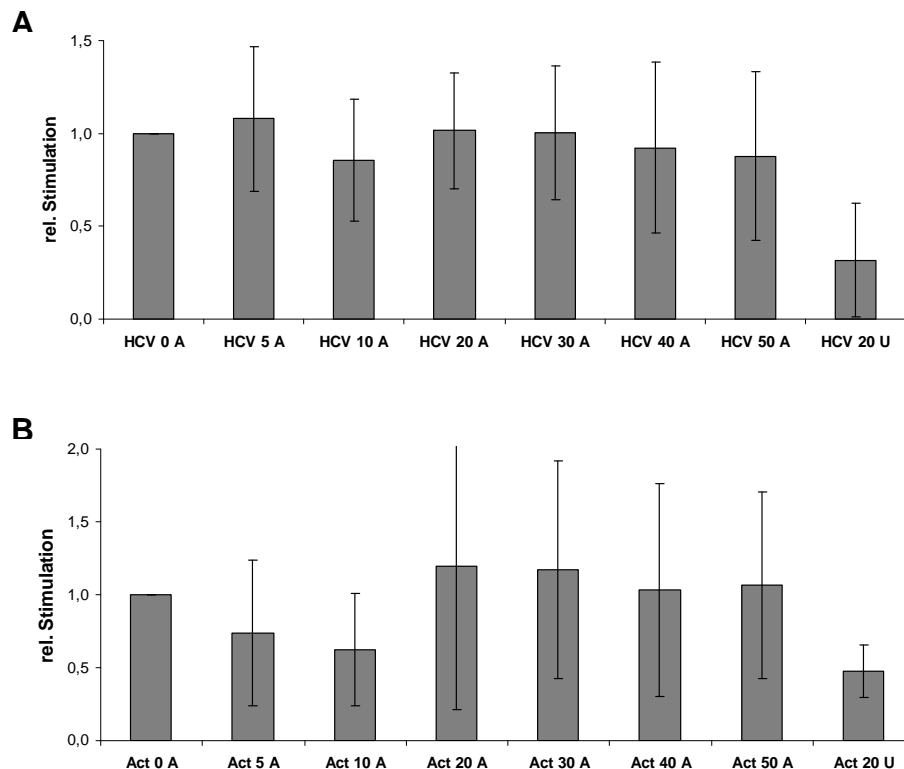
Methodisch gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten der Polyadenylierung einer RNA *in vitro*. Zum einen kann während der PCR mit Hilfe eines Oligonukleotids, welches eine bestimmte Anzahl an Thyminresten am 5'-Ende enthält, dem DNA Template für die *in vitro*-Transkription ein Poly(T)-Schwanz angehängt werden. Dieser Bereich wird dann während der Transkription für die RNA zu einem Poly(A)-Anhang umgeschrieben. Jedoch kann diese Methode der Polyadenylierung nur für das Anhängen von relativ kleinen Poly(A)-Enden,

beispielsweise 50 A, genutzt werden, da bei längeren Poly(T)-Überhängen im Primer die PCR gestört wird. Vorteilhaft bei dieser Methode ist jedoch, dass hier durch den Primer die Menge an angehängten Adeninen exakt gewählt werden kann und somit eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchsreihen gewährleistet wird. Eine andere Methode zur Polyadenylierung ist der Einsatz eines Enzyms, der Poly(A)-Polymerase. Dieses Enzym kann einer *in vitro*-transkribierten RNA mit Hilfe von rATP Poly(A)-Schwänze am 3'-Ende anhängen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass hier auch längere Poly(A)-Anhänge entstehen können, die bis zu mehreren tausend Adenine enthalten. Nachteilig ist jedoch, dass die Länge der Poly(A)-Anhangs nicht exakt vorhersagbar ist, da diese abhängig ist von der Inkubationszeit des Enzyms und auch von der eingesetzten Menge an RNA, da niedriger konzentriert eingesetzte RNA bei gleicher Inkubationszeit längere Poly(A)-Anhänge bekommt als bei höheren RNA-Konzentrationen. Die Bestimmung der Poly(A)-Länge erfolgt nach der Polyadenylierung auf einem höherprozentigen (2%) Agarosegel, indem nicht-polyadenylierte und polyadenylierte RNAs nebeneinander aufgetragen werden. Um eine möglichst genaue Längenbestimmung durchzuführen, wurden die Längenunterschiede der RNAs per PC mit Hilfe der Bemaßungsfunktion in CorelDraw bestimmt. Da die Abmessungen der Banden jedoch nie 100 %ig exakt sein können, sondern zum Teil auch subjektiven Eindrücken unterliegen, kann die Bestimmung der Poly(A)-Länge wie durch die PCR-Methode gegeben hierbei nicht so genau erfolgen.

Obwohl die Auswertung der Experimente zur Stimulation der Translation durch den Poly(A)-Anhang von 50 A einen sehr deutlich stimulatorischen Effekt, je nach verwendetem Konstrukt von 2 – 6-fach zeigt, stellt sich trotzdem die Frage, inwiefern die Poly(A)-Länge diese Stimulation quantitativ beeinflusst.

Um systematisch zu testen, welchen Effekt die Länge des Poly(A)-Endes auf die Translation, sowohl cap- als auch IRES-abhängig hat, wurden die RNAs mit Hilfe der beiden oben beschriebenen Methoden der Polyadenylierung mit unterschiedlich langen Poly(A)-Anhängen versehen. Die Länge der durch PCR hergestellten Poly(A)-Anhänge beträgt zwischen 5 und 50 A, längere Anhänge von ungefähr 80 bis zu etwa 1000 A wurden durch den Einsatz der Poly(A)-Polymerase erreicht.

Zunächst wurde der Effekt der kurzen Poly(A)-Enden auf die HCV IRES- und die cap-abhängige Translation *in vitro* getestet. Dazu wurden gleiche Mengen der transkribierten Reporter RNAs mit unterschiedlichen Poly(A)-Längen im Kaninchen-Retikulozyten-Lysat eingesetzt. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden die Reaktionen gestoppt und die Luciferase-Aktivität gemessen. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein Poly(U)-Anhang von 20 Nukleotiden am 3'-Ende der RNA eingesetzt.



**Abbildung 3.23: Effekt der kurzen Poly(A)-Anhänge auf die *in vitro*-Translation in RRL.** Effekt der Poly(A)-Anhänge von 5 – 50 A auf die HCV IRES (A) beziehungsweise die gecappten Actin-RNAs (B) im Vergleich zu nicht-polyadenylierter RNA (0 A) im Retikulozytenlysat. Als Kontrolle wurde eine RNA mit einem Poly(U)-Anhang von 20 Nukleotiden verwendet.

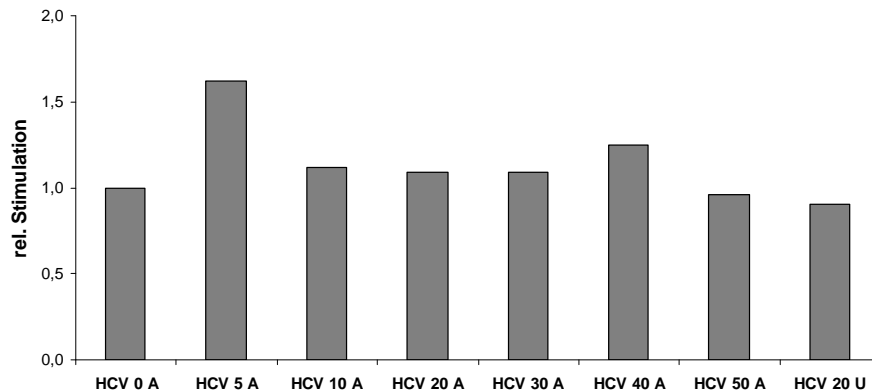
In der *in vitro*-Translation in RRL zeigen die Poly(A)-Enden mit einer Länge von 5 – 50 A im Vergleich zu den nicht-polyadenylierten RNAs keinen stimulierenden Effekt (siehe Abbildung 3.23). Dies gilt sowohl für die IRES-enhaltenen RNAs (Abbildung 3.23 A) als auch für die gecappten Actin-Konstrukte (Abbildung 3.23 B). Die gecappten RNAs zeigten allerdings stark schwankende Werte zwischen den Messreihen, so dass hier höhere Standardabweichungen errechnet wurden. Bei beiden Reporter-RNAs, die einen Anhang von 50 U am 3'-Ende besitzen, ist dagegen eine Inhibition von bis zu 2/3 zu messen.

Die hier gewonnenen Daten bestätigen die vorherigen *in vitro*-Experimente im RRL, in denen ebenfalls kein Effekt der 50 A auf die Translation zu messen war (vergleiche Abbildung 3.15).

Neben dem Retikulozytenlysat stand ein weiteres translationskompetentes Lysat zur Verfügung. Das auf humanen Zellen basierende *in vitro*-System von Thermo Scientific Pierce beinhaltet laut Aussage der Herstellerfirma unter anderem einen Extrakt aus HeLa-Zellen. Somit könnten die Mechanismen in diesem *in vitro*-System denen in den meisten Zellen ähnlicher sein als dies im Kaninchen-Retikulozyten-Lysat der Fall ist.

Um zu testen, ob eine Stimulation der Translation durch einen Poly(A)-Anhang im diesem human-basierten System von Thermo Scientific zu sehen ist, wurden die Reporterstrukture

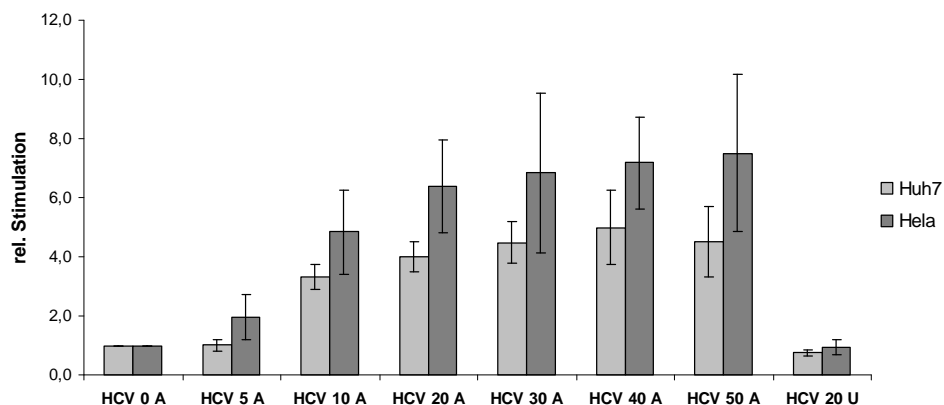
mit den kurzen Poly(A)-Anhängen wie vom Hersteller beschrieben in diesem Lysat eingesetzt. Die Inkubation erfolgte hier im Gegensatz zum RRL allerdings für 60 Minuten und damit etwas länger als im RRL. Diese Zeit wurde vom Hersteller vorgegeben.



**Abbildung 3.24: Effekt der kurzen Poly(A)-Enden auf die *in vitro*-Translation im Thermo Scientific Pierce System.** Effekt der Poly(A)-Anhänge von 5 – 50 A auf die HCV IRES im Vergleich zu nicht-polyadenylierter RNA in Zelllysat, welches auf humanen HeLa-Zellen basiert. Als Kontrolle wurde auch hier eine RNA mit einem Poly(U)-Anhang von 20 Nukleotiden verwendet.

Auch in diesem translationskompetenten Zelllysat konnte keine Stimulation durch den Poly(A)-Anhang auf die HCV IRES-abhängige Translation gesehen werden. Im Gegensatz zu den in RRL erzielten Resultaten ist hier allerdings keine Inhibition beim Anhängen des Poly(U)-Endes zu sehen. Die gecappten Actin-RNAs zeigten in diesem Lysat seltsamerweise gar keine Translationsaktivität und sind deshalb hier nicht dargestellt.

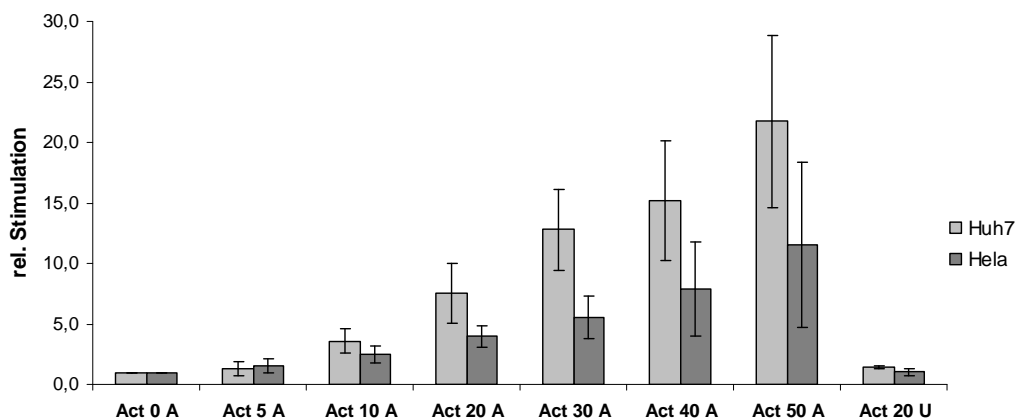
Als nächstes soll der Effekt der kurzen Poly(A)-Schwänze auf die HCV IRES-abhängige Translation *in vivo* gezeigt werden. Dazu werden die RNAs mit 0 - 50 A beziehungsweise 20 U in Huh7- und HeLa-Zellen transfiziert.



**Abbildung 3.25: Stimulation der IRES-abhängigen Translation durch verschiedene Poly(A)-Längen in Huh7- und HeLa-Zellen.** Die HCV IRES Reporterkonstrukte mit Poly(A)-Längen von 0 - 50A beziehungsweise 20 U als Kontrolle werden in Huh7- und HeLa-Zellen transfiziert und die Reporteraktivität nach 4 Stunden gemessen.

Im Gegensatz zur *in vitro*-Translation zeigt sich nach der Transfektion der Reporter-RNAs in Zellen eine deutliche Stimulation der HCV IRES durch den Poly(A)-Anhang. Schon bei einem sehr kurzen Poly(A)-Enden von nur 10 A ist in beiden Zelllinien eine deutliche Stimulation zu messen. Diese beträgt in Huh7-Zellen ca. 3,5-fach und in HeLa-Zellen sogar fast 5-fach. Ein kürzerer Anhang von nur 5 A zeigt keine Stimulation in Huh7-Zellen und geringe 2-fache in HeLa-Zellen. Die Erhöhung der Poly(A)-Länge in 10-Nukleotid-Schritten zeigt allerdings schon ab 20 A nur noch eine geringe weitere Steigerung der Stimulation. Die Kontrolle durch die RNA dem 20(U)-Anhang zeigt keine Stimulation.

Auch die gepapten Actin-Konstrukte mit kurzen Poly(A)-Anhängen werden *in vivo* in gleicher Weise getestet.

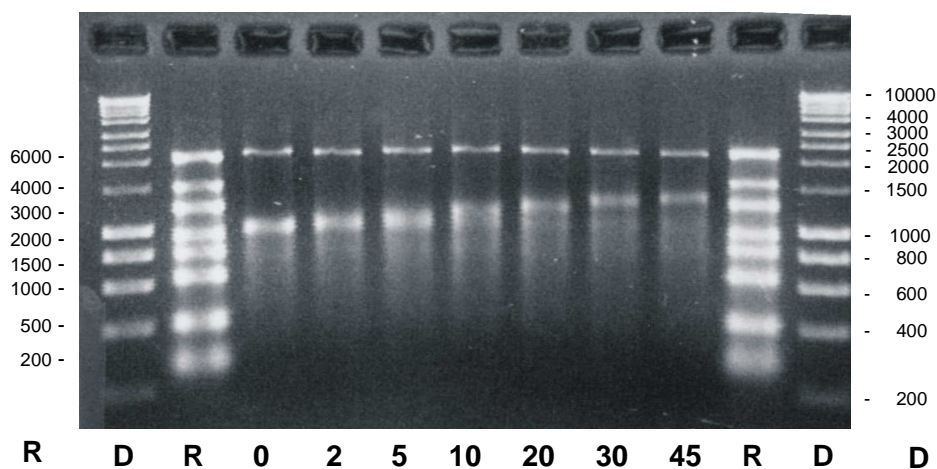


**Abbildung 3.26: Stimulation der cap-abhängigen Translation durch verschiedene Poly(A)-Längen in Huh7- und HeLa-Zellen.** Die gepapten Actin-Reporterkonstrukte mit Poly(A)-Längen von 0 - 50A beziehungsweise 20 U als Kontrolle werden in Huh7- und HeLa-Zellen transfiziert und die Reporteraktivität gemessen.

Die Stimulation der cap-abhängigen Translation durch die Poly(A)-Anhänge von 10 – 50 A ist auch hier in beiden Zelllinien zu sehen. Ebenso wie bei der HCV IRES ist bei dem Poly(A)-Ende mit 5 A auch hier nur ein sehr geringer stimulatorischer Effekt von 1,3-fach bzw. 1,5-fach zu sehen. Eine deutliche Steigerung ist ab einer Länge von 10 A zu beobachten. Allerdings zeigt sich bei der cap-abhängigen Translation eine weitere Steigerung der Stimulation durch das Anhängen von jeweils 10 weiteren Adenosinen, so dass bei der Poly(A)-Schwanz Länge von 50 A eine Gesamtstimulation von fast 22-fach in Huh7-Zellen und von fast 12-fach in HeLa-Zellen zu beobachten ist. Hier ist also vermutlich das Plateau der Stimulation mit dem Anhängen von 50 A noch nicht erreicht, wohingegen bei der HCV IRES abhängigen Translation das Plateau schon bei 30 A erreicht wurde und die Erweiterung des Poly(A)-Anhangs um 10 weitere A keinen großen Effekt zeigte. Auch in diesem Versuch zeigte das Anhängen von 20 U an das 3'-Ende der RNA erwartungsgemäß keinen stimulatorischen Effekt.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Um zu untersuchen, ob eine weitere Stimulation der Translation durch längere Poly(A)-Anhänge erreicht werden kann, wurden polyadenylierte Reporterkonstrukte mit Hilfe der Poly(A)-Polymerase hergestellt. Durch den Einsatz dieses Enzym werden die Reporter-RNAs mit HCV IRES und gecappter Actin 5'-UTR am 3'-Ende polyadenyliert. Die Länge des Poly(A)-Endes hängt dabei sowohl von der eingesetzten Menge an RNA als auch von der Menge an Enzym und der Inkubationszeit ab. Um verschieden lange Poly(A)-Anhänge zu produzieren, wurden die Enzymreaktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Hitzeinaktivierung gestoppt. Die RNAs wurden zur Längenbestimmung auf einem 1,5 – 2 % igen Agarosegel aufgetrennt. Ein Beispiel für ein solches Gel mit RNAs, die unterschiedlich lange polyadenyliert wurden, ist in Abbildung 3.27 zu sehen.

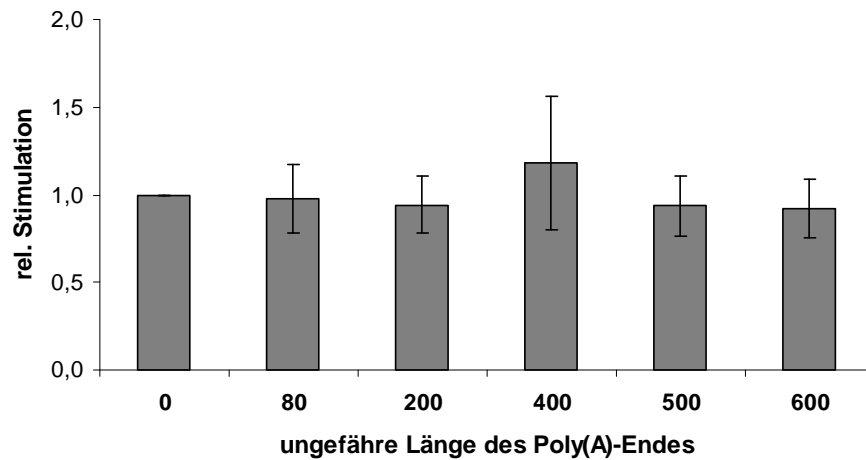


**Abbildung 3.27: Beispiel für ein 1,5 %iges Agarosegel mit gecappten Actin-RNAs mit unterschiedlich langen Poly(A)-Anhängen.** Die gezeigten RNAs wurden zwischen 0 und 45 min mit Hilfe der Poly(A)-Polymerase polyadenyliert. D = DNA Marker, R = RNA Marker; die Zahlen stehen für die Inkubationszeit der Polyadenylierungsreaktionen in Minuten. Zur übersichtlicheren Darstellung des DNA-Markers sind nicht alle Bandengrößen angegeben.

Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Längen der Poly(A)-Anhänge bei jeder neuen Polyadenylierungsreaktion variieren und somit zu jeder Versuchsreihe eine erneute Längenbestimmung durchgeführt werden muss. Außerdem ist die Längenabschätzung trotz der Bemaßung per PC subjektiv und nie ganz exakt, da die Bestimmung der Position der Banden auf dem Gel wegen der Breite der Banden und der geringen Genauigkeit der Messung mit Fehlern behaftet ist.

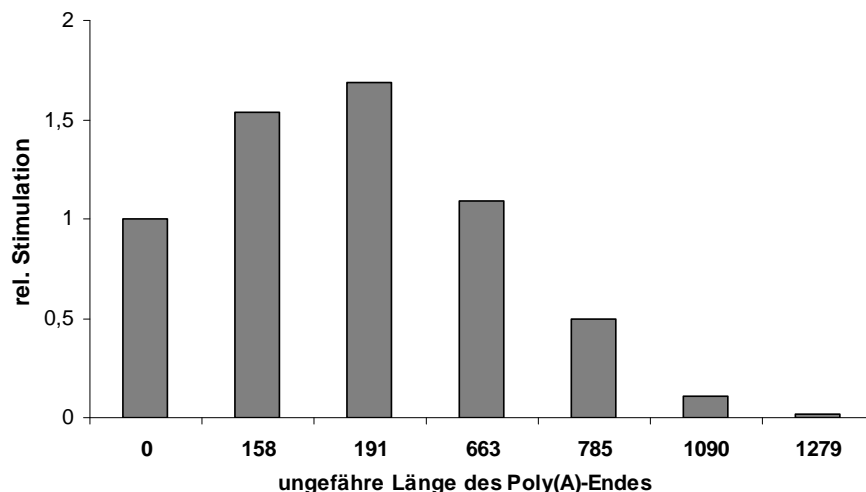
Die Reporter-RNAs mit HCV IRES beziehungsweise gecappter Actin 5'-UTR und den längeren mit Enzym polyadenylierten 3'-Enden wurden zunächst in der *in vitro*-Translation im Retikulozytenlysat getestet. Kurze Poly(A)-Anhänge von bis zu 50 A hatten zuvor keinen Effekt gezeigt. Um zu testen, ob längere Poly(A)-Anhänge eine Stimulation der Translation bewirken oder es grundsätzlich im RRL nicht möglich ist eine Stimulation der Translation

durch 3'-Poly(A)-Enden zu erreichen, wurden die RNAs in diesem *in vitro*-System translatiert und die Reporteraktivität gemessen.



**Abbildung 3.28:** *In vitro*-Translation der HCV IRES Reporter RNAs mit längeren Poly(A)-Anhängen in RRL. Die Reporter RNAs mit HCV IRES und verschiedenen durch eine Poly(A)-Polymerase hergestellten Poly(A)-Längen wurden im Kaninchen-Retikulozyten-Lysat translatiert.

Wie schon für die kurzen Poly(A)-Anhänge bis 50 A gezeigt (siehe Abbildung 3.23 A) ist auch bei bis 600 Nukleotiden Anhang kein stimulierender Effekt auf die IRES-abhängige Translation zu sehen. RRL scheint also die in Zellen zu beobachtende stimulierende Wirkung auf die HCV IRES unabhängig von der Poly(A)-Länge nicht zeigen zu können.



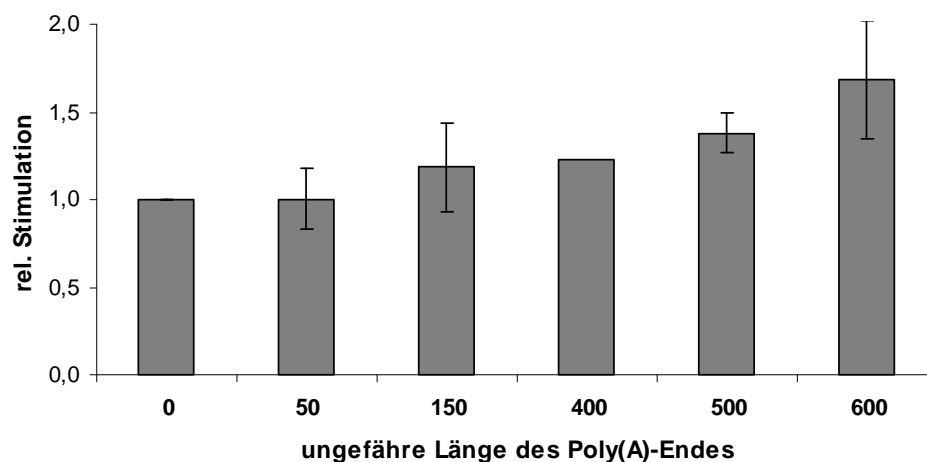
**Abbildung 3.29:** Beispiel einer *in vitro*-Translation von gecappter Reporter-RNA mit Poly(A)-Anhängen in RRL. Die Reporter RNAs mit gecappter Actin 5'-UTR und unterschiedlich langen Poly(A)-Anhängen wurden im Kaninchen-Retikulozyten-Lysat translatiert. Von mehreren Versuchsreihen ist hier zur übersichtlicheren Darstellung nur eine beispielhaft gezeigt.

Im Gegensatz zur *in vitro*-Translation der HCV IRES Reporter-RNAs mit Poly(A)-Anhang sieht man bei der Translation der gecappten und polyadenylierten Actin-Reporter-RNAs im RRL zunächst bei Poly(A)-Längen von ca. 200 Nukleotiden eine leichte Steigerung der



Stimulation, die dann allerdings mit weiter zunehmender Poly(A)-Länge drastisch absinkt, bis fast keine Translation mehr messbar ist. Da bei ganz kurzen Poly(A)-Anhängen von bis zu 50 A noch kein stimulatorischer Effekt messbar war, scheint es einen recht engen Bereich von ungefähr 100 – 200 A zu geben, der auch im RRL die cap-abhängige Translation stimulieren kann.

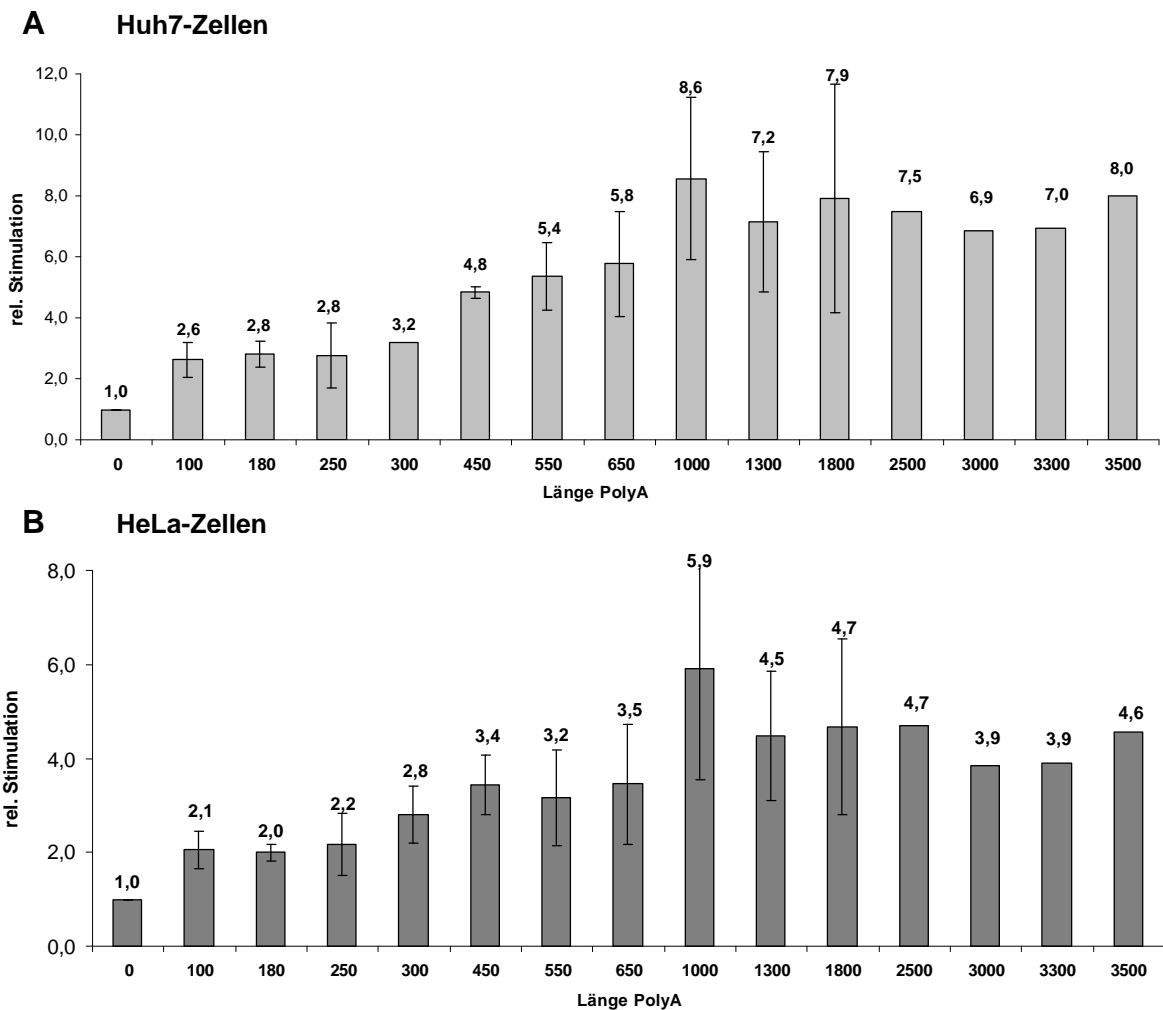
Auch für diese Konstrukte mit längeren Poly(A)-Anhängen wurde die *in vitro*-Translation ebenfalls im Pierce Thermo Scientific Lysat, welches auf humanen HeLa-Zellen basiert, getestet. Da dieses System wie schon beschrieben die gecappten Actin-Konstrukte nicht translatiert, können hier nur die Resultate für die HCV IRES Konstrukte dargestellt werden.



**Abbildung 3.30: Translation der HCV IRES Reporterkonstrukte mit Poly(A)-Anhängen im Thermo Scientific Lysat.** Die Reporterkonstrukte mit HCV IRES und verschiedenen Poly(A)-Längen von ungefähr 50 – 600 A wurden im Thermo Lysat translatiert.

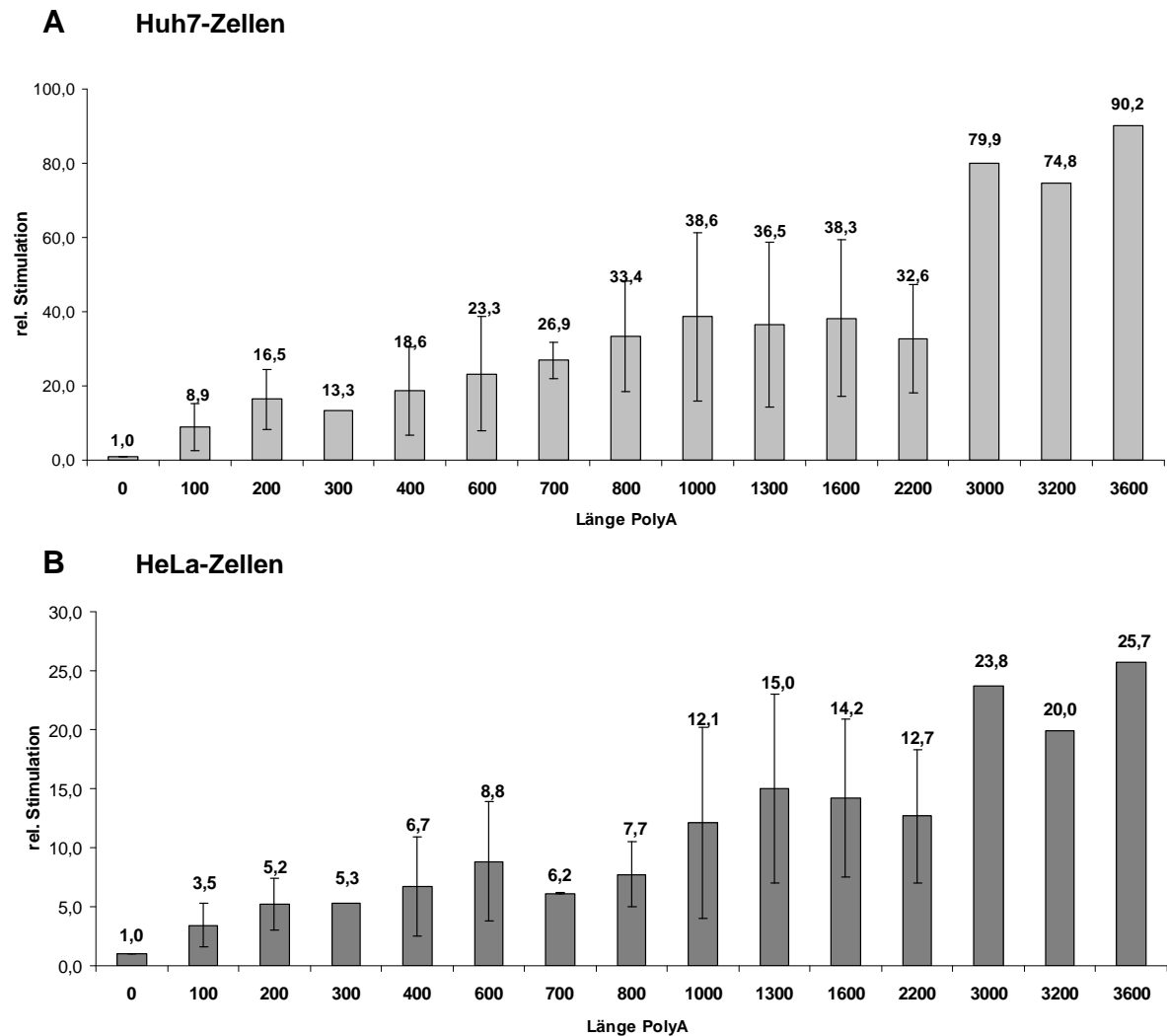
In diesem auf humanem Zelllysate basierenden System kann durch sehr lange Poly(A)-Enden eine leichte knapp 2-fache Stimulation der HCV IRES gezeigt werden, wohingegen der Effekt im RRL auch bei langen Poly(A)-Anhängen nicht auftritt.

Um den Effekt der langen Poly(A)-Schwänze *in vivo* zu testen, wurden die Reporter-RNAs mit den unterschiedlichen enzymatisch hergestellten Anhängen am 3'-Ende in Huh7- und HeLa-Zellen transfiziert. Die mehreren durchgeführten Versuchsreihen mit den unterschiedlich langen Poly(A)-Anhängen werden im Folgenden zur besseren Übersicht zusammengefasst dargestellt. Dazu wurden die Längen der Poly(A)-Anhänge mit ihren dazugehörigen Stimulationswerten in die in Abbildung 3.31 gezeigten Längen-Kategorien eingeteilt, und die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen der gemessenen Stimulationen innerhalb einer Kategorie zusammengefasst und in der Graphik dargestellt.



**Abbildung 3.31: Effekt der verschieden langen Poly(A)-Anhänge auf die Aktivität der HCV IRES in Zellen.** Die Länge der mit Hilfe eines Enzyms hergestellten Poly(A)-Enden wurde in Kategorien eingeteilt. Dargestellt werden hier die dazugehörigen zusammengefassten Stimulationswerte (A) in Huh7-Zellen und (B) in HeLa-Zellen. Die Zahlen über den Balken stehen für die relativen Stimulationswerte.

Die mit Hilfe der Poly(A)-Polymerase hergestellten Anhänge zeigen bei der HCV IRES-abhängigen Translation sowohl in Huh7- als auch in HeLa-Zellen zunächst eine weiter steigende Stimulation bis zu einer Poly(A)-Länge von ungefähr 1000 Nukleotiden. In Huh7-Zellen wird eine maximale Stimulation bei 1000 A von 8,6-fach, in HeLa-Zellen wird bei gleicher Poly(A)-Länge eine Stimulation von 5,9-fach erreicht. Eine zusätzliche Erweiterung der Poly(A)-Anhänge bewirkt allerdings keine weitere Stimulierbarkeit der Translation mehr. In HeLa-Zellen scheint es sogar einen leichten Rückgang der Stimulationen bei sehr langen Poly(A)-Anhängen von einigen tausend Nukleotiden zu geben, so dass bei einem Poly(A)-Schwanz von über 3000 A ein Rückgang auf eine Stimulation von ungefähr 4-fach zu beobachten ist. In Huh7-Zellen ist der Effekt der Poly(A)-Anhänge von mehreren Tausend A nicht so deutlich sichtbar, sondern die Stimulation scheint ab 1000 Nukleotiden zu stagnieren.



**Abbildung 3.32: Effekt der verschiedenen langen Poly(A)-Anhänge auf die cap-abhängige Translation in Zellen.** Die Länge der mit Hilfe eines Enzyms hergestellten Poly(A)-Enden wurde in Kategorien eingeteilt. Dargestellt werden hier die dazugehörigen zusammengefassten Stimulationswerte (A) in Huh7-Zellen und (B) in HeLa-Zellen. Die Zahlen über den Balken stehen für die relativen Stimulationswerte.

Auch die gecappten Actin-RNAs werden durch die längeren Poly(A)-Anhänge in beiden Zelllinien stimuliert. Auch hier findet man bei Betrachtung der einzelnen Stimulationswerte eine Stagnation bei ungefähr 1000 Nukleotiden Poly(A)-Anhang. Dieses zunächst erreichte Plateau zeigt eine Stimulation von ungefähr 36-fach in Huh7- und 13-fach in HeLa-Zellen. Im Gegensatz zur HCV IRES-abhängigen Stimulation, bei der sich dieses Stimulationsplateau im Versuchsverlauf mit längeren Poly(A)-Enden von bis zu 3500 nicht mehr verändert, zeigt sich in den Versuchen mit gecappter RNA eine weitere Stimulationssteigerung ab einer Poly(A)-Länge von ungefähr 3000 A. Diese beträgt in Huh7-Zellen eine ca. 80-fache und in HeLa-Zellen eine ungefähr 24-fache Stimulation.

Vergleicht man die erreichten Stimulationswerte beim Einsatz der durch PCR hergestellten Poly(A)-Anhängen von 5-50 A (siehe Abbildungen 3.25 und 3.26) mit den längeren mit Hilfe der Poly(A)-Polymerase hergestellten von ca. 100 – 3500 A (siehe Abbildungen 3.31 und

3.32), so fällt auf, dass die relativen Stimulationswerte bei den längeren Poly(A)-Anhängen im Vergleich zu den kurzen niedriger sind. So findet man beispielsweise eine Stimulation der HCV IRES durch den per PCR hergestellten 50 A Anhang von 4,5-fach in Huh7-Zellen und 7,5-fach in HeLa-Zellen. Die kürzesten durch das Enzym polyadenylierten HCV IRES-Reporter-RNAs von ungefähr 100 A zeigen hingegen in Huh7-Zellen nur eine Stimulation von 2,6-fach in HeLa-Zellen und sogar nur von 2,1-fach in HeLa-Zellen. Der gleiche Effekt ist auch bei der cap-abhängigen Translation zu beobachten. Hier zeigten die kurzen 50 A-Anhänge eine Stimulation in Huh7-Zellen von 21,7-fach und in HeLa-Zellen von 11,5-fach, wohingegen die enzymatisch polyadenylierten 100 Nukleotid-Anhänge nur eine Stimulation von 8,9-fach in Huh7-Zellen und nur 3,5-fach in HeLa-Zellen bewirken. Ein direkter Vergleich zwischen den 50er und 100er Poly(A)-Enden, die mit Hilfe der beiden unterschiedlichen Methoden hergestellt wurden, zeigt, dass die Werte der 100er Poly(A)-Anhänge in Huh7-Zellen ungefähr um einen Faktor 2 und in HeLa-Zellen sogar um einem Faktor 3,4 niedriger liegen als die Werte der 50er Poly(A)-Anhänge.

#### **Diskussion**

Um herauszufinden, worauf diese Unterschiede in der Stimulation der Translation durch die verschiedenen Polyadenylierungsmethoden zurückzuführen sind, ist eine Betrachtung der Herstellung und Weiterverarbeitung der polyadenylierten RNAs bis zur Transfektion im Detail interessant. Die kurzen Poly(A)-Anhänge von 5-50 A wurden durch die *in vitro*-Transkription von einer Poly(T)-Matrize generiert. Nach der Transkription wurde die RNA ohne weitere Behandlung transfiziert. Die enzymatisch polyadenylierten RNAs erfuhren hingegen methodisch bedingt eine etwas andere Behandlung. Nach der Transkription der RNAs zunächst ohne Poly(A)-Anhang, musste die Nukleinsäure aus dem Transkriptionsansatz aufgereinigt werden, da die Komponenten des verwendeten Transkriptionspuffers die Aktivität der Poly(A)-Polymerase hemmen können. Nach der Aufreinigung der RNA über das RNeasy-Kit der Firma Qiagen liegt die RNA in Wasser eluiert vor. Ein kurzer Erhitzungsschritt der RNA bei 70 °C verhindert die Ausbildung von RNA-Doppelbanden nach der Aufreinigung. Vermutlich kommt es aufgrund des Aufreinigungsschritts zu einer teilweisen falschen Faltung der RNA, die mit Hilfe des Erhitzungs- und Abkühlungsschritts rückgängig gemacht wird. Für die darauf folgende Polyadenylierungsreaktion wird die aufgereinigte RNA mit Polyadenylierungspuffer, rATP und Poly(A)-Polymerase versehen und die verschiedenen Ansätze unterschiedlich lange inkubiert. Der Ansatz, der 0 Minuten polyadenyliert wird und somit im Experiment als Vergleichswert für die unpolyadenylierte RNA dient, wird ebenfalls mit Puffer und ATP, jedoch nicht mit dem Enzym versetzt. Nach der entsprechenden Polyadenylierungszeit wird das Enzym für 10 Minuten hitzeinaktiviert. Zu Beginn der Versuche wurden diese RNAs danach in die Zelllinien transfiziert.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen gemessenen Stimulationswerte zwischen den beiden Methoden der Polyadenylierung scheint auf den ersten Blick das Vorliegen der

RNAs in verschiedenen Pufferbedingungen zu sein. Die RNAs mit kurzen Poly(A)-Anhängen liegen zum Zeitpunkt der Transfektion in Transkriptionspuffer vor, die längeren hingegen in Polyadenylierungspuffer. Um zu überprüfen, ob diese Pufferbedingungen einen Einfluss auf die Transfektionen haben und somit zu diesen Unterschieden führen, wurden beide Arten von RNAs nach der *in vitro*-Transkription beziehungsweise nach der Polyadenylierungsreaktion mit Hilfe des RNeasy-Kit aufgereinigt und lagen danach alle in Wasser eluiert vor, so dass diese Bedingungen der Transfektion dann für alle Proben gleich waren. Jedoch zeigte sich auch durch diese Behandlung der RNAs keine Angleichung der Stimulationswerte. Allerdings ergibt sich durch die aufwändige Behandlung der langen polyadenylierten RNAs eine weitere methodische Schwierigkeit. Die im Verlauf der Behandlung notwendigen zahlreichen Aufreinigungs- und Erhitzungsschritte tragen dazu bei, dass zum einen die Menge an zu transfizierender RNA im Ansatz und zum anderen die Qualität der RNA abnimmt. Ein RNA-Mengenabgleich per Agarosegel, wie er für jede neue RNA vor der Transfektion durchgeführt wird, wurde bei diesen RNAs nach der Behandlung sehr viel schwieriger, da die Banden auf dem Gel nicht mehr so gut zu erkennen waren. Da in diesen Reaktionsansätzen im Vergleich zu denen der kurz-polyadenylierten und weniger intensiv behandelten sehr viel weniger Gesamt-RNA vorhanden ist, war es oftmals nicht möglich, eine Transfektion von ungefähr 400 ng RNA, wie ansonsten standardmäßig eingesetzt, in jedem Ansatz zu verwenden. Deshalb wurden hier zwar innerhalb der Versuchsreihe möglichst identische Mengen verwendet, dabei jedoch weniger als 400 ng RNA eingesetzt. Es müsste also in weiteren Versuchsreihen noch getestet werden, ob die transfizierten Mengen an RNA den beobachteten Unterschied in den Stimulationswerten erklären können. Abschließend konnte hier bisher keine Erklärung für diese Unterschiede in der Stimulation durch die methodisch unterschiedlich hergestellten Poly(A)-Anhänge nachgewiesen werden.

Jedoch kann aus den oben gezeigten Daten geschlossen werden, dass die Länge des Poly(A)-Anhangs einen starken Effekt auf die Stimulation der Translation hat. Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings nur *in vivo* nachgewiesen werden, was im Gegensatz zu einigen Studien steht, bei denen die Stimulation durch einen Poly(A)-Anhang auch im RRL oder translationskompetenten HeLa-Extrakt gezeigt werden konnte (z.B. Bergamini et al., 2000; Bradrick et al., 2007).

#### **Fazit**

Die hier gezeigten Daten zur Untersuchung des Einflusses der Länge des Poly(A)-Anhangs auf die Stimulation der cap- und IRES-abhängigen Translation zeigen, dass *in vivo* eine um so höhere Stimulation zu finden ist, je länger der Poly(A)-Schwanz ist. Dieser Effekt ist jedoch nur bis zu einer gewissen Länge vom mehreren Hundert Adenosinen zu sehen. Noch längere Anhänge zeigen keine weitere Stimulation. Das Ausmaß der Stimulation erwies sich hier jedoch abhängig von der gewählten Polyadenylierungsmethode.

## 4. Schlussdiskussion

In dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss der HCV 3'-UTR sowie des 3'-Poly(A)-Anhangs auf die IRES- und cap-abhängige Translation *in vivo* und *in vitro* untersucht. Dabei wurde ebenfalls getestet, ob dieser Einfluss zelltypabhängig ist oder ob es sich eher um einen generellen, zelltypunabhängigen Mechanismus handelt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Länge des 3'-Poly(A)-Anhangs und dessen quantitativen Effekt auf die Stimulation der IRES- und cap-abhängigen Translation gelegt.

### 4.1 Die HCV 3'-UTR stimuliert die IRES-abhängige Translation der HCV und PTV IRES zelltypunabhängig

Basierend auf der Arbeit von Song et al. (2006), in welcher der stimulatorische Effekt der HCV 3'-UTR auf die HCV IRES-abhängige Translation festgestellt wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst festgestellt werden, ob dieser Effekt durch die HCV 3'-UTR ebenfalls für die Translation der HCV-verwandten PTV IRES zu erkennen ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Translation beider IRES-Elemente durch die HCV 3'-UTR in ähnlichem Maße gesteigert werden kann.

Generell ist in der Literatur der Effekt der HCV 3'-UTR auf die Translation des Virus sehr kontrovers beschrieben. Es wurde sowohl eine inhibitorische Wirkungsweise (Murakami et al., 2001) als auch keine Effekt der HCV 3'-UTR auf die Translation beschrieben (z.B. Fang und Moyer, 2000; Imbert et al., 2003; Friebe et al., 2002). Auch eine Stimulation der Translation durch die HCV 3'-UTR ist sowohl für *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien beschrieben worden (z.B. Ito und Lai, 1998; Michel et al., 2001; McCaffrey et al., 2002; Song et al., 2006, Bradrick et al., 2006).

Dabei konnte in der Studie von Song sehr deutlich gezeigt werden, woher mögliche Unterschiede in den gefundenen Effekten durch die HCV 3'-UTR stammen können. Wichtige experimentelle Parameter für eine korrekte Translation sind ein authentisches 3'-Ende der RNA, also ohne zusätzliche Nukleotide stromabwärts der HCV 3'-UTR. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass RNA statt DNA in die Zellen transfiziert werden sollte, was auch der natürlichen Infektion des Hepatitis C Virus näher kommt, da es sich um ein RNA-Virus handelt, dessen RNA in der Zelle direkt translatiert werden kann. In manchen Studien wurde nicht die komplette Sequenz der HCV 3'-UTR verwendet, sondern nur die 3'-X Region (Ito und Lai, 1998; Michel et al., 2001), jedoch konnte sowohl bei Song et al. als auch in der vorliegenden Arbeit durch Deletionen innerhalb der HCV 3'-UTR gezeigt werden, dass alle drei Bereiche an der gefundenen Translationsstimulation beteiligt sind (siehe Abbildung 3.10). Somit sind Studien, welche ausschließlich auf der 3'-X Region basieren, zumindest bezüglich quantitativer Aussagen kritisch zu sehen. Auch wurden in einigen Studien dicistronische Reporterstrukture verwendet, in denen ein zweites IRES-Element vorhanden ist (Friebe und Bartenschlager, 2002; Yi und Lemon, 2003). Dass die Verwendung

dicistronischer Reporterkonstrukte in Translationsstudien ein kritischer Faktor sein kann, wurde in der Arbeit von Jünemann et al. belegt. Dort zeigte sich eine Beeinflussung der Translationsaktivität am 5'-Ende durch das interne IRES-Element in cis (Jünemann et al., 2007). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich monocistronische Reporter-RNAs verwendet, um einen solchen Effekt ausschließen zu können.

Diese experimentellen Gegebenheiten können zum Teil für die in der Literatur gefunden unterschiedlichen Effekte der HCV 3'-UTR auf die Translation des Virus verantwortlich gemacht werden. Da in der vorliegenden Arbeit allerdings die von Song beschriebenen Parameter verwendet wurden, ist ein direkter quantitativer Vergleich bezüglich der Stimulationswerte durch die HCV 3'-UTR mit dieser Studie sinnvoll. Obwohl für die Ermittlung der Stimulation der HCV IRES-abhängigen Translation durch ihre 3'-UTR in beiden Studien das exakt gleiche Konstrukt verwendet wurde, sind dennoch Unterschiede aufgetreten.

Die zu Beginn dieser Arbeit verwendete Reporter-RNA ohne HCV 3'-UTR, die direkt nach der Firefly Luciferase Sequenz endet (vergleiche Abbildung 3.2), zeigte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine recht niedrige Translationsaktivität, was im Vergleich zum Konstrukt mit HCV 3'-UTR in der Auswertung zu einer sehr hohen Translationsstimulation durch die HCV 3'-UTR führte. Diese beträgt bis zu 90-fach (siehe Abbildung 3.4) und steht somit im Kontrast zu den gefunden Stimulationswerten in der Studie von Song, der mit dem gleichen Konstrukt und gleicher Methode nur eine Stimulation von bis zu 25-fach zeigen konnte. Auch die Daten der *in vitro*-Studien in RRL stimmen anfänglich nicht überein, da die in dieser Arbeit gezeigte Stimulation (siehe Abbildung 3.3) dort nicht gefunden werden konnte.

Eine Angleichung der Daten wurde erst durch die Verlängerung des Konstrukts ohne HCV 3'-UTR durch die ungefähr 200 Nukleotide unspezifische Plasmid-Sequenz erreicht. Es konnte eine höhere Aktivität der RNA ohne HCV 3'-UTR gemessen werden, was zu einer geringeren relativen Stimulation durch die HCV 3'-UTR führt. Nach der Verlängerung dieser RNA zeigte sich ebenfalls kein Effekt durch die HCV 3'-UTR mehr im RRL und ein sehr viel niedrigerer stimulatorischer Effekt *in vivo*. Vermutlich kann eine solche Beobachtung auf eine verbesserte Termination der Translation zurückgeführt werden, so dass translatierende Ribosomen, die sich am Ende des Reportergens mit einer darauf folgenden nicht zu translatierenden Sequenz befinden, effizienter terminieren können als ohne Sequenzverlängerung nach dem Reportergen. Dies führt letztendlich zu einer erhöhten Translationsaktivität, da die Ribosomen zum einen nicht am Ende der RNA „stecken bleiben“, ohne korrekt terminieren zu können und diese dadurch schneller wieder für eine erneute Runde der Translation verwendet werden können. Auch andere Studien zur Termination der Translation zeigen eine Repression der Translation bei verkürzten 3'-UTR-Enden von RNAs (Amrani et al., 2004; Inada et al., 2005). Daher ist es in zukünftigen Studien wichtig, den Parameter einer zusätzlichen willkürlichen Sequenz oder 3'-UTR direkt nach dem Reportergen zu berücksichtigen und diese wie in dieser Arbeit durchgeführt,

möglichst mit der gleichen Länge zu wählen wie die zu vergleichende RNA, hier die HCV 3'-UTR.

In den Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit konnte allerdings kein zelltypspezifischer Effekt der Translationsstimulation nachgewiesen werden, sondern es wurde eine ähnlich hohe Stimulation sowohl in Hepatom- als auch Nichtheptomzelllinien gefunden. Allerdings konnte vor der Verlängerung der RNA ohne HCV 3'-UTR ein Unterschied zwischen Huh7- und HeLa Zellen festgestellt werden, so dass die Stimulation durch die HCV 3'-UTR in HeLa Zellen nur ca. 55 % der Stimulation in Huh7-Zellen betrug (siehe Abbildung 3.4). Nach der Verlängerung der RNA am 3'-Ende hinter dem Luciferase-Gen ist allerdings neben der geringeren Gesamtstimulation auch kein zelltypspezifischer Stimulationseffekt mehr zu sehen. Da hierzu allerdings keine weiteren Versuche durchgeführt wurden, lässt sich an dieser Stelle nur spekulieren, dass die zelltypabhängige Höhe der Stimulation durch die HCV 3'-UTR in der Studie von Song eventuell durch die Art der Reporter-RNAs ohne Verlängerung nach dem Reporter-Gen zustande kommt. Denkbar wären hier beispielsweise eine schlechtere Termination der Translation dieser RNAs in bestimmten Zelltypen und somit eine rechnerisch erhöhte Translationsstimulation beim Quotienten der Reporteraktivitäten der RNAs mit und ohne HCV 3'-UTR. Die Tatsache, dass in dieser Arbeit keine zelltypabhängige Stimulation der Translation durch die HCV 3'-UTR gefunden wurde, lässt den Schluss zu, dass für eine Erklärung der hohen Leberspezifität des Hepatitis C Virus andere Parameter betrachtet werden müssen, wie beispielsweise die Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Hepatozyten oder das Vorhandensein leberspezifischer miRNAs, die ebenfalls translationsstimulierend auf die HCV-RNA wirken (Henke, Goergen et al., 2008).

Basierend auf der Erkenntnis, dass die HCV IRES-abhängige Translation des Virus durch die HCV 3'-UTR stimuliert wird, stellte sich die Frage, ob ebenfalls die Translation HCV-ähnlicher IRES-Elemente durch die HCV 3'-UTR in ähnlicher Weise beeinflusst wird. Die IRES des Porcinen Teschovirus 1 Talfan (PTV-1), welches aufgrund seiner Struktur und seines Genomaufbaus den Picornaviren zugeordnet wird, besitzt trotzdem sowohl eine hohe strukturelle als auch eine hohe funktionelle Ähnlichkeit zur HCV IRES (Pisarev et al., 2004; Chard et al., 2005). Diese beiden IRES-Elemente haben eine Gesamt-Sequenzidentität von ca. 55 % und besitzen einige gemeinsame hoch-konservierte Bereiche. Dazu gehören beispielsweise der Pseudoknoten sowie weitere für die Bindung der Ribosomen an die IRES wichtige Bereiche. Dies ist zum Beispiel bei den die Stem-Loops III<sub>d</sub> und III<sub>e</sub> der Fall, also Regionen, für die eine Interaktion der IRES mit der ribosomalen 40S-Untereinheit und eIF3 nachgewiesen werden konnte (Kieft et al., 2001; Lukavsky et al., 2000; Hellen und De Breyne, 2007; Easton et al., 2009).

Trotzdem sind die beiden IRES Element nicht komplett identisch, sondern zeigen nur eine hohe Ähnlichkeit. Eine schematische Darstellung der beiden IRES-Elemente im Vergleich ist in den Abbildungen 1.18 und 3.1 gezeigt. Neben der PTV IRES wurden allerdings auch andere IRES-Elemente nachgewiesen, die ebenfalls der HCV IRES ähnlich sind und, wie bei



PTV der Fall, anderen Virusfamilien zugeordnet werden, wie das Simian Picornavirus (Hellen und De Breyne, 2007). Die gefundenen Gemeinsamkeiten beziehen sich jedoch ausschließlich auf die IRES-Elemente, da sich sowohl die gesamte Genomstruktur als auch die 3'-UTRs dieser Viren voneinander unterscheiden. In diesem Zusammenhang wird auch über einen möglichen rekombinanten Austausch von IRES-Elementen zwischen der Familie der Picornaviren und der Flaviviren diskutiert (Hellen und de Breyne, 2007).

Im direkten Vergleich mit der recht langen und hoch-strukturierten HCV 3'-UTR besitzt das PTV-Genom nach der codierenden Region nur eine kleine 3'-UTR von ca. 65 nt und einen darauf folgenden Poly(A)-Anhang, wie er bei Picornaviren typischerweise vorhanden ist (Doherty et al., 1999; Zell et al., 2001). Ob auch die 3'-UTR von PTV einen Effekt auf die Translation der PTV IRES hat, ist bisher noch nicht getestet worden und konnte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht getestet werden.

Die in der vorliegenden Arbeit *in vivo* gezeigte Stimulation der PTV IRES durch die HCV 3'-UTR in verschiedenen Zelltypen zeigt quantitativ ähnliche Werte wie die Stimulation der HCV IRES-abhängigen Translation. Diese Tatsache kann ein Hinweis darauf sein, dass der Mechanismus der Translationsstimulation an beiden IRES-Elementen gleich oder ähnlich abläuft. Dieses Ergebnis unterstützt somit die Thesen von anderen Studien bezüglich der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten zwischen HCV und PTV IRES-Elementen im Besonderen in Hinsicht auf die Translationsinitiation. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Translationsinitiation an der PTV IRES ebenfalls unabhängig vom Initiationsfaktor eIF4A ist und die Bildung der 48S-Präinitiations-Komplexe unabhängig von den Initiationsfaktoren der eIF4F-Gruppe stattfindet (Pisarev et al., 2004; Chard et al., 2006). Die Stimulierbarkeit der Translation der EMCV IRES durch die HCV 3'-UTR (siehe Abbildung 3.13) zeigt, dass auch nicht HCV-ähnliche IRES-Elemente diesen Effekt zeigen können. Die EMCV IRES ist im Gegensatz zur PTV IRES eine typische Picornavirus IRES sowohl in ihrer Struktur als auch ihrer Funktion der Translationsinitiation. Die gefundene 2-fache Translationsstimulation durch die HCV 3'-UTR ist zwar geringer als die an der HCV- bzw. PTV IRES, eine quantitative Aussage zum Vergleich ist hier allerdings nur begrenzt möglich, da das dazu verwendete Konstrukt aus dem Labor von Ivan Shatsky stammt und leichte Abweichungen zu den in unserem Labor in Gießen verwendeten Konstrukten zu finden sind. Ob die Ungleichheiten zwischen den Konstrukten der beiden Labore, wie die Verwendung einer SV40-Sequenz statt einer unspezifischen Plasmid-Sequenz oder auch Veränderungen in der Gen-Sequenz der Firefly Luciferase, die geringere Translationsstimulation bedingen, kann hier an dieser Stelle nur vermutet werden und bedürfte weiterer Untersuchungen.

Dass nicht nur die Translation der hier verwendeten Reporter-RNAs, in denen große Teile des HCV Genoms durch das Gen der Firefly Luciferase ersetzt wurde, sondern ebenfalls die Translation der authentischen kompletten HCV Genom-RNA durch die HCV 3'-UTR stimuliert wird, wurde bereits bei Song et al. (2006) gezeigt. Dies kommt der natürlichen Situation der Infektion einer Zelle durch das Virus sehr viel näher als die verwendeten

Reporter-RNAs. Die Analyse der Translation erfolgte über die Messung und Quantifizierung des NS5B-Proteins, und auch dort konnte in Anwesenheit der HCV 3'-UTR eine erhöhte Expression gemessen werden. Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Translationsstimulation der Reporter-Konstrukt RNA ist also vergleichbar mit der Situation während einer HCV-Infektion der Zelle. Außerdem beweisen diese Experimente auch, dass es hier zu keiner Inhibition sowohl durch die Sequenz des Virus als auch die Virusproteine kommt.

Der genaue Mechanismus, wie die HCV 3'-UTR die IRES-abhängige Translation stimuliert, konnte bisher noch nicht abschließend erklärt werden. Eine einfache mögliche Erklärung der gefundenen Translationsunterschiede zwischen den RNAs mit bzw. ohne HCV 3'-UTR könnte ein Unterschied in der Stabilität der RNAs innerhalb der Zellen sein. Die HCV 3'-UTR weist aufgrund ihrer starken Strukturiertheit eventuell eine erhöhte Resistenz gegenüber zellulären Nukleasen auf und könnte sich aufgrund dessen als stabiler erweisen und nicht so schnell abgebaut werden. Diese Erklärung für die Translationsunterschiede zwischen den RNA-Konstrukten konnte jedoch mit Hilfe einer Stabilitätskontrolle mittels quantitativer real-time PCR der einige Stunden nach der Transfektion reextrahierten RNAs widerlegt werden. Die quantitativen Mengen der verschiedenen RNAs unterliegen nur geringen Schwankungen, und somit kann dies nicht zur Erklärung des gemessenen Stimulationseffekts beitragen. Die Auswertung der Daten ist in Bung, Bochkaeva et al. (2010) gezeigt. Diese Ergebnisse werden zusätzlich bestätigt durch die bei Song et al. gezeigten RNase-Protection-Assays und die bei Bradrick et al. (2006) durchgeführten Stabilitätstests. Diese Studien zeigten ebenfalls keine extremen Schwankungen in der Stabilität der RNAs nach der Transfektion in die Zellen. Da bisher noch keine Erklärung für die gefundene Stimulation der IRES-abhängigen Translation existiert, kann über den Mechanismus der Reaktion an dieser Stelle nur spekuliert werden.

Bradrick et al. (2006) fanden durch *in vitro*-Experimente eine Stimulation der HCV IRES-abhängigen Translation durch die HCV 3'-UTR, die ausschließlich auf Ereignissen während der Termination der Translation basiert. Die Autoren vermuten eine verbesserte Termination und frühere Verfügbarkeit der Ribosomen für eine neue Runde der Translation und somit eine höhere Translationsrate durch die HCV 3'-UTR. Da es sich hierbei allerdings um *in vitro*-Daten aus HeLa-Extrakten handelt und es sich in der vorliegenden Arbeit mehrfach gezeigt hat, dass die Daten aus *in vitro*-Experimenten mit denen *in vivo* nicht direkt vergleichbar sind, sollten weitere mögliche Erklärungen für den Effekt gesucht werden.

Vermutet werden kann außerdem eine Interaktion der IRES und der 3'-UTR durch Proteine, welche an die RNA binden und somit zur Stimulation der Translation führen. Da der Effekt der Stimulation der Translation durch die HCV 3'-UTR in allen getesteten Zelltypen nachgewiesen wurde, ist es eher unwahrscheinlich, dass die gesuchten Faktoren leberspezifisch sind oder zumindest in Leberzellen in höheren Konzentrationen vorliegen. Es scheint sich bei eventuellen Faktoren wohl um ubiquitäre Proteine zu handeln. Auch ist es

wahrscheinlich, dass es sich um einen multifaktoriellen Vorgang handelt, da hier durch Mutationsanalyse der HCV 3'-UTR nachgewiesen werden konnte, dass alle drei Bereiche am Stimulationseffekt der Translation beteiligt sind. Möglicherweise handelt es sich um mehrere Faktoren, die entweder an die virale RNA direkt oder an andere Proteine binden und einen zusammenwirkenden Effekt zeigen.

Einige Studien beschreiben diverse Proteine, die an beide UTRs der RNA binden und somit die Interaktion der beiden UTRs vermitteln könnten. Auch bei anderen Viren wie dem Tabak-Mosaik-Virus (TMV), welches ebenfalls ein einzelsträngiges RNA-Genom in positiver Orientierung besitzt, ist die Bindung eines Proteins an die virale RNA als Enhancer der Translation gezeigt worden (Tanguay und Gallie, 1996).

Auch für das Bovine Virusdiarrhoe Virus (BVDV), welches zwar dem Hepatitis C Virus nahe verwandt ist, sich jedoch sowohl bezüglich der Sequenz als auch der Struktur der 3'-UTR von diesem unterscheidet, ist ebenfalls ein stimulatorischer Effekt der 3'-UTR auf die Translation nachgewiesen worden. Hier wurden besonders Proteine der NFAR-Gruppe (nuclear factors associated with RNA) identifiziert, die an die BVDV RNA binden. Zur NFAR-Gruppe werden NF90/NFAR-1 (nuclear factor 90), NF45 (nuclear factor 45) und RHA (RNA-Helikase A) gezählt (Liao et al., 1998; Isken et al., 2007). In diesem Zusammenhang wird deren Beteiligung sowohl an der Replikation als auch der Translation der viralen RNA diskutiert (Isken et al., 2003; Isken et al., 2004). Isken konnte auch die spezifische Bindung der NFAR-Proteine an die beiden UTRs des Hepatitis C Virus nachweisen (Isken et al., 2007). Allerdings ist die Bedeutung der NFAR-Proteine für die Translation des Virus noch nicht endgültig geklärt. Vermutet wurde hier auch ein möglicher inhibitorischer Effekt auf die HCV Translation, da die Bindestellen der NFAR-Proteine und der für eIF3 in der HCV 5'-UTR überlappen (Sizova et al., 1998, Isken et al., 2007).

Dabei liegt die Vermutung nahe, dass es sich mechanistisch um eine Brückenbildung durch RNA-bindende Proteine, die sowohl an die virale IRES als auch die virale 3'-UTR binden, handelt und es somit zu einer Zirkularisierung der RNA kommt. Dies würde eine engere räumliche Nähe zwischen 5'- und 3'-UTR der RNA bedeuten, was dazu führen kann, dass terminierende Ribosomen am 3'-Ende der RNA schneller wieder am 5'-Ende die Translation initiieren können und es somit aufgrund eines „Ringschlussprinzips“ zur Translationsstimulation kommt. Dass es durch Bindung spezifischer Proteine an die virale RNA zu einem Ringschluss kommt, konnte mit Hilfe von hochauflösenden Elektronenmikroskop-Aufnahmen bereits gezeigt werden (Isken et al., 2007).

In einer anderen Studie wird IGF2BP1 (insulin-like growth factor-II mRNA binding protein 1) als möglicher Faktor der Translationsstimulation für HCV diskutiert (Weinlich et al., 2009). Für dieses Protein wurde die Bindung sowohl an die HCV 5'-UTR als auch an die HCV 3'-UTR nachgewiesen. Außerdem zeigt die Studie, dass IGF2BP1 die Translation an der IRES spezifisch stimuliert, die cap-abhängige Translation davon jedoch nicht betroffen ist. Außerdem zeigen die Autoren mit Hilfe von Gradientenzentrifugationen, dass die 3'-UTR die

Bildung von 43S-Präinitiationskomplexen an der HCV IRES stimuliert. Die Autoren vermuten, dass durch die Bindung von IGF2BP1 an die beiden UTRs der viralen RNA eIF3 zur Translationsinitiation rekrutiert wird und somit die Translation stimuliert wird. Dies erklärt auch, warum der Effekt von IGF2BP1 nur bei der HCV IRES-abhängigen Translation gezeigt werden kann. Jedoch wurde durch Weinlich auch gezeigt, dass die Bindung an die HCV 3'-UTR an der variablen Region und dem PolyU/C-Trakt stattfindet. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings für alle drei Bereiche der 3'-UTR eine Beteiligung an der Translationsstimulation nachgewiesen, und dieser ist sogar bei der 3' X-Region am größten. Diese Tatsache widerlegt, dass allein IGF2BP1 für die Translationsstimulation an der HCV RNA verantwortlich ist, schließt allerdings seine Beteiligung an diesem Effekt nicht aus. Eine andere Studie zeigt die Konzentration an IGF2BP1 mRNA in verschiedenen Zelltypen und konnte dabei für adultes Lebergewebe im Gegensatz zur fötalen Leber keine mRNA nachweisen (Hammer et al., 2005). Dass IGF2BP1 also hauptsächlich in fötalem Gewebe und daneben nur noch in wenigen anderen adulten Zellen vorkommt, allerdings nicht ubiquitär, weist eher darauf hin, dass dieser Faktor bei dem Infektionszyklus von HCV keine bedeutende Rolle spielt.

Eine Vielzahl an weiteren Studien beschreibt Proteine, die an die HCV 3'- bzw. 5'-UTR binden. Allein in der Studie von Harris wurden über 70 zelluläre Faktoren identifiziert, die mit der HCV 3'-UTR assoziiert sind (Harris et al., 2006). Diskutiert wird in der Literatur bezüglich der Stimulation der Translation beispielsweise auch die Beteiligung von verschiedenen ITAFs wie PTB (Polypyrimidin-Trakt bindendes Protein) (Ali und Siddiqui, 1995; Tsuchihara et al., 1997; Brocard et al., 2007) oder hnRNP L (Hahm et al., 1998; Hwang et al., 2009).

Obwohl einige weitere Studien die Bindung von verschiedenen Faktoren an die HCV UTRs beschreiben, konnte jedoch der genaue Mechanismus der Stimulation der Translation durch die virale 3'-UTR noch nicht abschließend geklärt werden. Dabei bleibt die Frage sowohl nach der Beteiligung einzelner HCV RNA-bindender Faktoren als auch nach dem Schritt der Translationsreaktion, bei welcher die Stimulation stattfindet, offen. Auch die Beteiligung dieser HCV RNA-bindenden Proteine beim Umschalten von Translation zur Replikation der viralen RNA ist noch nicht endgültig geklärt. Neben der möglichen Erklärung der Zirkularisierung der viralen RNA über eine Proteinbrücke existiert auch das Model einer möglichen RNA-RNA-Interaktion zwischen HCV 5'- und 3'-UTR, welches ebenfalls besagt, dass es aufgrund dessen zu einem Ringschluss der RNA-Enden kommt (Romero-López et al., 2009).

### **4.2 Stimulation der IRES-abhängigen Translation durch einen 3'-Poly(A)-Anhang**

Neben der Stimulation der Translation durch die HCV 3'-UTR wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine Stimulation der IRES-abhängigen Translation durch einen Poly(A)-Anhang nachgewiesen. Sowohl die HCV- als auch die PTV- und EMCV IRES-Elemente

konnten durch einen Anhang von 50 A signifikant in ihrer Translation stimuliert werden. Auch dieser Effekt zeigte sich ebenso wie die Stimulation durch die HCV 3'-UTR unabhängig vom transfizierten Zelltyp.

Die gefundenen quantitativen Unterschiede in der Stimulierbarkeit der verschiedenen untersuchten IRES Elemente (ca. 5-fach bei der HCV IRES, jeweils ungefähr 2-fach bei PTV und EMCV IRES) sollten jedoch in Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Reporter-Konstrukt betrachtet werden. Für die Ermittlung dieser Daten standen sowohl die Reporter-Konstrukte aus dem Labor der AG Niepmann wie auch die aus der AG Shatsky zur Verfügung. Allein die Werte für die Stimulation der HCV IRES sind mit den RNAs aus dem Labor in Gießen entstanden, die PTV und EMCV IRES-Konstrukte stammen aus dem russischen Labor. So sind eventuell die gefundenen quantitativen Unterschiede der Stimulation der verschiedenen IRES-Elemente durch den Poly(A)-Anhang zu erklären. Auch für diese Experimente sind also die in Kapitel 4.1 diskutierten Unterschiede im Reporter-Konstrukt zu finden.

Trotz der nur eingeschränkten quantitativen Vergleichbarkeit der Stimulationswerte durch den Poly(A)-Anhang zeigte sich trotzdem für die IRES-abhängige Translation bei allen getesteten IRES-Elementen eine deutliche Stimulation.

In der Literatur wird oftmals eine Stimulierbarkeit der klassischen Picornavirus IRES-Elemente durch einen 3'-Poly(A)-Anhang beschrieben (Bergamini et al., 2000; Michel et al., 2001; Svitkin et al., 2001; Lopez de Quinto et al., 2002; Paulous et al., 2003; Bradrick et al., 2007). Diese konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Versuche mit der EMCV IRES bestätigt werden. Weitere Studien konnten in einem auf HeLa-Zellen basierendem und nicht mit Nuklease behandeltem *in vitro*-Translationssystem einen stimulieren Effekt des Poly(A)-Anhangs sowohl auf die IRES-abhängige Translation von EMCV als auch auf die von HAV und PV zeigen (Bergamini et al., 2000). Die Stimulierbarkeit dieser IRES-Elemente durch Poly(A) konnte auch in speziell behandeltem RRL bestätigt werden (Michel et al., 2001).

Eine Erklärung des Mechanismus dieser Translationsstimulation durch ein 3'-Poly(A)-Ende scheint hier ähnlich wie die der cap-abhängigen Translation zu sein. Dort wird ein „closed-loop“-Modell durch eine Cap-eIF4E-eIF4G-PABP-Interaktion zu Grunde gelegt, was zu einer Zirkularisierung der mRNA und somit zu einer verstärkten Translation führt. Der genaue Mechanismus der Stimulation der cap-abhängigen Translation durch einen 3'-Poly(A)-Anhang ist im Kapitel 1.5.3 erklärt. Eine solche Interaktion zwischen 5'- und 3'-Enden einer RNA zur Translationsstimulation könnte eine Art „Proofreading“-Funktion (Korrekturlese-Funktion) besitzen, so dass insbesondere RNAs, die intakte Enden haben, effizient translatiert werden (Lopez-Lastra et al., 2005).

Im Gegensatz zur cap-abhängigen Translation wird die Translation an IRES-Elementen unabhängig vom cap-bindenden Faktor eIF4E initiiert. Bei den klassischen Picornavirus IRES-Elementen findet die Translationsinitiation durch die direkte Bindung von eIF4G an die IRES statt (vergleiche Kapitel 1.4.2.2.1). Es lässt sich also auch hier eine Interaktion von

IRES-eIF4G-PABP vermuten, so dass bei der Stimulation der IRES-abhängigen Translation durch einen Poly(A)-Anhang der Picornaviren ebenfalls ein Ringschlussprinzip zu Grunde liegt. Diese These wird unterstützt durch Studien, in denen die PABP-eIF4G-Interaktion und eine damit verbundene IRES-abhängige Translationsstimulation nachgewiesen wurde (Michel et al., 2001; Svitkin et al., 2001). Es konnte jedoch auch nachgewiesen werden, dass es zu seiner Stimulation der IRES-Aktivität durch das 3'-Poly(A)-Ende kommt, obwohl die IRES-bindende Domäne von eIF4G gespalten wurde. Daraus wird geschlossen, dass es eventuell auch einen anderen Mechanismus der 5'-3'-Kommunikation bei einigen Viren geben kann, der unabhängig von der vermuteten IRES-eIF4G-PABP-Interaktion stattfindet (Lopez-Lastra et al., 2005). Der genaue Mechanismus ist bisher noch nicht vollständig verstanden und kann eventuell auch durch mehrere Faktoren und Interaktionen gleichzeitig verursacht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Stimulationen der Translation der HCV und PTV IRES-Elemente durch einen 3'-Poly(A)-Anhang unterliegen wahrscheinlich einem anderen Mechanismus als demjenigen, der bei den klassischen Picornaviren vermutet wird. HCV und HCV-verwandte IRES-Elemente können ohne eine Vielzahl der ansonsten nötigen eIFs und unter bestimmten Bedingungen sogar ganz ohne deren Verwendung die Translation initiieren (Pestova et al., 1998; Spahn et al., 2001; Kieft et al., 2001; Terenin et al., 2008). Da HCV also die Translation ohne die Verwendung von eIF4G initiieren kann, ist der zu Grunde liegende Mechanismus der Stimulation hier wahrscheinlich ein anderer, über den hier allerdings aufgrund fehlender Studienergebnisse nur spekuliert werden kann. Möglicherweise spielt die Bindung von eIF3 an PAIP1, ein PABP-interagierendes Protein, bei der Stimulation der Translation von HCV eine Rolle. Von Martineau et al. (2008) konnte gezeigt werden, dass Paip1 mit eIF3 interagiert und dass dies zur Stimulation der Translation führt, was hier schon im Kapitel 4.2 beschrieben wurde. Da auch eIF3 bei der Translationsinitiation bei HCV genutzt wird (Sizova et al., 1998), könnte in diesem Fall diese Proteininteraktion ebenfalls zur Stimulation der Translation an HCV und HCV-verwandten IRES-Elementen führen. Auch hierbei ist ein Ringschluss, bei dem 5'- und 3'-Ende der RNA in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, denkbar. Ein weiterer möglicher Mechanismus, der zu den hier gefundenen Translationsstimulationen führen könnte, ist auf Ebene der Bildung der 80S-Komplexe zu finden. Es konnte sowohl für Hefezellen als auch für Säugerzellen gezeigt werden, dass PABP die Assoziation der ribosomalen Untereinheiten am Start-Codon stimuliert (Searfoss et al., 2001; Kahvejian et al., 2005). Die Hypothese, dass PABP die Faktoren eIF5 und eIF5B indirekt durch eine Inhibition eines eIF5/5B-inhibierenden Faktors aktiviert (Searfoss et al., 2001), könnte somit ebenfalls als Erklärung für den hier gefundenen Effekt dienen. Die Aufklärung, welcher Mechanismus oder welche Mechanismen hier für den Effekt verantwortlich sind, bedarf weiterer Studien.

### 4.3 Stimulation der cap-abhängigen Translation durch die HCV 3'-UTR

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die HCV 3'-UTR nicht nur die IRES-abhängige Translation *in vivo* stimulieren kann, sondern dass auch eine Stimulation der Translation von gecappten Reporter-RNAs durch die HCV 3'-UTR in verschiedenen Zelltypen stattfindet. Diese Stimulation beträgt knapp 4-fach in Huh7-Zellen und 2-fach in HeLa-Zellen.

Eine Stimulation der cap-abhängigen Translationsinitiation durch eine virale 3'-UTR konnte erst kürzlich von Vera-Otarola et al. (2010) gezeigt werden. In dieser Studie wurde ein stimulatorischer Effekt der 3'-UTR auf die Translation der viralen RNA beim Hantavirus nachgewiesen. Die RNAs dieser Viren werden mit Hilfe von „Cap-Snatching“, also dem Anhängen der Cap-Struktur zellulärer mRNAs an die virale RNA, mit einer Cap-Struktur am 5'-Ende versehen, und die Translationsinitiation findet dort nun cap-abhängig statt. Die in der Studie von Vera-Otarola *in vivo* gefundene Stimulation durch die virale 3'-UTR ist quantitativ ähnlich hoch mit der Stimulation durch einen Poly(A)-Anhang (Vera-Otarola et al., 2010). Die in der Studie verwendeten Reporter-RNAs ohne 3'-UTR sind jedoch so konstruiert, dass nach der Firefly Luciferase als Reporter gen keine zusätzliche Sequenz mehr folgt. Wie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, ist eine Sequenzverlängerung nach dem Reporter gen für eine korrekte Termination der Translation notwendig, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Ergebnisse in der Studie von Vera-Otarola zumindest in quantitativer Hinsicht kritisch betrachtet werden sollten. Da allerdings dort auch zusätzlich zum Vergleich ein nicht-funktionelles Cap-Analog am 5'-Ende eingesetzt wurde, lässt sich mutmaßen, dass tatsächlich eine Stimulation der Translation durch die Hantavirus 3'-UTR am Cap stattfindet. Auch für die Translation der RNA von Bunyaviren wurde eine Stimulation durch eine virale 3'-UTR gefunden (Blakqori et al., 2009). Dort wurde auch gezeigt, dass diese Stimulation unabhängig von PABP erfolgt. Im Gegensatz dazu wurde beim der Translation der Dengue Virus-RNA, einem Flavivirus, eine Beteiligung von PABP bei der 5'-Cap-3'-UTR Interaktion nachgewiesen (Polacek et al., 2009). Hier bindet PABP an einen Adenosin-reichen Bereich der 3'-UTR und stimuliert somit die Translation wahrscheinlich über eine Cap-eIF4E-eIF4G-PABP-3'-UTR-Interaktion, so dass es auch hier zu einer Zirkularisierung der RNA mit Hilfe von Proteinbrücken kommt.

Für die Stimulation der hier gefundenen cap-abhängigen Translation durch die HCV 3'-UTR ist eine Beteiligung von PABP eher unwahrscheinlich, da kein Bereich der HCV 3'-UTR eine längere Poly(A)-Sequenz enthält, um PABP an die RNA zu binden. Vermutlich findet aber auch die 5'-Cap-HCV 3'-UTR-Interaktion durch eine Zirkularisierung über eine bisher unbekannte Proteinbrücke oder ein Ringschluss der RNA mit Hilfe einer RNA-RNA-Interaktion statt. Die bisher zahlreichen gefundenen Proteine, die mit der HCV 3'-UTR interagieren können, stellen somit mögliche Brückenproteine dar, die vermutlich mit Initiationsfaktoren, die bei der cap-abhängigen Translation gebraucht werden, interagieren können.

#### 4.4 Einfluss der Länge des Poly(A)-Anhangs auf cap- und IRES-abhängige Translation

In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem stimulatorischen Effekt eines Poly(A)-Anhangs von 50 Adenosinen auf die cap- und IRES-abhängige Translation ein besonderes Augenmerk auf die Länge des Poly(A)-Endes und die damit verbundene Stimulation der Translation gelegt. Dabei zeigt sich sowohl in Huh7- als auch in HeLa-Zellen eine umso bessere Translationsstimulation, je länger das 3' Poly(A)-Ende der RNA ist. Allerdings wurde ab einer gewissen Länge keine weitere Stimulation mehr erreicht. Die HCV IRES-abhängige Translation wurde dabei bis zu einer Länge von ungefähr 1000 und die cap-abhängige Translation bis zu einer Länge von ca. 3000 Adenosinresten zusätzlich stimuliert. Dabei kann eine maximale Translationsstimulation an der HCV IRES von ungefähr 8,5-fach in Huh7- und 6-fach in HeLa-Zellen sowie eine maximale Stimulation der cap-abhängigen Translation von 80-fach in Huh7- und ungefähr 25-fach in HeLa-Zellen nachgewiesen werden.

In Studien, den denen der Effekt von 3'- Poly(A)-Schwänzen auf die Translation gezeigt wird, werden oftmals Reporter-RNAs mit recht kurzen Poly(A)-Anhängen im Vergleich zur durchschnittlichen Länge derer der meisten zellulären mRNAs verwendet. Eine Großzahl der zellulären mRNAs weisen in der Regel nach der post-transkriptionellen Polyadenylierungsreaktion einen Poly(A)-Anhang mit einer Länge von ungefähr 200 - 250 Nukleotiden auf (Wahle und Keller, 1996). Trotzdem wird in der Literatur oftmals der Effekt von wesentlich kürzeren Poly(A)-Anhängen auf die Translation beschrieben, beispielsweise von 12 und 50 A (Bradrick et al., 2006) oder verschiedene Poly(A)-Längen zwischen 14 bzw. 15 A und 98 A (z.B. Bergamini et al., 2000, Iizuka et al., 1994, Peng et al., 2008). Oftmals wird in Studien, welche den Effekt von 3'- Poly(A)-Enden zeigen sollen, eine Länge von 50 A eingesetzt (z.B. Wakiyama et al., 1997; Borman et al., 2000; Michel et al., 2001; Bradrick et al., 2007).

Diese Generierung kürzerer Poly(A)-Enden als 250 Nukleotide ist wohl in den meisten Fällen einfach technisch bedingt. Neben der Polyadenylierung der RNAs mit Hilfe von Poly(T)-Primern zur Herstellung der Matrize für die *in vitro*-Transkription können kurze Poly(A)-Anhänge ebenfalls im Plasmid kodiert sein. Längere durch eine Poly(A)-Polymerase hergestellte 3'-Poly(A)-Enden haben den Nachteil, dass die Länge des Anhangs nicht exakt bestimmbar ist und dass die RNA aus verschiedenen Synthese-Reaktionen meist unterschiedliche Längen haben. Da allerdings für die Bestimmung der Translationsstimulation mehrere Versuchsreihen mit jeweils neu synthetisierten RNAs durchgeführt werden sollten, müssen alle Poly(A)-Enden die exakt gleiche Länge haben, um die Ergebnisse quantitativ miteinander vergleichen zu können. Somit ist die Methode der Polyadenylierung mittels Poly(A)-Polymerase für eine solche Messung nicht einsetzbar und die Generierung von Poly(A)-Enden mittels PCR oder Plasmidkodierung die Alternative.

Bei der quantitativen Bestimmung des Stimulationseffekts der Translation durch das 3'- Poly(A)-Ende müssen also mehrere Parameter beachtet werden. Es konnte beispielsweise



auch gezeigt werden, dass neben der Länge des verwendeten Poly(A)-Anhangs ebenfalls die Länge der davor liegenden 3'-UTR von Bedeutung ist (Tanguay und Gallie, 1996). Obwohl in dieser Studie immer eine gleich bleibende Poly(A)-Länge von 50 A verwendet wurde, ist das Ausmaß der Stimulation durch den Poly(A)-Schwanz trotzdem abhängig von der Länge der 3'-UTR zwischen codierender Region und dem Poly(A)-Ende. Dabei scheint die Länge der verwendeten 3'-UTR sowohl die Translationseffizienz als auch die Stabilität der mRNA zu beeinflussen (Tanguay und Gallie, 1996). Dieser Effekt sollte bei einer quantitativen Betrachtung absoluter Stimulationswerte in Betracht gezogen werden. Da in der vorliegenden Arbeit innerhalb der Versuchsreihen, die den Effekt der unterschiedlichen Poly(A)-Längen beschreiben, immer die identische 3-UTR-Sequenz verwendet wurde, sind die gefundenen Translationsstimulationen allerdings untereinander qualitativ miteinander vergleichbar.

Es ist schon lange bekannt, dass der stimulatorische Effekt des 3'-Poly(A)-Anhangs auf die Translation von mRNAs direkt mit dessen Länge zusammenhängt (Munroe und Jacobson, 1990). Neben einer verbesserten Translationsstimulation an einer 5'-Cap-Struktur ist auch an IRES-Elementen früh eine erhöhte Translationsaktivität durch längere Poly(A)-Anhänge gezeigt worden, beispielsweise für das EMC-Virus (Hruby und Roberts, 1977). Im Zusammenhang mit einer Erhöhung der Reporterexpression durch 3'-Poly(A)-Anhänge wird in der Literatur oftmals diskutiert, ob eine RNA-stabilisierende Wirkung als zusätzlicher Schutz gegen Degradation durch zelluläre Exonukleasen und somit eine erhöhte Halbwertszeit oder eine verbesserte Initiation und Re-Initiation der Translation der Grund für diese Studienergebnisse sind (z.B. Bernstein et al., 1989; Jackson und Standard, 1990; Preiss und Hentze, 1998, Wells et al., 1998). Denkbar ist eine gemeinsame Wirkungsweise mehrerer möglicher Mechanismen (Mangus et al., 2003).

Da die Translation einer RNA also auch maßgeblich von der Länge des 3'-Poly(A)-Endes abhängt, liegt es nahe, dass über diesem post-transkriptionellen Mechanismus auch die Expression der verschiedenen Proteine in der Zelle reguliert wird. Die Kontrolle der Translationseffizienz einer spezifischen mRNA durch verschiedene Poly(A)-Längen spielt beispielsweise während der Entwicklung eine bedeutende Rolle. Neben der Polyadenylierung von prä-mRNAs in zellulären Zellkern durch nukleare Poly(A)-Polymerasen kann nach dem Export der RNAs ins Zytoplasma dort eine Verlängerung der Poly(A)-Anhänge mit Hilfe von zytoplasmatischen Poly(A)-Polymerasen stattfinden. Da sich dieser Mechanismus der Polyadenylierung gleichzeitig in Konkurrenz zu der ebenfalls im Zytoplasma stattfinden mRNA-spezifischen 3'-5' RNA-Degradation durch das Exosom befindet, ereignet sich in einem komplizierten Zusammenspiel somit eine Feineinstellung der 3'-Poly(A)-Länge verschiedener RNAs und damit verbunden der Effektivität ihrer Translation. Die Länge des Poly(A)-Schwanzes ist also verantwortlich für die Halbwertszeit einer RNA, da längere Poly(A)-Anhänge zum einen durch ihre Länge und zum anderen durch die Bindung von PABP weniger effizient durch Nukleasen abgebaut werden können (Meyer et al. 2004).

Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass kurze 3'-Oligo(A)-Enden eine destabilisierende Wirkung haben und diese RNAs schneller abgebaut werden. Die 3'-Anhänge sind jedoch nur einige Nukleotide lang und werden durch einen anderen Mechanismus angehängt. Daher wird in der Literatur diskutiert, ob allein die geringe Länge der Anhänge für die Destabilisation verantwortlich ist, weil beispielsweise stabilisierende Proteine an kurzen Poly(A)-Anhängen nicht binden können (Eckmann et al., 2010).

Wie im Kapitel 4.2 und 4.3 schon näher beschrieben, ist neben der stabilisierenden Wirkung der Poly(A)-Enden ist auch die Stimulation der Translationsinitiation durch Poly(A)-Anhänge nachgewiesen. Durch die Bildung einer Proteinbrücke zwischen dem 5'-Cap und der 3'-Poly(A)-Struktur durch die PABP-eIF4G-eIF4E-Interaktion und eine damit verbundene Zirkularisierung der RNA kann eine verbesserte Initiation und Re-Initiation der Translation stattfinden. Eine weitere mögliche Erklärung für die Tatsache, dass die nachgewiesene Translationsstimulation in direktem Zusammenhang mit der Länge des Poly(A)-Anhangs steht, ist vermutlich die vermehrte Bindung von PABP-Molekülen an eine längere Poly(A)-Sequenz (Sachs, 2000; Kühn et al., 2004)). Somit könnte es eventuell zu einer effizienteren und stabileren Interaktion zwischen PABP und den Initiationsfaktoren und damit verbunden der 5'- und 3'-Enden der RNA kommen. Außerdem könnte es möglich sein, dass gleichzeitig vermehrte Interaktionen mit dem Translationsapparat stattfinden können und es somit zu der verstärkten Translation kommt (Eckmann et al., 2010). Die vermehrte Rekrutierung von PABP an Poly(A)-Enden und damit verbunden eine verbesserte Assoziation der beiden ribosomalen Untereinheiten kann eine Erklärung für die hier gefundene Translationsstimulation in Abhängigkeit von der Poly(A)-Anhangslänge sein.

Während der hier *in vivo* durchgeführten Versuchsreihen mit enzymatisch hergestellten Poly(A)-Anhängen konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine Translationsstimulation ab einer gewissen Länge der Poly(A)-Sequenz nicht mehr weiter möglich ist. Das gefundene Stimulationsplateau setzt bei der HCV IRES-abhängigen Translation im Vergleich zur cap-abhängigen Translation früher ein. Denkbar ist hier das Ausschöpfen der oben diskutierten möglichen Mechanismen, die zur Translationsstimulation durch den Poly(A)-Anhang führen könnten. Eine endgültige Erklärung für die gefundenen Stimulationen ist noch nicht gefunden, allerdings liegt nach heutigem Wissensstand die Vermutung nahe, dass die hier diskutierten Mechanismen gemeinsam dafür verantwortlich sind.

## 5. Literaturverzeichnis

- Agnello**, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q. X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22), 12766-71.
- Ali**, I. K., McKendrick, L., Morley, S. J., and Jackson, R. J. (2001). Activity of the hepatitis A virus IRES requires association between the cap-binding translation initiation factor (eIF4E) and eIF4G. *J Virol* 75(17), 7854-63.
- Ali**, I. K., McKendrick, L., Morley, S. J., and Jackson, R. J. (2001). Truncated initiation factor eIF4G lacking an eIF4E binding site can support capped mRNA translation. *Embo J* 20(15), 4233-42.
- Ali**, N., Pruijn, G. J., Kenan, D. J., Keene, J. D., and Siddiqui, A. (2000). Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* 275(36), 27531-40.
- Ali**, N., and Siddiqui, A. (1995). Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J Virol* 69(10), 6367-75.
- Ali**, N., and Siddiqui, A. (1997). The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6), 2249-54.
- Altmann**, M., Muller, P. P., Wittmer, B., Ruchti, F., Lanker, S., and Trachsel, H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 4B contributes to RNA helicase activity. *Embo J* 12(10), 3997-4003.
- Alvarez**, E., Castello, A., Menendez-Arias, L., and Carrasco, L. (2006). HIV protease cleaves poly(A)-binding protein. *Biochem J* 396(2), 219-26.
- Amrani**, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D. A., Ghosh, S., and Jacobson, A. (2004). A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 432(7013), 112-8.
- Anderson**, J. T. (2005). RNA turnover: unexpected consequences of being tailed. *Curr Biol* 15(16), R635-8.
- Anzola**, M., and Burgos, J. J. (2003). Hepatocellular carcinoma: molecular interactions between hepatitis C virus and p53 in hepatocarcinogenesis. *Expert Rev Mol Med* 5(28), 1-16.
- Babaylova**, E., Graifer, D., Malygin, A., Stahl, J., Shatsky, I., and Karpova, G. (2009). Positioning of subdomain III<sub>d</sub> and apical loop of domain II of the hepatitis C IRES on the human 40S ribosome. *Nucleic Acids Res* 37(4), 1141-51.
- Baer**, B. W., and Kornberg, R. D. (1983). The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *J Cell Biol* 96(3), 717-21.
- Balvay**, L., Soto Rifo, R., Ricci, E. P., Decimo, D., and Ohlmann, T. (2009). Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta* 1789(9-10), 542-57.
- Banerjee**, A. K. (1980). 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol Rev* 44(2), 175-205.
- Barnard**, D. C., Ryan, K., Manley, J. L., and Richter, J. D. (2004). Symplekin and xGLD-2 are required for CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation. *Cell* 119(5), 641-51.
- 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(3), 165-81.

- Bartenschlager**, R., Frese, M., and Pietschmann, T. (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63, 71-180.
- Barth**, H., Cerino, R., Arcuri, M., Hoffmann, M., Schurmann, P., Adah, M. I., Gissler, B., Zhao, X., Ghisetti, V., Lavezzo, B., Blum, H. E., von Weizsacker, F., Vitelli, A., Scarselli, E., and Baumert, T. F. (2005). Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes. *J Virol* 79(9), 5774-85.
- Barth**, H., Schafer, C., Adah, M. I., Zhang, F., Linhardt, R. J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T. H., Depla, E., Von Weizsacker, F., Blum, H. E., and **Baumert**, T. F. (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 278(42), 41003-12.
- Barth**, H., Ulsenheimer, A., Pape, G. R., Diepolder, H. M., Hoffmann, M., Neumann-Haefelin, C., Thimme, R., Henneke, P., Klein, R., Paranhos-Baccala, G., Depla, E., Liang, T. J., Blum, H. E., and Baumert, T. F. (2005). Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. *Blood* 105(9), 3605-14.
- Bartosch**, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A., and Cosset, F. L. (2003). Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 278(43), 41624-30.
- Behrens**, S. E., Tomei, L., and De Francesco, R. (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Embo J* 15(1), 12-22.
- Belsham**, G. J. (1992). Dual initiation sites of protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA are selected following internal entry and scanning of ribosomes in vivo. *Embo J* 11(3), 1105-10.
- Belsham**, G. J. (2009). Divergent picornavirus IRES elements. *Virus Res* 139(2), 183-92.
- Belsham**, G. J., and Sonenberg, N. (2000). Picornavirus RNA translation: roles for cellular proteins. *Trends Microbiol* 8(7), 330-5.
- Benn**, J., and Schneider, R. J. (1995). Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(24), 11215-9.
- Bergamini**, G., Preiss, T., and Hentze, M. W. (2000). Picornavirus IRESes and the poly(A) tail jointly promote cap-independent translation in a mammalian cell-free system. *Rna* 6(12), 1781-90.
- Bergeron**, D., Barbeau, B., Leger, C., and Rassart, E. (1995). Experimental bias in the evaluation of the cellular transient expression in DNA co-transfection experiments. *Cell Mol Biol Res* 41(3), 155-9.
- Berlanga**, J. J., Baass, A., and Sonenberg, N. (2006). Regulation of poly(A) binding protein function in translation: Characterization of the Paip2 homolog, Paip2B. *Rna* 12(8), 1556-68.
- Berlitz**, C., and Darlix, J. L. (1995). An internal ribosomal entry mechanism promotes translation of murine leukemia virus gag polyprotein precursors. *J Virol* 69(4), 2214-22.
- Bernstein**, P., Peltz, S. W., and Ross, J. (1989). The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol* 9(2), 659-70.
- Bieleski**, L., and Talbot, S. J. (2001). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vCyclin open reading frame contains an internal ribosome entry site. *J Virol* 75(4), 1864-9.
- Bienroth**, S., Keller, W., and Wahle, E. (1993). Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *Embo J* 12(2), 585-94.
- Bilger**, A., Fox, C. A., Wahle, E., and Wickens, M. (1994). Nuclear polyadenylation factors recognize cytoplasmic polyadenylation elements. *Genes Dev* 8(9), 1106-16.

- Blakqori**, G., van Knippenberg, I., and Elliott, R. M. (2009). Bunyamwera orthobunyavirus S-segment untranslated regions mediate poly(A) tail-independent translation. *J Virol* 83(8), 3637-46.
- Blanchard**, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouille, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80(14), 6964-72.
- Blight**, K. J., and Rice, C. M. (1997). Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 71(10), 7345-52.
- Bonneau**, A. M., and Sonenberg, N. (1987). Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J Biol Chem* 262(23), 11134-9.
- Borman**, A., and Jackson, R. J. (1992). Initiation of translation of human rhinovirus RNA: mapping the internal ribosome entry site. *Virology* 188(2), 685-96.
- Borman**, A. M., and Kean, K. M. (1997). Intact eukaryotic initiation factor 4G is required for hepatitis A virus internal initiation of translation. *Virology* 237(1), 129-36.
- Borman**, A. M., Michel, Y. M., and Kean, K. M. (2000). Biochemical characterisation of cap-poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: the eIF4G-PABP interaction increases the functional affinity of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. *Nucleic Acids Res* 28(21), 4068-75.
- Bradrick**, S. S., Dobrikova, E. Y., Kaiser, C., Shveygert, M., and Gromeier, M. (2007). Poly(A)-binding protein is differentially required for translation mediated by viral internal ribosome entry sites. *Rna* 13(9), 1582-93.
- Bradrick**, S. S., Walters, R. W., and 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(4), 1293-303.
- Brocard**, M., Paulous, S., Komarova, A. V., Deveaux, V., and Kean, K. M. (2007). Evidence that PTB does not stimulate HCV IRES-driven translation. *Virus Genes* 35(1), 5-15.
- Brown**, E. A., Zhang, H., Ping, L. H., and Lemon, S. M. (1992). Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res* 20(19), 5041-5.
- Buck**, C. B., Shen, X., Egan, M. A., Pierson, T. C., Walker, C. M., and Siliciano, R. F. (2001). The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J Virol* 75(1), 181-91.
- Bung**, C., Bochkaeva, Z., Terenin, I., Zinovkin, R., Shatsky, I. N., and Niepmann, M. Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation. *FEBS Lett* 584(4), 837-42.
- Buratti**, E., Tisminetzky, S., Zotti, M., and 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(13), 3179-87.
- Carrere-Kremer**, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002). Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* 76(8), 3720-30.
- Carter**, M. S., and Sarnow, P. (2000). Distinct mRNAs that encode La autoantigen are differentially expressed and contain internal ribosome entry sites. *J Biol Chem* 275(36), 28301-7.
- Chard**, L. S., Bordeleau, M. E., Pelletier, J., Tanaka, J., and Belsham, G. J. (2006). Hepatitis C virus-related internal ribosome entry sites are found in multiple genera of the family Picornaviridae. *J Gen Virol* 87(Pt 4), 927-36.

- Chard**, L. S., Kaku, Y., Jones, B., Nayak, A., and Belsham, G. J. (2006). Functional analyses of RNA structures shared between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and the picornavirus porcine teschovirus 1 Talfan. *J Virol* 80(3), 1271-9.
- Chaudhuri**, J., Chowdhury, D., and Maitra, U. (1999). Distinct functions of eukaryotic translation initiation factors eIF1A and eIF3 in the formation of the 40 S ribosomal preinitiation complex. *J Biol Chem* 274(25), 17975-80.
- Chellappan**, S., Kraus, V. B., Kroger, B., Munger, K., Howley, P. M., Phelps, W. C., and Nevins, J. R. (1992). Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10), 4549-53.
- Chen**, F., MacDonald, C. C., and Wilusz, J. (1995). Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. *Nucleic Acids Res* 23(14), 2614-20.
- Chevaliez**, S., and Pawlotsky, J. M. (2006). HCV Genome and Life Cycle.
- Cho**, J., Baek, W., Yang, S., Chang, J., Sung, Y. C., and Suh, M. (2001). HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F-1 up-regulation. *Biochim Biophys Acta* 1538(1), 59-66.
- Choo**, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244(4902), 359-62.
- Cocquerel**, L., Meunier, J. C., Pillez, A., Wychowski, C., and Dubuisson, J. (1998). A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Virol* 72(3), 2183-91.
- Colgan**, D. F., and Manley, J. L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* 11(21), 2755-66.
- Cormier**, E. G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R. J., Gardner, J. P., and Dragic, T. (2004). CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(19), 7270-4.
- Cornelis, S., Bruynooghe, Y., Denecker, G., Van Huffel, S., Tinton, S., and Beyaert, R. (2000). Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5(4), 597-605.
- Costa-Mattioli**, M., Svitkin, Y., and Sonenberg, N. (2004). La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 24(15), 6861-70.
- Costantino**, D. A., Pfingsten, J. S., Rambo, R. P., and Kieft, J. S. (2008). tRNA-mRNA mimicry drives translation initiation from a viral IRES. *Nat Struct Mol Biol* 15(1), 57-64.
- Craig, A. W., Haghghat, A., Yu, A. T., and Sonenberg, N. (1998). Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* 392(6675), 520-3.
- Dantonel**, J. C., Murthy, K. G., Manley, J. L., and Tora, L. (1997). Transcription factor TFIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA. *Nature* 389(6649), 399-402.
- Das**, S., Ghosh, R., and Maitra, U. (2001). Eukaryotic translation initiation factor 5 functions as a GTPase-activating protein. *J Biol Chem* 276(9), 6720-6.
- Deffaud**, C., and Darlix, J. L. (2000). Rous sarcoma virus translation revisited: characterization of an internal ribosome entry segment in the 5' leader of the genomic RNA. *J Virol* 74(24), 11581-8.
- Dehlin**, E., Wormington, M., Korner, C. G., and Wahle, E. (2000). Cap-dependent deadenylation of mRNA. *Embo J* 19(5), 1079-86.

- Deleersnyder**, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M., and Dubuisson, J. (1997). Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol* 71(1), 697-704.
- Deo**, R. C., Bonanno, J. B., Sonenberg, N., and Burley, S. K. (1999). Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* 98(6), 835-45.
- Di Marco**, S., Volpari, C., Tomei, L., Altamura, S., Harper, S., Narjes, F., Koch, U., Rowley, M., De Francesco, R., Migliaccio, G., and Carfi, A. (2005). Interdomain communication in hepatitis C virus polymerase abolished by small molecule inhibitors bound to a novel allosteric site. *J Biol Chem* 280(33), 29765-70.
- Doherty**, M., Todd, D., McFerran, N., and Hoey, E. M. (1999). Sequence analysis of a porcine enterovirus serotype 1 isolate: relationships with other picornaviruses. *J Gen Virol* 80 ( Pt 8), 1929-41.
- Domier**, L. L., McCoppin, N. K., and D'Arcy, C. J. (2000). Sequence requirements for translation initiation of Rhopalosiphum padi virus ORF2. *Virology* 268(2), 264-71.
- Dorsch-Hasler**, K., Yogo, Y., and Wimmer, E. (1975). Replication of picornaviruses. I. Evidence from in vitro RNA synthesis that poly(A) of the poliovirus genome is genetically coded. *J Virol* 16(6), 1512-7.
- Easton**, L. E., Locker, N., and Lukavsky, P. J. (2009). Conserved functional domains and a novel tertiary interaction near the pseudoknot drive translational activity of hepatitis C virus and hepatitis C virus-like internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res* 37(16), 5537-49.
- Eckmann**, C., Rammelt, C., and Wahle, E. (2010). Control of poly(A) tail length. John Wiley & Sons, Ltd. WIREs RNA 2010 DOI: 10.1002/wrna.56.
- Egger**, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76(12), 5974-84.
- Ehrenfeld**, E. (1974). Polyadenylation of vesicular stomatitis virus mRNA. *J Virol* 13(5), 1055-60.
- Elazar**, M., Cheong, K. H., Liu, P., Greenberg, H. B., Rice, C. M., and Glenn, J. S. (2003). Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 77(10), 6055-61.
- Elazar**, M., Liu, P., Rice, C. M., and Glenn, J. S. (2004). An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol* 78(20), 11393-400.
- Etchison**, D., Milburn, S. C., Edery, I., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. (1982). Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J Biol Chem* 257(24), 14806-10.
- Evans**, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D., and Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446(7137), 801-5.
- Fang**, J. W., and Moyer, R. W. (2000). The effects of the conserved extreme 3' end sequence of hepatitis C virus (HCV) RNA on the in vitro stabilization and translation of the HCV RNA genome. *J Hepatol* 33(4), 632-9.
- Farr**, A., and Roman, A. (1992). A pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency. *Nucleic Acids Res* 20(4), 920.
- Fitzgerald**, M., and Shenk, T. (1981). The sequence 5'-AAUAAA-3' forms parts of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs. *Cell* 24(1), 251-60.

- Flint**, M., and McKeating, J. A. (2000). The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. *Rev Med Virol* 10(2), 101-17.
- Ford**, L. P., Bagga, P. S., and Wilusz, J. (1997). The poly(A) tail inhibits the assembly of a 3'-to-5' exonuclease in an in vitro RNA stability system. *Mol Cell Biol* 17(1), 398-406.
- Friebe**, P., and Bartenschlager, R. (2002). Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 76(11), 5326-38.
- Friebe**, P., Lohmann, V., Krieger, N., and Bartenschlager, R. (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75(24), 12047-57.
- Gale**, M., Jr., Blakely, C. M., Kwieciszewski, B., Tan, S. L., Dossett, M., Tang, N. M., Korth, M. J., Polyak, S. J., Gretch, D. R., and Katze, M. G. (1998). Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 18(9), 5208-18.
- Gallie**, D. R. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev* 5(11), 2108-16.
- Gao**, L., Aizaki, H., He, J. W., and Lai, M. M. (2004). Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* 78(7), 3480-8.
- Gershon**, P. D., Ahn, B. Y., Garfield, M., and Moss, B. (1991). Poly(A) polymerase and a dissociable polyadenylation stimulatory factor encoded by vaccinia virus. *Cell* 66(6), 1269-78.
- Gershon**, P. D., and Moss, B. (1993). Stimulation of poly(A) tail elongation by the VP39 subunit of the vaccinia virus-encoded poly(A) polymerase. *J Biol Chem* 268(3), 2203-10.
- Gilmartin**, G. M., and Nevins, J. R. (1989). An ordered pathway of assembly of components required for polyadenylation site recognition and processing. *Genes Dev* 3(12B), 2180-90.
- Gingras**, A. C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* 13(11), 1422-37.
- Gingras**, A. C., Svitkin, Y., Belsham, G. J., Pause, A., and Sonenberg, N. (1996). Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(11), 5578-83.
- Glaunsinger**, B., and Ganem, D. (2004). Lytic KSHV infection inhibits host gene expression by accelerating global mRNA turnover. *Mol Cell* 13(5), 713-23.
- Gonzalez**, M. E., and Carrasco, L. (2003). Viroporins. *FEBS Lett* 552(1), 28-34.
- Gosert**, R., Chang, K. H., Rijnbrand, R., Yi, M., Sangar, D. V., and Lemon, S. M. (2000). Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap-independent translation directed by both picornaviral and flaviviral internal ribosome entry sites In vivo. *Mol Cell Biol* 20(5), 1583-95.
- Gretton**, S. N., Taylor, A. I., and McLauchlan, J. (2005). Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *J Gen Virol* 86(Pt 5), 1415-21.
- Griffin**, S. D., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P., and Rowlands, D. J. (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 535(1-3), 34-8.
- Grundhoff**, A., and Ganem, D. (2001). Mechanisms governing expression of the v-FLIP gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 75(4), 1857-63.



- Gwack**, Y., Kim, D. W., Han, J. H., and Choe, J. (1997). DNA helicase activity of the hepatitis C virus nonstructural protein 3. *Eur J Biochem* 250(1), 47-54.
- Hahm**, B., Kim, Y. K., Kim, J. H., Kim, T. Y., and Jang, S. K. (1998). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol* 72(11), 8782-8.
- Hammer**, N. A., Hansen, T. O., Byskov, A. G., Rajpert-De Meyts, E., Grondahl, M. L., Bredkjaer, H. E., Wewer, U. M., Christiansen, J., and Nielsen, F. C. (2005). Expression of IGF-II mRNA-binding proteins (IMPs) in gonads and testicular cancer. *Reproduction* 130(2), 203-12.
- Harris**, D., Zhang, Z., Chaubey, B., and Pandey, V. N. (2006). Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. *Mol Cell Proteomics* 5(6), 1006-18.
- Hellen**, C. U. (2009). IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry. *Biochim Biophys Acta* 1789(9-10), 558-70.
- Hellen**, C. U., and de Breyne, S. (2007). A distinct group of hepacivirus/pestivirus-like internal ribosomal entry sites in members of diverse picornavirus genera: evidence for modular exchange of functional noncoding RNA elements by recombination. *J Virol* 81(11), 5850-63.
- Hellen**, C. U., and Sarnow, P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 15(13), 1593-612.
- Henke**, J. I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schuttler, C. G., Fehr, C., Junemann, C., and Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *Embo J* 27(24), 3300-10.
- Herold**, J., and Andino, R. (2001). Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* 7(3), 581-91.
- Higgs, D. R., Goodbourn, S. E., Lamb, J., Clegg, J. B., Weatherall, D. J., and Proudfoot, N. J. (1983). Alpha-thalassaemia caused by a polyadenylation signal mutation. *Nature* 306(5941), 398-400.
- Honda**, M., Beard, M. R., Ping, L. H., and Lemon, S. M. (1999). A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* 73(2), 1165-74.
- Honda**, M., Kaneko, S., Matsushita, E., Kobayashi, K., Abell, G. A., and Lemon, S. M. (2000). Cell cycle regulation of hepatitis C virus internal ribosomal entry site-directed translation. *Gastroenterology* 118(1), 152-62.
- Hruby**, D. E., and Roberts, W. K. (1977). Encephalomyocarditis virus RNA. II. Polyadenylic acid requirement for efficient translation. *J Virol* 23(2), 338-44.
- Hsu**, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M., and McKeating, J. A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12), 7271-6.
- Huang**, Y., and Carmichael, G. G. (1996). Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA. *Mol Cell Biol* 16(4), 1534-42.
- Hugle**, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H. G., Rice, C. M., Blum, H. E., and Moradpour, D. (2001). The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 284(1), 70-81.
- Huszar**, T., Mucsi, I., Terebessy, T., Masszi, A., Adamko, S., Jeney, C., and Rosivall, L. (2001). The use of a second reporter plasmid as an internal standard to normalize luciferase activity in transient transfection experiments may lead to a systematic error. *J Biotechnol* 88(3), 251-8.

- Hwang**, B., Lim, J. H., Hahm, B., Jang, S. K., and Lee, S. W. (2009). hnRNP L is required for the translation mediated by HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun* 378(3), 584-8.
- Ibrahim**, N. M., Marinovic, A. C., Price, S. R., Young, L. G., and Frohlich, O. (2000). Pitfall of an internal control plasmid: response of Renilla luciferase (pRL-TK) plasmid to dihydrotestosterone and dexamethasone. *Biotechniques* 29(4), 782-4.
- Iizuka**, N., Najita, L., Franzusoff, A., and Sarnow, P. (1994). Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14(11), 7322-30.
- Ilkow**, C. S., Mancinelli, V., Beatch, M. D., and Hobman, T. C. (2008). Rubella virus capsid protein interacts with poly(a)-binding protein and inhibits translation. *J Virol* 82(9), 4284-94.
- Imataka**, H., Gradi, A., and Sonenberg, N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *Embo J* 17(24), 7480-9.
- Imbert**, I., Dimitrova, M., Kien, F., Kieny, M. P., and Schuster, C. (2003). Hepatitis C virus IRES efficiency is unaffected by the genomic RNA 3'NTR even in the presence of viral structural or non-structural proteins. *J Gen Virol* 84(Pt 6), 1549-57.
- Inada**, T., and Aiba, H. (2005). Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *Embo J* 24(8), 1584-95.
- Isken**, O., Baroth, M., Grassmann, C. W., Weinlich, S., Ostareck, D. H., Ostareck-Lederer, A., and Behrens, S. E. (2007). Nuclear factors are involved in hepatitis C virus RNA replication. *Rna* 13(10), 1675-92.
- Isken**, O., Grassmann, C. W., Sarisky, R. T., Kann, M., Zhang, S., Grosse, F., Kao, P. N., and Behrens, S. E. (2003). Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus. *Embo J* 22(21), 5655-65.
- Isken**, O., Grassmann, C. W., Yu, H., and Behrens, S. E. (2004). Complex signals in the genomic 3' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus coordinate translation and replication of the viral RNA. *Rna* 10(10), 1637-52.
- Ito**, T., and 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(11), 8698-706.
- Ito**, T., and Lai, M. M. (1999). An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence. *Virology* 254(2), 288-96.
- Ito**, T., Tahara, S. M., and Lai, M. M. (1998). The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J Virol* 72(11), 8789-96.
- Izumi**, R. E., Valdez, B., Banerjee, R., Srivastava, M., and Dasgupta, A. (2001). Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res* 76(1), 17-29.
- Jackson**, R. J., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(2), 113-27.
- Jackson**, R. J., and Standart, N. (1990). Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? *Cell* 62(1), 15-24.
- Jacobson**, A., and Peltz, S. W. (1996). Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 65, 693-739.
- Jan**, E., and Sarnow, P. (2002). Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *J Mol Biol* 324(5), 889-902.

- Jang, S. K., Krausslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., and 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(8), 2636-43.
- Jiwaji, M., Daly, R., Pansare, K., McLean, P., Yang, J., Kolch, W., and Pitt, A. R.** The Renilla luciferase gene as a reference gene for normalization of gene expression in transiently transfected cells. *BMC Mol Biol* 11, 103.
- Joachims, M., Van Breugel, P. C., and Lloyd, R. E. (1999).** Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J Virol* 73(1), 718-27.
- Junemann, C., Song, Y., Bassili, G., Goergen, D., Henke, J., and Niepmann, M. (2007).** Picornavirus internal ribosome entry site elements can stimulate translation of upstream genes. *J Biol Chem* 282(1), 132-41.
- Kahvejian, A., Roy, G., and Sonenberg, N. (2001).** The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66, 293-300.
- Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M. N., and Sonenberg, N. (2005).** Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* 19(1), 104-13.
- Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., Yokoi, M., Ishida, S., Suzuki, S., and Kohara, M. (1994).** Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 75 ( Pt 7), 1755-60.
- Kaku, Y., Chard, L. S., Inoue, T., and Belsham, G. J. (2002).** Unique characteristics of a picornavirus internal ribosome entry site from the porcine teschovirus-1 talfan. *J Virol* 76(22), 11721-8.
- Kaku, Y., Sarai, A., and Murakami, Y. (2001).** Genetic reclassification of porcine enteroviruses. *J Gen Virol* 82(Pt 2), 417-24.
- Kaminski, A., Hunt, S. L., Patton, J. G., and Jackson, R. J. (1995).** Direct evidence that polypyrimidine tract binding protein (PTB) is essential for internal initiation of translation of encephalomyocarditis virus RNA. *Rna* 1(9), 924-38.
- Kanamori, Y., and Nakashima, N. (2001).** A tertiary structure model of the internal ribosome entry site (IRES) for methionine-independent initiation of translation. *Rna* 7(2), 266-74.
- Kato, T., and Wakita, T. (2005).** [Production of infectious hepatitis C virus in cell culture]. *Uirusu* 55(2), 287-95.
- Keller, W., Bienroth, S., Lang, K. M., and Christofori, G. (1991).** Cleavage and polyadenylation factor CPF specifically interacts with the pre-mRNA 3' processing signal AAUAAA. *Embo J* 10(13), 4241-9.
- Khaleghpour, K., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Roy, G., Svitkin, Y. V., Imataka, H., O'Connor-McCourt, M., and Sonenberg, N. (2001).** Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol Cell Biol* 21(15), 5200-13.
- Khaleghpour, K., Svitkin, Y. V., Craig, A. W., DeMaria, C. T., Deo, R. C., Burley, S. K., and Sonenberg, N. (2001).** Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Mol Cell* 7(1), 205-16.
- Kieft, J. S., Grech, A., Adams, P., and Doudna, J. A. (2001).** Mechanisms of internal ribosome entry in translation initiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66, 277-83.
- Kieft, J. S., Zhou, K., Jubin, R., and Doudna, J. A. (2001).** Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *Rna* 7(2), 194-206.

- Kim, J. H., Paek, K. Y., Ha, S. H., Cho, S., Choi, K., Kim, C. S., Ryu, S. H., and Jang, S. K. (2004).** A cellular RNA-binding protein enhances internal ribosomal entry site-dependent translation through an interaction downstream of the hepatitis C virus polyprotein initiation codon. *Mol Cell Biol* 24(18), 7878-90.
- Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pestova, T. V., and Hellen, C. U. (2003).** Eukaryotic initiation factors 4G and 4A mediate conformational changes downstream of the initiation codon of the encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site. *Mol Cell Biol* 23(2), 687-98.
- Kozak, M. (1978).** How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* 15(4), 1109-23.
- Kozak, M. (1986).** Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44(2), 283-92.
- Kuhn, R., Luz, N., and Beck, E. (1990).** Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 64(10), 4625-31.
- Kuhn, U., Gundel, M., Knoth, A., Kerwitz, Y., Rudel, S., and Wahle, E. (2009).** Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A)-binding protein regulating the interaction between poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. *J Biol Chem* 284(34), 22803-14.
- Kuhn, U., and Wahle, E. (2004).** Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1678(2-3), 67-84.
- Kunkel, M., Lorinczi, M., Rijnbrand, R., Lemon, S. M., and Watowich, S. J. (2001).** Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J Virol* 75(5), 2119-29.
- Lamphear, B. J., Kirchwegger, R., Skern, T., and Rhoads, R. E. (1995).** Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J Biol Chem* 270(37), 21975-83.
- Le, H., Tanguay, R. L., Balasta, M. L., Wei, C. C., Browning, K. S., Metz, A. M., Goss, D. J., and Gallie, D. R. (1997).** Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J Biol Chem* 272(26), 16247-55.
- Lee, Y. J., and Glaunsinger, B. A. (2009).** Aberrant herpesvirus-induced polyadenylation correlates with cellular messenger RNA destruction. *PLoS Biol* 7(5), e1000107.
- Lescar, J., Roussel, A., Wien, M. W., Navaza, J., Fuller, S. D., Wengler, G., and Rey, F. A. (2001).** The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell* 105(1), 137-48.
- Liao, H. J., Kobayashi, R., and Mathews, M. B. (1998).** Activities of adenovirus virus-associated RNAs: purification and characterization of RNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15), 8514-9.
- Lin, J. Y., and Simmons, D. T. (1991).** The ability of large T antigen to complex with p53 is necessary for the increased life span and partial transformation of human cells by simian virus 40. *J Virol* 65(12), 6447-53.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J. R., Coyne, C. B., and Wang, T. (2009).** Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83(4), 2011-4.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999).** Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285(5424), 110-3.
- Lomakin, I. B., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2000).** Physical association of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with eIF4A strongly enhances binding of eIF4G to the internal ribosomal entry site of

- encephalomyocarditis virus and is required for internal initiation of translation. *Mol Cell Biol* 20(16), 6019-29.
- Lopez de Quinto, S.**, and Martinez-Salas, E. (2000). Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *Rna* 6(10), 1380-92.
- Lopez-Lastra, M.**, Rivas, A., and Barria, M. I. (2005). Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res* 38(2-3), 121-46.
- Lozach, P. Y.**, Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Cosset, F. L., and Altmeyer, R. (2004). C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 279(31), 32035-45.
- Lu, H.**, Li, W., Noble, W. S., Payan, D., and Anderson, D. C. (2004). Riboproteomics of the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *J Proteome Res* 3(5), 949-57.
- Ludwig, I. S.**, Lekkerkerker, A. N., Depla, E., Bosman, F., Musters, R. J., Depraetere, S., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T. B. (2004). Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation. *J Virol* 78(15), 8322-32.
- Lukavsky, P. J.**, Otto, G. A., Lancaster, A. M., Sarnow, P., and Puglisi, J. D. (2000). Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nat Struct Biol* 7(12), 1105-10.
- Lundin, M.**, Monne, M., Widell, A., Von Heijne, G., and Persson, M. A. (2003). Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol* 77(9), 5428-38.
- Luo, G.** (1999). Cellular proteins bind to the poly(U) tract of the 3' untranslated region of hepatitis C virus RNA genome. *Virology* 256(1), 105-18.
- Luo, G.**, Xin, S., and 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(5), 3312-8.
- Ma, H.**, Leveque, V., De Witte, A., Li, W., Hendricks, T., Clausen, S. M., Cammack, N., and Klumpp, K. (2005). Inhibition of native hepatitis C virus replicase by nucleotide and non-nucleoside inhibitors. *Virology* 332(1), 8-15.
- MacDonald, C. C.**, Wilusz, J., and Shenk, T. (1994). The 64-kilodalton subunit of the CstF polyadenylation factor binds to pre-mRNAs downstream of the cleavage site and influences cleavage site location. *Mol Cell Biol* 14(10), 6647-54.
- Majumdar, R.**, Bandyopadhyay, A., and Maitra, U. (2003). Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex. *J Biol Chem* 278(8), 6580-7.
- Mandel, C. R.**, Bai, Y., and Tong, L. (2008). Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cell Mol Life Sci* 65(7-8), 1099-122.
- Mangus, D. A.**, Evans, M. C., and Jacobson, A. (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* 4(7), 223.
- Maquat, L. E.**, Tarn, W. Y., and Isken, O. The pioneer round of translation: features and functions. *Cell* 142(3), 368-74.
- Martineau, Y.**, Derry, M. C., Wang, X., Yanagiya, A., Berlanga, J. J., Shyu, A. B., Imataka, H., Gehring, K., and Sonenberg, N. (2008). Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Mol Cell Biol* 28(21), 6658-67.
- Marzluff, W. F.**, Wagner, E. J., and Duronio, R. J. (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet* 9(11), 843-54.

- Matuszyk, J., Ziolo, E., Cebrat, M., Kochel, I., and Strzadala, L. (2002).** Nurr1 affects pRL-TK but not phRG-B internal control plasmid in genetic reporter system. *Biochem Biophys Res Commun* 294(5), 1036-9.
- McCaffrey, A. P., Ohashi, K., Meuse, L., Shen, S., Lancaster, A. M., Lukavsky, P. J., Sarnow, P., and Kay, M. A. (2002).** Determinants of hepatitis C translational initiation in vitro, in cultured cells and mice. *Mol Ther* 5(6), 676-84.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S. D., Wickens, M., and Bentley, D. L. (1997).** The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385(6614), 357-61.
- McGivern, D. R., and Lemon, S. M. (2009).** Tumor suppressors, chromosomal instability, and hepatitis C virus-associated liver cancer. *Annu Rev Pathol* 4, 399-415.
- Merrill, M. K., Dobrikova, E. Y., and Gromeier, M. (2006).** Cell-type-specific repression of internal ribosome entry site activity by double-stranded RNA-binding protein 76. *J Virol* 80(7), 3147-56.
- Meyer, K., Petersen, A., Niepmann, M., and Beck, E. (1995).** Interaction of eukaryotic initiation factor eIF-4B with a picornavirus internal translation initiation site. *J Virol* 69(5), 2819-24.
- Meyer, S., Temme, C., and Wahle, E. (2004).** Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39(4), 197-216.
- Michel, Y. M., Borman, A. M., Paulous, S., and Kean, K. M. (2001).** Eukaryotic initiation factor 4G-poly(A) binding protein interaction is required for poly(A) tail-mediated stimulation of picornavirus internal ribosome entry segment-driven translation but not for X-mediated stimulation of hepatitis C virus translation. *Mol Cell Biol* 21(13), 4097-109.
- Michel, Y. M., Poncet, D., Piron, M., Kean, K. M., and Borman, A. M. (2000).** Cap-Poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *J Biol Chem* 275(41), 32268-76.
- Mikulasova, A., Vareckova, E., and Fodor, E. (2000).** Transcription and replication of the influenza A virus genome. *Acta Virol* 44(5), 273-82.
- Monazahian, M., Bohme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S., and Thomssen, R. (1999).** Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* 57(3), 223-9.
- Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C. M. (2007).** Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5(6), 453-63.
- Muckenthaler, M., Gunkel, N., Stripecke, R., and Hentze, M. W. (1997).** Regulated poly(A) tail shortening in somatic cells mediated by cap-proximal translational repressor proteins and ribosome association. *Rna* 3(9), 983-95.
- Mulholland, D. J., Cox, M., Read, J., Rennie, P., and Nelson, C. (2004).** Androgen responsiveness of Renilla luciferase reporter vectors is promoter, transgene, and cell line dependent. *Prostate* 59(2), 115-9.
- Munroe, D., and Jacobson, A. (1990).** mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Mol Cell Biol* 10(7), 3441-55.
- Munroe, D., and Jacobson, A. (1990).** Tales of poly(A): a review. *Gene* 91(2), 151-8.
- Murakami, K., Abe, M., Kageyama, T., Kamoshita, N., and 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(4), 729-41.
- Murthy, K. G., and Manley, J. L. (1995).** The 160-kD subunit of human cleavage-polyadenylation specificity factor coordinates pre-mRNA 3'-end formation. *Genes Dev* 9(21), 2672-83.

- Nevins, J. R., and Joklik, W. K. (1977).** Isolation and partial characterization of the poly(A) polymerases from HeLa cells infected with vaccinia virus. *J Biol Chem* 252(19), 6939-47.
- Niepmann, M. (2009).** Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochim Biophys Acta* 1789(9-10), 529-41.
- Nomoto, A., Lee, Y. F., and Wimmer, E. (1976).** The 5' end of poliovirus mRNA is not capped with m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')Np. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(2), 375-80.
- Ochs, K., Saleh, L., Bassili, G., Sonntag, V. H., Zeller, A., and Niepmann, M. (2002).** Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus internal ribosome entry site. *J Virol* 76(5), 2113-22.
- Orkin, S. H., Cheng, T. C., Antonarakis, S. E., and Kazazian, H. H., Jr. (1985).** Thalassemia due to a mutation in the cleavage-polyadenylation signal of the human beta-globin gene. *Embo J* 4(2), 453-6.
- Otero, L. J., Ashe, M. P., and Sachs, A. B. (1999).** The yeast poly(A)-binding protein Pab1p stimulates in vitro poly(A)-dependent and cap-dependent translation by distinct mechanisms. *Embo J* 18(11), 3153-63.
- Pacheco, A., and Martinez-Salas, E. Insights into the biology of IRES elements through riboproteomic approaches. *J Biomed Biotechnol* 2010, 458927.**
- Pacheco, A., Reigadas, S., and 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(22), 4782-90.
- Paek, K. Y., Kim, C. S., Park, S. M., Kim, J. H., and Jang, S. K. (2008).** RNA-binding protein hnRNP D modulates internal ribosome entry site-dependent translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 82(24), 12082-93.
- Park, H. G., Yoon, J. Y., and Choi, M. (2007).** Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D/AUF1 interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *J Biosci* 32(7), 1263-72.
- Parker, R., and Song, H. (2004).** The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 11(2), 121-7.
- Patel, G. P., Ma, S., and Bag, J. (2005).** The autoregulatory translational control element of poly(A)-binding protein mRNA forms a heteromeric ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res* 33(22), 7074-89.
- Patton, J. G., Mayer, S. A., Tempst, P., and Nadal-Ginard, B. (1991).** Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing. *Genes Dev* 5(7), 1237-51.
- Paulous, S., Malnou, C. E., Michel, Y. M., Kean, K. M., and Borman, A. M. (2003).** Comparison of the capacity of different viral internal ribosome entry segments to direct translation initiation in poly(A)-dependent reticulocyte lysates. *Nucleic Acids Res* 31(2), 722-33.
- Pause, A., and Sonenberg, N. (1992).** Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *Embo J* 11(7), 2643-54.
- Pawlotsky, J. M. (2006).** [New therapeutic strategies in chronic hepatitis C]. *Gastroenterol Clin Biol* 30(8-9), 1009-11.
- Pawlotsky, J. M., and McHutchison, J. G. (2004).** Hepatitis C. Development of new drugs and clinical trials: promises and pitfalls. Summary of an AASLD hepatitis single topic conference, Chicago, IL, February 27-March 1, 2003. *Hepatology* 39(2), 554-67.
- Pelletier, J., Kaplan, G., Racaniello, V. R., and Sonenberg, N. (1988).** Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5' noncoding region. *Mol Cell Biol* 8(3), 1103-12.

- Pelletier, J.**, and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334(6180), 320-5.
- Peng, J.**, Murray, E. L., and Schoenberg, D. R. (2008). In vivo and in vitro analysis of poly(A) length effects on mRNA translation. *Methods Mol Biol* 419, 215-30.
- Penin, F.**, Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H. E., Bartenschlager, R., and Moradpour, D. (2004). Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 279(39), 40835-43.
- Perrault, M.**, and Pecheur, E. I. (2009). The hepatitis C virus and its hepatic environment: a toxic but finely tuned partnership. *Biochem J* 423(3), 303-14.
- Pestova, T. V.**, Borukhov, S. I., and Hellen, C. U. (1998). Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* 394(6696), 854-9.
- Pestova, T. V.**, and Kolupaeva, V. G. (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* 16(22), 2906-22.
- Pestova, T. V.**, Lomakin, I. B., Lee, J. H., Choi, S. K., Dever, T. E., and Hellen, C. U. (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403(6767), 332-5.
- Pestova, T. V.**, Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J., and Hellen, C. U. (1998). 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(1), 67-83.
- Pileri, P.**, Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., and Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282(5390), 938-41.
- Pilipenko, E. V.**, Blinov, V. M., Romanova, L. I., Sinyakov, A. N., Maslova, S. V., and Agol, V. I. (1989). Conserved structural domains in the 5'-untranslated region of picornaviral genomes: an analysis of the segment controlling translation and neurovirulence. *Virology* 168(2), 201-9.
- Pilipenko, E. V.**, Gmyl, A. P., Maslova, S. V., Belov, G. A., Sinyakov, A. N., Huang, M., Brown, T. D., and Agol, V. I. (1994). Starting window, a distinct element in the cap-independent internal initiation of translation on picornaviral RNA. *J Mol Biol* 241(3), 398-414.
- Pilipenko, E. V.**, Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Khitrina, E. V., Poperechnaya, A. N., Agol, V. I., and Hellen, C. U. (2000). A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes Dev* 14(16), 2028-45.
- Pisarev, A. V.**, Chard, L. S., Kaku, Y., Johns, H. L., Shatsky, I. N., and Belsham, G. J. (2004). Functional and structural similarities between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and porcine teschovirus, a picornavirus. *J Virol* 78(9), 4487-97.
- Polacek, C.**, Friebe, P., and Harris, E. (2009). Poly(A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *J Gen Virol* 90(Pt 3), 687-92.
- Poole, T. L.**, Wang, C., Popp, R. A., Potgieter, L. N., Siddiqui, A., and Collett, M. S. (1995). Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* 206(1), 750-4.
- Poyry, T. A.**, Hentze, M. W., and Jackson, R. J. (2001). Construction of regulatable picornavirus IRESes as a test of current models of the mechanism of internal translation initiation. *Rna* 7(5), 647-60.
- Preiss, T.**, and Hentze, M. W. (1998). Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast. *Nature* 392(6675), 516-20.



- Prevot, D., Darlix, J. L., and Ohlmann, T. (2003).** Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* 95(3-4), 141-56.
- Prevot, D., Decimo, D., Herbreteau, C. H., Roux, F., Garin, J., Darlix, J. L., and Ohlmann, T. (2003).** Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4G1 critical for ribosomal scanning. *Embo J* 22(8), 1909-21.
- Proudfoot, N. (1991).** Poly(A) signals. *Cell* 64(4), 671-4.
- Proudfoot, N. J., and Brownlee, G. G. (1976).** 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* 263(5574), 211-4.
- Pyronnet, S., Dostie, J., and Sonenberg, N. (2001).** Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev* 15(16), 2083-93.
- Pyronnet, S., Pradayrol, L., and Sonenberg, N. (2000).** A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5(4), 607-16.
- Raabe, T., Billum, F. J., and Manley, J. L. (1991).** Primary structure and expression of bovine poly(A) polymerase. *Nature* 353(6341), 229-34.
- Rijnbrand, R., van der Straaten, T., van Rijn, P. A., Spaan, W. J., and Bredenbeek, P. J. (1997).** Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J Virol* 71(1), 451-7.
- Robert, F., Kapp, L. D., Khan, S. N., Acker, M. G., Koltz, S., Kazemi, S., Kaufman, R. J., Merrick, W. C., Koromilas, A. E., Lorsch, J. R., and Pelletier, J. (2006).** Initiation of protein synthesis by hepatitis C virus is refractory to reduced eIF2.GTP.Met-tRNA(i)(Met) ternary complex availability. *Mol Biol Cell* 17(11), 4632-44.
- Roingeard, P., Hourieux, C., Blanchard, E., Brand, D., and Ait-Goughoulte, M. (2004).** Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol Cell* 96(2), 103-8.
- Romero-Lopez, C., and Berzal-Herranz, A. (2009).** A long-range RNA-RNA interaction between the 5' and 3' ends of the HCV genome. *Rna* 15(9), 1740-52.
- 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., and 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(5), 1759-63.
- Ruegsegger, U., Beyer, K., and Keller, W. (1996).** Purification and characterization of human cleavage factor Im involved in the 3' end processing of messenger RNA precursors. *J Biol Chem* 271(11), 6107-13.
- Sachs, A. (2000).** Physical and functional interactions between the mRNA cap structure and the poly(A) tail. Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB, eds. *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sachs, A. B., Davis, R. W., and Kornberg, R. D. (1987).** A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol Cell Biol* 7(9), 3268-76.
- Sachs, A. B., Sarnow, P., and Hentze, M. W. (1997).** Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* 89(6), 831-8.
- Sachs, A. B., and Varani, G. (2000).** Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nat Struct Biol* 7(5), 356-61.

- Saleh, L., Rust, R. C., Fullkrug, R., Beck, E., Bassili, G., Ochs, K., and 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(Pt 4), 757-63.
- Sasaki, J., and Nakashima, N. (1999).** Translation initiation at the CUU codon is mediated by the internal ribosome entry site of an insect picorna-like virus in vitro. *J Virol* 73(2), 1219-26.
- Sasaki, J., and Nakashima, N. (2000).** Methionine-independent initiation of translation in the capsid protein of an insect RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4), 1512-5.
- Sato, K., Okamoto, H., Aihara, S., Hoshi, Y., Tanaka, T., and Mishiro, S. (1993).** Demonstration of sugar moiety on the surface of hepatitis C virions recovered from the circulation of infected humans. *Virology* 196(1), 354-7.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002).** The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* 21(19), 5017-25.
- Schafer, K. A. (1998).** The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 35(6), 461-78.
- Seal, R., Temperley, R., Wilusz, J., Lightowlers, R. N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2005).** Serum-deprivation stimulates cap-binding by PARN at the expense of eIF4E, consistent with the observed decrease in mRNA stability. *Nucleic Acids Res* 33(1), 376-87.
- Searfoss, A., Dever, T. E., and Wickner, R. (2001).** Linking the 3' poly(A) tail to the subunit joining step of translation initiation: relations of Pab1p, eukaryotic translation initiation factor 5b (Fun12p), and Ski2p-Slh1p. *Mol Cell Biol* 21(15), 4900-8.
- Shadan, F. F., Cowser, L. M., and Villarreal, L. P. (1994).** n-Butyrate, a cell cycle blocker, inhibits the replication of polyomaviruses and papillomaviruses but not that of adenoviruses and herpesviruses. *J Virol* 68(8), 4785-96.
- Shi, S. T., and Lai, M. M. C. (2006).** HCV 5' and 3'UTR: When Translation Meets Replication.
- Shi, S. T., Lee, K. J., Aizaki, H., Hwang, S. B., and Lai, M. M. (2003).** Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *J Virol* 77(7), 4160-8.
- Shimoike, T., Mimori, S., Tani, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. (1999).** Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol* 73(12), 9718-25.
- Sizova, D. V., Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V., Shatsky, I. N., and 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(6), 4775-82.
- Sokoloski, K. J., Chaskey, E. L., and Wilusz, J. (2009).** Virus-mediated mRNA decay by hyperadenylation. *Genome Biol* 10(8), 234.
- Sonenberg, N. (1988).** Cap-binding proteins of eukaryotic messenger RNA: functions in initiation and control of translation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35, 173-207.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A. G. (2007).** New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Mol Cell* 28(5), 721-9.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A. G. (2009).** Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136(4), 731-45.
- Sonenberg, N., Rupprecht, K. M., Hecht, S. M., and Shatkin, A. J. (1979).** Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on sepharose-coupled m<sup>7</sup>GDP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9), 4345-9.

- Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Junemann, C., Bartenschlager, R., and Niepmann, M. (2006).** The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol* 80(23), 11579-88.
- Song, Y., Tzima, E., Ochs, K., Bassili, G., Trusheim, H., Linder, M., Preissner, K. T., and Niepmann, M. (2005).** Evidence for an RNA chaperone function of polypyrimidine tract-binding protein in picornavirus translation. *Rna* 11(12), 1809-24.
- Soto Rifo, R., Ricci, E. P., Decimo, D., Moncorge, O., and Ohlmann, T. (2007).** Back to basics: the untreated rabbit reticulocyte lysate as a competitive system to recapitulate cap/poly(A) synergy and the selective advantage of IRES-driven translation. *Nucleic Acids Res* 35(18), e121.
- Spahn, C. M., Kieft, J. S., Grassucci, R. A., Penczek, P. A., Zhou, K., Doudna, J. A., and Frank, J. (2001).** Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 291(5510), 1959-62.
- Spangberg, K., and Schwartz, S. (1999).** Poly(C)-binding protein interacts with the hepatitis C virus 5' untranslated region. *J Gen Virol* 80 ( Pt 6), 1371-6.
- Suzuki, T., Ishii, K., Aizaki, H., and Wakita, T. (2007).** Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev* 59(12), 1200-12.
- Svitkin, Y. V., Imataka, H., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Liebig, H. D., and Sonenberg, N. (2001).** Poly(A)-binding protein interaction with eIF4G stimulates picornavirus IRES-dependent translation. *Rna* 7(12), 1743-52.
- Tai, C. L., Chi, W. K., Chen, D. S., and Hwang, L. H. (1996).** The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol* 70(12), 8477-84.
- Takagaki, Y., Ryner, L. C., and Manley, J. L. (1988).** Separation and characterization of a poly(A) polymerase and a cleavage/specificity factor required for pre-mRNA polyadenylation. *Cell* 52(5), 731-42.
- Takagaki, Y., Ryner, L. C., and Manley, J. L. (1989).** Four factors are required for 3'-end cleavage of pre-mRNAs. *Genes Dev* 3(11), 1711-24.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Sugiyama, K., and Shimotohno, K. (1996).** Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 70(5), 3307-12.
- Tanguay, R. L., and Gallie, D. R. (1996).** The effect of the length of the 3'-untranslated region on expression in plants. *FEBS Lett* 394(3), 285-8.
- Tanguay, R. L., and Gallie, D. R. (1996).** Translational efficiency is regulated by the length of the 3' untranslated region. *Mol Cell Biol* 16(1), 146-56.
- Tarun, S. Z., Jr., and Sachs, A. B. (1995).** A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes Dev* 9(23), 2997-3007.
- Tarun, S. Z., Jr., and Sachs, A. B. (1996).** Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *Embo J* 15(24), 7168-77.
- Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., and Shatsky, I. N. (2008).** Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat Struct Mol Biol* 15(8), 836-41.
- Thavathiru, E., and Das, G. M. (2001).** Activation of pRL-TK by 12S E1A oncoprotein: drawbacks of using an internal reference reporter in transcription assays. *Biotechniques* 31(3), 528-30, 532.
- Thomas, M., Massimi, P., and Banks, L. (1996).** HPV-18 E6 inhibits p53 DNA binding activity regardless of the oligomeric state of p53 or the exact p53 recognition sequence. *Oncogene* 13(3), 471-80.

- Tischendorf**, J. J., Beger, C., Korf, M., Manns, M. P., and Kruger, M. (2004). Polypyrimidine tract-binding protein (PTB) inhibits Hepatitis C virus internal ribosome entry site (HCV IRES)-mediated translation, but does not affect HCV replication. *Arch Virol* 149(10), 1955-70.
- Tsuchihara**, K., Tanaka, T., Hijikata, M., Kuge, S., Toyoda, H., Nomoto, A., Yamamoto, N., and 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(9), 6720-6.
- Tsukiyama-Kohara**, K., Iizuka, N., Kohara, M., and Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66(3), 1476-83.
- Tu**, H., Gao, L., Shi, S. T., Taylor, D. R., Yang, T., Mircheff, A. K., Wen, Y., Gorbalenya, A. E., Hwang, S. B., and Lai, M. M. (1999). Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* 263(1), 30-41.
- Uchida**, N., Hoshino, S., Imataka, H., Sonenberg, N., and Katada, T. (2002). A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J Biol Chem* 277(52), 50286-92.
- Vagner**, S., Gensac, M. C., Maret, A., Bayard, F., Amalric, F., Prats, H., and Prats, A. C. (1995). Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol Cell Biol* 15(1), 35-44.
- Vagner**, S., Waysbort, A., Marenda, M., Gensac, M. C., Amalric, F., and Prats, A. C. (1995). Alternative translation initiation of the Moloney murine leukemia virus mRNA controlled by internal ribosome entry involving the p57/PTB splicing factor. *J Biol Chem* 270(35), 20376-83.
- Venkatesan**, A., Sharma, R., and Dasgupta, A. (2003). Cell cycle regulation of hepatitis C and encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site-mediated translation in human embryonic kidney 293 cells. *Virus Res* 94(2), 85-95.
- Vera-Otarola**, J., Soto-Rifo, R., Ricci, E. P., Ohlmann, T., Darlix, J. L., and Lopez-Lastra, M. The 3' untranslated region of the Andes hantavirus small mRNA functionally replaces the poly(A) tail and stimulates cap-dependent translation initiation from the viral mRNA. *J Virol* 84(19), 10420-4.
- Vesuna**, F., Winnard, P., Jr., and Raman, V. (2005). Enhanced green fluorescent protein as an alternative control reporter to Renilla luciferase. *Anal Biochem* 342(2), 345-7.
- Vousden**, K. H. (1995). Regulation of the cell cycle by viral oncoproteins. *Semin Cancer Biol* 6(2), 109-16.
- Vousden**, K. H., and Farrell, P. J. (1994). Viruses and human cancer. *Br Med Bull* 50(3), 560-81.
- Wahle**, E. (1995). 3'-end cleavage and polyadenylation of mRNA precursors. *Biochim Biophys Acta* 1261(2), 183-94.
- Wahle**, E. (1995). Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. *J Biol Chem* 270(6), 2800-8.
- Wahle**, E., and Keller, W. (1992). The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem* 61, 419-40.
- Wahle**, E., and Keller, W. (1996). The biochemistry of polyadenylation. *Trends Biochem Sci* 21(7), 247-50.
- Wahle**, E., and Kuhn, U. (1997). The mechanism of 3' cleavage and polyadenylation of eukaryotic pre-mRNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 57, 41-71.
- Wahle**, E., Lustig, A., Jenö, P., and Maurer, P. (1993). Mammalian poly(A)-binding protein II. Physical properties and binding to polynucleotides. *J Biol Chem* 268(4), 2937-45.

- Wahle**, E., Martin, G., Schiltz, E., and Keller, W. (1991). Isolation and expression of cDNA clones encoding mammalian poly(A) polymerase. *Embo J* 10(13), 4251-7.
- Wakita**, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., and Liang, T. J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11(7), 791-6.
- Wakiyama**, M., Futami, T., and Miura, K. (1997). Poly(A) dependent translation in rabbit reticulocyte lysate. *Biochimie* 79(12), 781-5.
- Walewski**, J. L., Keller, T. R., Stump, D. D., and Branch, A. D. (2001). Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *Rna* 7(5), 710-21.
- Wang**, C., Le, S. Y., Ali, N., and Siddiqui, A. (1995). An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *Rna* 1(5), 526-37.
- Wei**, C. C., Balasta, M. L., Ren, J., and Goss, D. J. (1998). Wheat germ poly(A) binding protein enhances the binding affinity of eukaryotic initiation factor 4F and (iso)4F for cap analogues. *Biochemistry* 37(7), 1910-6.
- Weinlich**, S., Huttelmaier, S., Schierhorn, A., Behrens, S. E., Ostareck-Lederer, A., and Ostareck, D. H. (2009). IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *Rna* 15(8), 1528-42.
- Wells**, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D., and Sachs, A. B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* 2(1), 135-40.
- Wickens**, M., Kimble, J., and Strickland, S. (1996). "Translational Control of Developmental Decisions." Translational Control Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wilson**, J. E., Powell, M. J., Hoover, S. E., and Sarnow, P. (2000). Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol Cell Biol* 20(14), 4990-9.
- Wilusz**, J., Shenk, T., Takagaki, Y., and Manley, J. L. (1990). A multicomponent complex is required for the AAUAAA-dependent cross-linking of a 64-kilodalton protein to polyadenylation substrates. *Mol Cell Biol* 10(3), 1244-8.
- Yagnik**, A. T., Lahm, A., Meola, A., Roccasecca, R. M., Ercole, B. B., Nicosia, A., and Tramontano, A. (2000). A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins* 40(3), 355-66.
- Yasui**, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S. I., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J. R., and Kohara, M. (1998). The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 72(7), 6048-55.
- Yi**, M., and Lemon, S. M. (2003). 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 77(6), 3557-68.
- Yi**, M., and Lemon, S. M. (2003). Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *Rna* 9(3), 331-45.
- Yu**, K. L., Jang, S. I., and You, J. C. (2009). Identification of in vivo interaction between Hepatitis C Virus core protein and 5' and 3' UTR RNA. *Virus Res* 145(2), 285-92.
- Zell**, R., Dauber, M., Krumbholz, A., Henke, A., Birch-Hirschfeld, E., Stelzner, A., Prager, D., and Wurm, R. (2001). Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. *J Virol* 75(4), 1620-31.

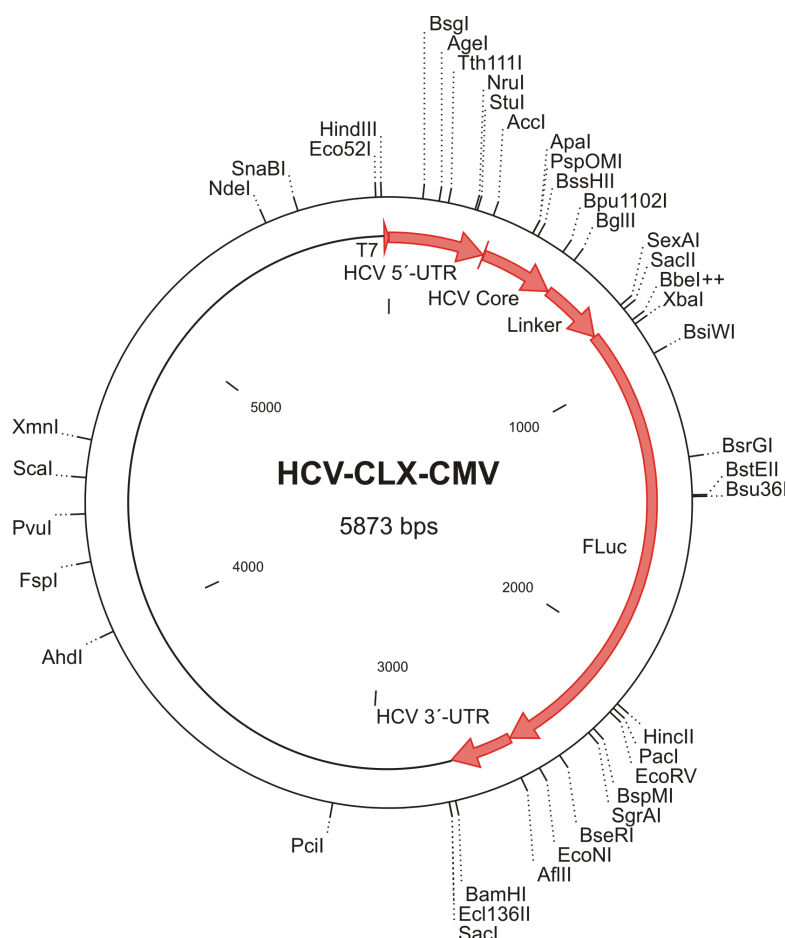
**Zhao**, J., Hyman, L., and Moore, C. (1999). Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(2), 405-45.

**Zhao**, W., and Manley, J. L. (1996). Complex alternative RNA processing generates an unexpected diversity of poly(A) polymerase isoforms. *Mol Cell Biol* 16(5), 2378-86.

**Zhong**, W., Uss, A. S., Ferrari, E., Lau, J. Y., and Hong, Z. (2000). De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J Virol* 74(4), 2017-22.

## Organisation des Plasmids HCV-CLX-CMV

Plasmid zur Herstellung der HCV Reporter-RNAs mit HCV IRES und HCV 3'-UTR. Die Erzeugung der DNA-Matrize für die Transkription der Reporter RNA erfolgt mit Hilfe einer PCR, welche ein exaktes 3'-Ende generiert. Die wichtigsten Elemente sind der T7-Promotor, die HCV 5'-UTR, ein Teil des Core-kodierenden Bereichs, eine Ubiquitin-Sequenz, das Firefly Luciferase Gen und die HCV 3'-UTR. Die Karte zeigt außerdem die Erkennungssequenzen aller einfachen Restriktionsschnittstellen im Plasmid.

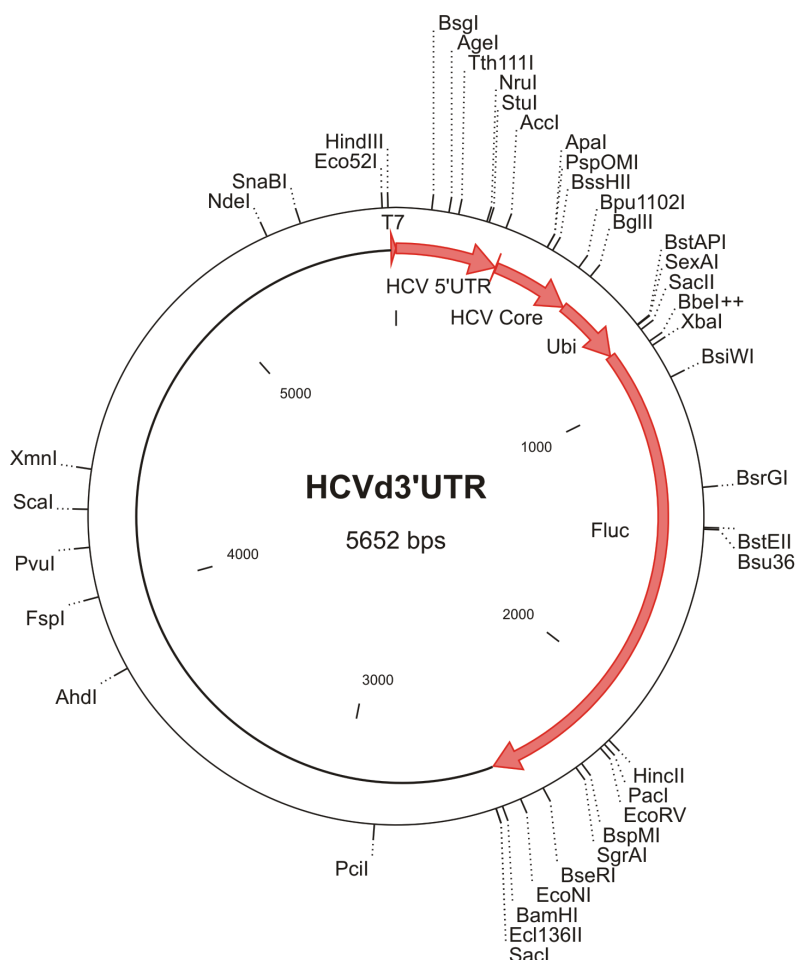


### Plasmidbeschreibung:

Region	Start (nt)	Ende (nt)
HCV 5'-UTR	1	341
HCV Core	345	606
Ubiquitin-Linker	607	836
Firefly Luciferase	837	2489
HCV 3'-UTR	2490	2710
Plasmidsequenz	2711	5855
T7-Promotor	5856	5873

## Organisation des Plasmids HCV d3'-UTR

Plasmid zur Herstellung der HCV Reporter-RNAs mit HCV IRES und der unspezifischen Plasmidsequenz am 3'-Ende. Dieses Plasmid ist mit Ausnahme der HCV 3'-UTR, welche hier deletiert wurde, identisch mit dem Plasmid HCV-CLX-CMV. Die Generierung der DNA-Matrize für die Transkription der Reporter RNA erfolgt mit Hilfe einer PCR, in welcher der reverse Primer ca. 220 Nukleotide nach der Sequenz der Firefly Luciferase paart. Die Karte zeigt außerdem die Erkennungssequenzen aller einfachen Restriktionsschnittstellen im Plasmid.



### Plasmidbeschreibung:

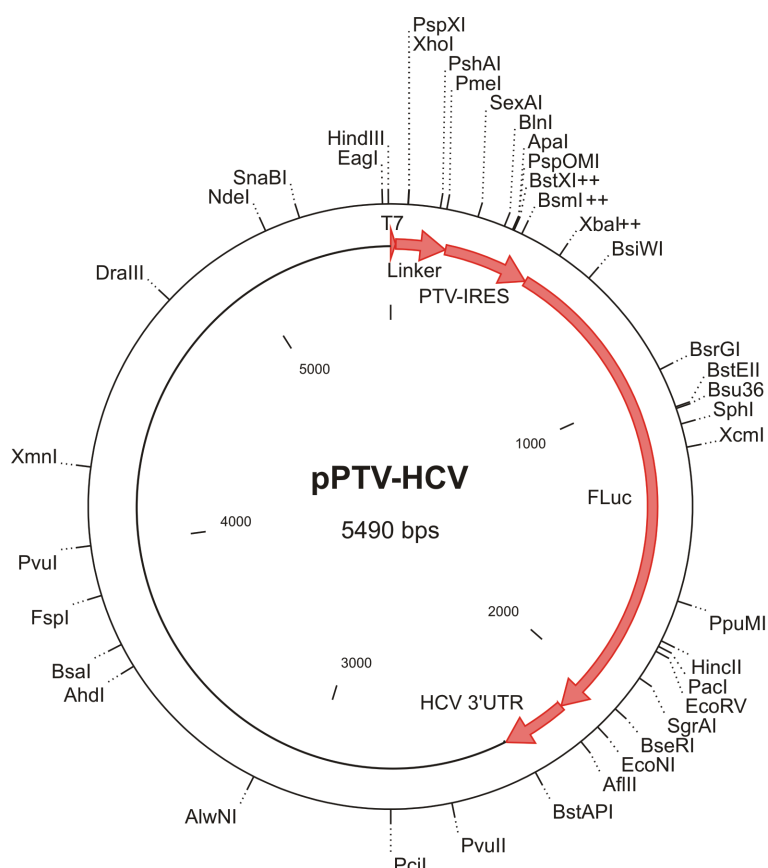
Region	Start (nt)	Ende (nt)
HCV 5'-UTR	1	341
HCV Core	345	606
Ubiquitin-Linker	607	836
Firefly Luciferase	837	2489
Plasmidsequenz	2711	5634
T7-Promotor	5635	5652



## Organisation des Plasmids pPTV-HCV

Plasmid zur Herstellung der PTV IRES Reporter-RNAs mit HCV 3'-UTR. Die Erzeugung der DNA-Matrize für die Transkription der Reporter RNA erfolgt mit Hilfe einer PCR, welche ein exaktes 3'-Ende generiert. Die wichtigsten Elemente sind der T7-Promotor, die PTV IRES, das Firefly Luciferase Gen und die HCV 3'-UTR. Die Karte zeigt außerdem die Erkennungssequenzen aller einfachen Restriktionsschnittstellen im Plasmid.

Die Sequenz des Plasmids PTV d3'-UTR (hier nicht dargestellt) entspricht dem Plasmid pPTV-HCV, allerdings wurde dort wie für das Plasmid HCV d3'-UTR gezeigt, die HCV 3'-UTR deletiert.



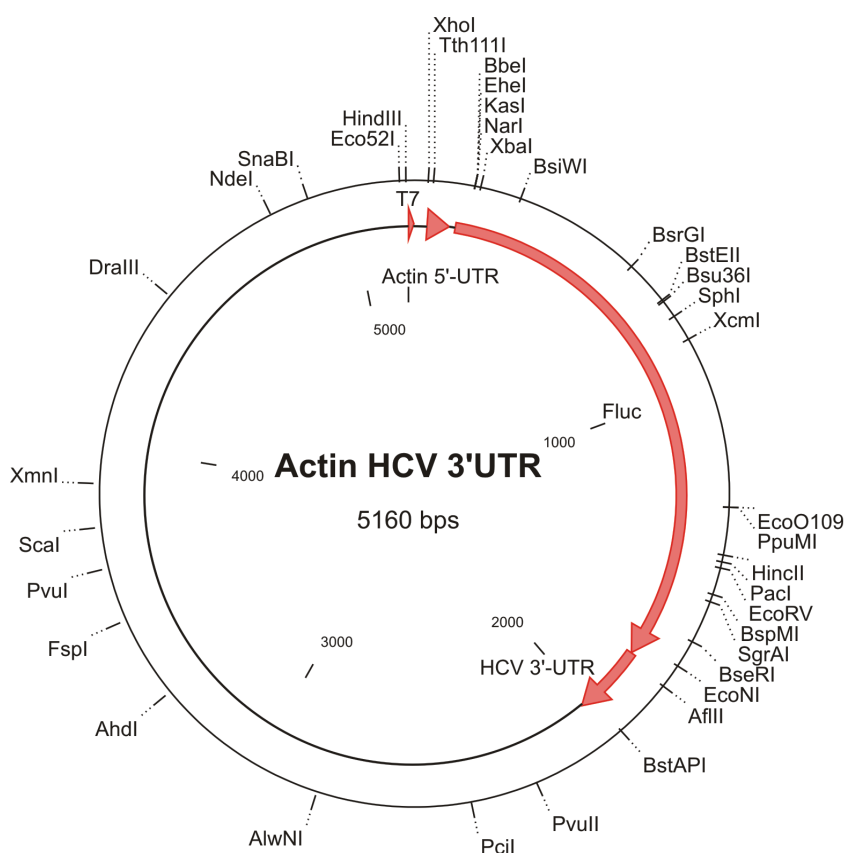
### Plasmidbeschreibung:

Region	Start (nt)	Ende (nt)
T7-Promotor	1	17
Linker	18	184
PTV-IRES	185	471
Firefly Luciferase	472	2125
HCV 3'-UTR	2126	2346
Plasmidsequenz	2347	5490

## Organisation des Plasmids Actin HCV 3'-UTR

Plasmid zur Herstellung der Beta-Actin 5'-UTR Reporter-RNAs mit HCV 3'-UTR. Die Erzeugung der DNA-Matrize für die Transkription der Reporter RNA erfolgt mit Hilfe einer PCR, welche ein exaktes 3'-Ende generiert. Die wichtigsten Elemente sind der T7-Promotor, die 5'-UTR von Beta-Actin, das Firefly Luciferase Gen und die HCV 3'-UTR. Die Karte zeigt außerdem die Erkennungssequenzen aller einfachen Restriktionsschnittstellen im Plasmid.

Die Sequenz des Plasmids Actin d3'-UTR (hier nicht dargestellt) entspricht dem Plasmid Actin HCV 3'-UTR, allerdings wurde dort wie für das Plasmid HCV d3'-UTR gezeigt, die HCV 3'-UTR deletiert.

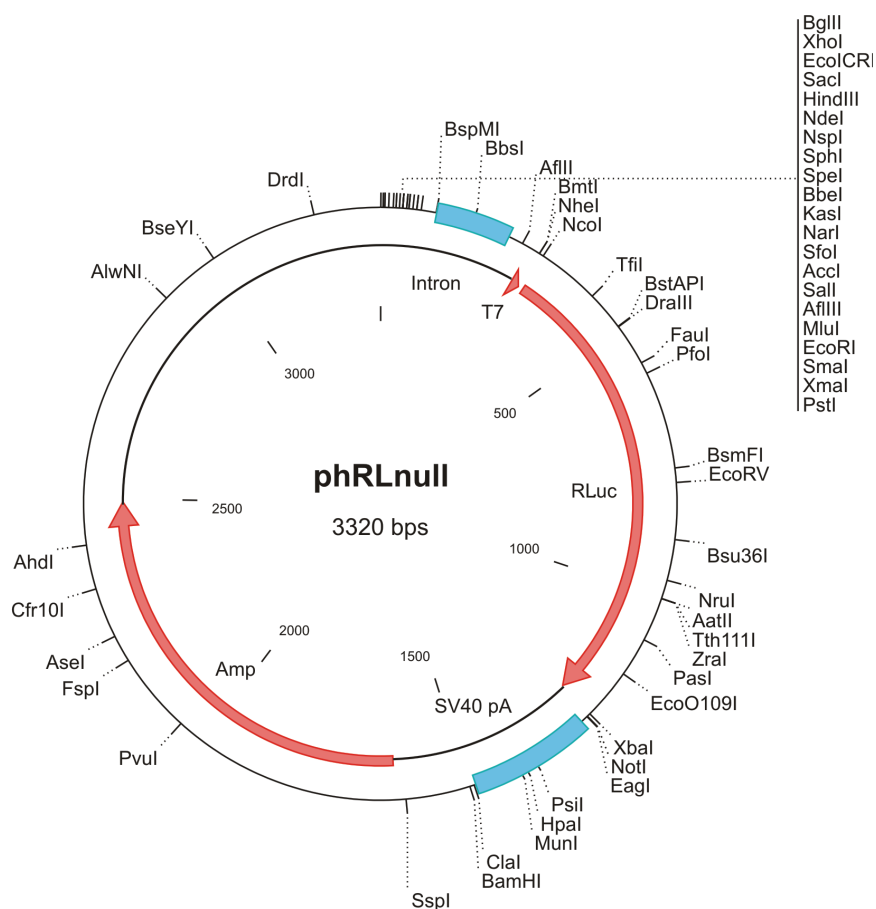


### Plasmidbeschreibung:

Region	Start (nt)	Ende (nt)
T7-Promotor	1	17
Linker-Sequenz	18	56
Beta-Actin 5'-UTR	57	124
Firefly Luciferase	142	1795
HCV 3'-UTR	1796	2015
Plasmidsequenz	2016	5160

## Organisation des Plasmids pHRLnull

Plasmid zur Herstellung der Renilla Luciferase Reporter-RNA. Das Plasmid enthält unter anderem eine T7-Promotorsequenz und das Gen der Renilla Luciferase. Darauf folgen SV40-Polyadenylierungssignale für eine effiziente Expression des Plasmids in Zellkultur. Als Selektionsmarker codiert das Plasmid eine Ampicillinresistenz. Die Karte zeigt außerdem die Erkennungssequenzen aller einfachen Restriktionsschnittstellen im Plasmid.



### Plasmidbeschreibung:

Region	Start (nt)	Ende (nt)
Intron	101	237
T7-Promotor	281	299
Renilla Luciferase	309	1244
SV40 pA	1266	1487
Amp	1634	2494

## Annotierte Sequenz der HCV Reporter-Plasmide

Vollständige Sequenzen der Plasmide HCV-CLX-CMV und HCV d3'-UTR mit Abgabe der Sequenzabschnitte.

```

HCV-CLX-CMV      GCCAGCCCCC GATTGGGGGC GACTACTCCAC CATAGATCAC TCCCCTGTGA
HCVd3_-UTR      GCCAGCCCCC GATTGGGGGC GACTACTCCAC CATAGATCAC TCCCCTGTGA
>>.....HCV 5'-UTR.....>
HCV-CLX-CMV      GGAAGCTACTG TCTTCACGCA GAAAGCGTCT AGCCATGGCG TTAGTATGAG
HCVd3_-UTR      GGAAGCTACTG TCTTCACGCA GAAAGCGTCT AGCCATGGCG TTAGTATGAG
>.....HCV 5'-UTR.....>
HCV-CLX-CMV      TGTCGTGCAG CCTCCAGGAC CCCCCCTCC  CGGGAGAGCC ATAGTGGTCT
HCVd3_-UTR      TGTCGTGCAG CCTCCAGGAC CCCCCCTCC  CGGGAGAGCC ATAGTGGTCT
>.....HCV 5'-UTR.....>
HCV-CLX-CMV      GCGGAACCGG TGAGTACACC GGAATTGCCA GGATGACCGG GTCCTTTCTT
HCVd3_-UTR      GCGGAACCGG TGAGTACACC GGAATTGCCA GGATGACCGG GTCCTTTCTT
>.....HCV 5'-UTR.....>
HCV-CLX-CMV      GGATCAACCC GCTCAATGCC TGGAGATTG  GCGGTGCCCC CGCGAGACTG
HCVd3_-UTR      GGATCAACCC GCTCAATGCC TGGAGATTG  GCGGTGCCCC CGCGAGACTG
>.....HCV 5'-UTR.....>
HCV-CLX-CMV      CTAGCCGAGT AGTGTGGGT  CGCGAAAGGC CTTGTGGTAC TGCCTGATAG
HCVd3_-UTR      CTAGCCGAGT AGTGTGGGT  CGCGAAAGGC CTTGTGGTAC TGCCTGATAG
>.....HCV 5'-UTR.....>
HCV-CLX-CMV      GGTGCTTGCG AGTGCCCCGG GAGGTCTCGT AGACCGTGCA CCATGAGCAC
HCVd3_-UTR      GGTGCTTGCG AGTGCCCCGG GAGGTCTCGT AGACCGTGCA CCATGAGCAC
>.....HCV 5'-UTR.....>>.....>
HCV-CLX-CMV      GAATCCTAAA CCTCAAAGAA AAACCAAACG TAACACCAAC CGCCGCCAC
HCVd3_-UTR      GAATCCTAAA CCTCAAAGAA AAACCAAACG TAACACCAAC CGCCGCCAC
>.....HCV Core.....>
HCV-CLX-CMV      AGGACGTCAA GTTCCCAGGC GGTGGTCAGA TCGTTGGTGG AGTTTACCTG
HCVd3_-UTR      AGGACGTCAA GTTCCCAGGC GGTGGTCAGA TCGTTGGTGG AGTTTACCTG
>.....HCV Core.....>
HCV-CLX-CMV      TTGCCGCGCA GGGGCCCCAG GTTGGGTGTG CGCGCGACTA GGAAGACTTC
HCVd3_-UTR      TTGCCGCGCA GGGGCCCCAG GTTGGGTGTG CGCGCGACTA GGAAGACTTC
>.....HCV Core.....>
HCV-CLX-CMV      CGAGCGGTTCG CAACCTCGTG GAAGGCGACA ACCTATCCCC AAGGCTCGCC
HCVd3_-UTR      CGAGCGGTTCG CAACCTCGTG GAAGGCGACA ACCTATCCCC AAGGCTCGCC
>.....HCV Core.....>
HCV-CLX-CMV      AGCCCGAGGG CAGGGCCTGG GCTCAGCCCG GGTACCCTTG GCCCCTCTAT
HCVd3_-UTR      AGCCCGAGGG CAGGGCCTGG GCTCAGCCCG GGTACCCTTG GCCCCTCTAT
>.....HCV Core.....>
HCV-CLX-CMV      GGCAATGGCA TGCAGATCTT CATGAAGACC CTGACGGGCA AGACCATCAC
HCVd3_-UTR      GGCAATGGCA TGCAGATCTT CATGAAGACC CTGACGGGCA AGACCATCAC
.....>>.....Ubi-Linker.....>
HCV-CLX-CMV      TCTTGAGGTC GAGCCAGTG ACACCATCGA GAATGTCAAG GCCAAGATCC
HCVd3_-UTR      TCTTGAGGTC GAGCCAGTG ACACCATCGA GAATGTCAAG GCCAAGATCC
>.....Ubi-Linker.....>
HCV-CLX-CMV      AAGACAAGGA AGGCATCCCA CCTGACCAGC AGAGGCTGAT ATTCGCGGGC
HCVd3_-UTR      AAGACAAGGA AGGCATCCCA CCTGACCAGC AGAGGCTGAT ATTCGCGGGC
>.....Ubi-Linker.....>
HCV-CLX-CMV      AAACAGCTGG AGGATGGCCG CACCTGTCC  GACTACAACA TCCAGAAAGA
HCVd3_-UTR      AAACAGCTGG AGGATGGCCG CACCTGTCC  GACTACAACA TCCAGAAAGA
>.....Ubi-Linker.....>
HCV-CLX-CMV      GTCCACCTTG CACCTGGTGC TGCGACTCCG CGGTGGCATG GAAGACGCCA
HCVd3_-UTR      GTCCACCTTG CACCTGGTGC TGCGACTCCG CGGTGGCATG GAAGACGCCA
>.....Ubi-Linker.....>>.....>
HCV-CLX-CMV      AAAACATAAA GAAAGGCCCG GCGCCATTCT ATCCTCTAGA GGATGGAACC
HCVd3_-UTR      AAAACATAAA GAAAGGCCCG GCGCCATTCT ATCCTCTAGA GGATGGAACC
>.....Fluc.....>

```

```

HCV-CLX-CMV      GCTGGAGAGC AACTGCATAA GGCTATGAAG AGATACGCCC TGGTTCCTGG
HCVd3_-UTR      GCTGGAGAGC AACTGCATAA GGCTATGAAG AGATACGCCC TGGTTCCTGG
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      AACAATTGCT TTTACAGATG CACATATCGA GGTGAACATC ACGTACGCGG
HCVd3_-UTR      AACAATTGCT TTTACAGATG CACATATCGA GGTGAACATC ACGTACGCGG
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      AATACTTCGA AATGTCCGTT CGGTTGGCAG AAGCTATGAA ACGATATGGG
HCVd3_-UTR      AATACTTCGA AATGTCCGTT CGGTTGGCAG AAGCTATGAA ACGATATGGG
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      CTGAATACAA ATCACAGAAT CGTCGTATGC AGTGAAAACCT CTCTTCAATT
HCVd3_-UTR      CTGAATACAA ATCACAGAAT CGTCGTATGC AGTGAAAACCT CTCTTCAATT
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      CTTTATGCCG GTGTTGGGCG CGTTATTTAT CGGAGTTGCA GTTGCGCCCG
HCVd3_-UTR      CTTTATGCCG GTGTTGGGCG CGTTATTTAT CGGAGTTGCA GTTGCGCCCG
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      CGAACGACAT TTATAATGAA CGTGAATTGC TCAACAGTAT GAACATTTCCG
HCVd3_-UTR      CGAACGACAT TTATAATGAA CGTGAATTGC TCAACAGTAT GAACATTTCCG
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      CAGCCTACCG TAGTGTTTGT TTCCAAAAAG GGGTTGCAAA AAATTTTGAA
HCVd3_-UTR      CAGCCTACCG TAGTGTTTGT TTCCAAAAAG GGGTTGCAAA AAATTTTGAA
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      CGTGCAAAAA AAATTACCAA TAATCCAGAA AATTATTATC ATGGATTCTA
HCVd3_-UTR      CGTGCAAAAA AAATTACCAA TAATCCAGAA AATTATTATC ATGGATTCTA
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      AAACGGATTA CCAGGGATTT CAGTCGATGT ACACGTTTCGT CACATCTCAT
HCVd3_-UTR      AAACGGATTA CCAGGGATTT CAGTCGATGT ACACGTTTCGT CACATCTCAT
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      CTACCTCCCG GTTTTAAATGA ATACGATTTT GTACCAGAGT CTTTGATCG
HCVd3_-UTR      CTACCTCCCG GTTTTAAATGA ATACGATTTT GTACCAGAGT CTTTGATCG
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      TGACAAAACA ATTGCACTGA TAATGAATTC CTCTGGATCT ACTGGGTTAC
HCVd3_-UTR      TGACAAAACA ATTGCACTGA TAATGAATTC CTCTGGATCT ACTGGGTTAC
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      CTAAGGGTGT GGCCCTTCCG CATAGAACTG CCTGCGTCAG ATTCTCGCAT
HCVd3_-UTR      CTAAGGGTGT GGCCCTTCCG CATAGAACTG CCTGCGTCAG ATTCTCGCAT
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      GCCAGAGATC CTATTTTTGG CAATCAAAT CATTCCGGATA CTGCGATTTT
HCVd3_-UTR      GCCAGAGATC CTATTTTTGG CAATCAAAT CATTCCGGATA CTGCGATTTT
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      AAGTGTGTGT CCATTCCATC ACGGTTTTG GAATGTTTACT ACACTCGGAT
HCVd3_-UTR      AAGTGTGTGT CCATTCCATC ACGGTTTTG GAATGTTTACT ACACTCGGAT
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      ATTTGATATG TGGATTTTCA GTCGTCTTA ATGTATAGATT TGAAGAAGAG
HCVd3_-UTR      ATTTGATATG TGGATTTTCA GTCGTCTTA ATGTATAGATT TGAAGAAGAG
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      CTGTTTTTAC GATCCCTTCA GGATTACAA AATTCAAAGTG CGTTGCTAGT
HCVd3_-UTR      CTGTTTTTAC GATCCCTTCA GGATTACAA AATTCAAAGTG CGTTGCTAGT
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      ACCAACCCTA TTTTCATTCT TCGCCAAA GCACTCTGATT GACAAATACG
HCVd3_-UTR      ACCAACCCTA TTTTCATTCT TCGCCAAA GCACTCTGATT GACAAATACG
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      ATTTATCTAA TTTACACGAA ATTGCTTCT GGGGGCGCACC TCTTTCGAAA
HCVd3_-UTR      ATTTATCTAA TTTACACGAA ATTGCTTCT GGGGGCGCACC TCTTTCGAAA
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      GAAGTCGGGG AAGCGGTTGC AAAACGCTT CCATCTTCCAG GGATACGACA
HCVd3_-UTR      GAAGTCGGGG AAGCGGTTGC AAAACGCTT CCATCTTCCAG GGATACGACA
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      AGGATATGGG CTCACCTGAGA CTACATCAG CTATTCTGATT ACACCCGAGG
HCVd3_-UTR      AGGATATGGG CTCACCTGAGA CTACATCAG CTATTCTGATT ACACCCGAGG
>.....Fluc.....>

```

```

HCV-CLX-CMV      GGGATGATAA ACCGGGCGCG GTCGGTAA AGTTGTTCCATT TTTTGAAGCG
HCVd3_-UTR      GGGATGATAA ACCGGGCGCG GTCGGTAA AGTTGTTCCATT TTTTGAAGCG
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      AAGGTTGTGG ATCTGGATAC CGGGAAAACG CTGGGCGTTA ATCAGAGAGG
HCVd3_-UTR      AAGGTTGTGG ATCTGGATAC CGGGAAAACG CTGGGCGTTA ATCAGAGAGG
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      CGAATTATGT GTCAGAGGAC CTATGATTAT GTCCGGTTAT GTAAACAATC
HCVd3_-UTR      CGAATTATGT GTCAGAGGAC CTATGATTAT GTCCGGTTAT GTAAACAATC
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      CGGAAGCGAC CAACGCCTTG ATTGACAAGG ATGGATGGCT ACATTCTGGA
HCVd3_-UTR      CGGAAGCGAC CAACGCCTTG ATTGACAAGG ATGGATGGCT ACATTCTGGA
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      GACATAGCTT ACTGGGACGA AGACGAACAC TTCTTCATAG TTGACCGCTT
HCVd3_-UTR      GACATAGCTT ACTGGGACGA AGACGAACAC TTCTTCATAG TTGACCGCTT
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      GAAGTCTTTA ATTAAATACA AAGGATATCA GGTGGCCCCC GCTGAATTGG
HCVd3_-UTR      GAAGTCTTTA ATTAAATACA AAGGATATCA GGTGGCCCCC GCTGAATTGG
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      AATCGATATT GTTACAACAC CCCAACATCT TCGACGCGGG CGTGGCAGGT
HCVd3_-UTR      AATCGATATT GTTACAACAC CCCAACATCT TCGACGCGGG CGTGGCAGGT
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      CTTCCCGACG ATGACGCCGG TGAACCTCCC GCCGCCGTTG TTGTTTTGGA
HCVd3_-UTR      CTTCCCGACG ATGACGCCGG TGAACCTCCC GCCGCCGTTG TTGTTTTGGA
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      GCACGAAAAG ACGATGACGG AAAAAGAGAT CGTGGATTAC GTCGCCAGTC
HCVd3_-UTR      GCACGAAAAG ACGATGACGG AAAAAGAGAT CGTGGATTAC GTCGCCAGTC
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      AAGTAACAAC CGCGAAAAAG TTGCGCGGAG GAGTTGTGTT TGTGGACGAA
HCVd3_-UTR      AAGTAACAAC CGCGAAAAAG TTGCGCGGAG GAGTTGTGTT TGTGGACGAA
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      GTACCGAAAAG GTCTTACCGG AAAACTCGAC GCAAGAAAAA TCAGAGAGAT
HCVd3_-UTR      GTACCGAAAAG GTCTTACCGG AAAACTCGAC GCAAGAAAAA TCAGAGAGAT
>.....Fluc.....>
HCV-CLX-CMV      CCTCATAAAG GCCAAGAAGG GCGGAAAGTC CAAATTGTGAA GGTTGGGGT
HCVd3_-UTR      CCTCATAAAG GCCAAGAAGG GCGGAAAGTC CAAATTGTGAA -----
>>.....Fluc.....>>.....>
HCV-CLX-CMV      AAACACTCCG GCCTCTTAAG CCATTTCTTG TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
HCVd3_-UTR      -----
>.....HCV 3'-UTR.....>
HCV-CLX-CMV      TTTTTTTTCT TTTTTTTTTT TTTCTTTTCC TTCTTTTTTT CTTTCTTTT
HCVd3_-UTR      -----
>.....HCV 3'-UTR.....>
HCV-CLX-CMV      TCCCTTCTTT AATGGTGGCT CCATCTTAGC CCTAGTCACG GCTAGCTGTG
HCVd3_-UTR      -----
>.....HCV 3'-UTR.....>
HCV-CLX-CMV      AAAGGTCCGT GAGCCGCATG ACTGCAGAGA GTGCTGATAC TGGCCTCTCT
HCVd3_-UTR      -----
>.....HCV 3'-UTR.....>
HCV-CLX-CMV      GCAGATCATG TGTTCGAAGA GCACTAGAGG ATCCCCGAT CCCCGGGCGA
HCVd3_-UTR      ----- -GTTTCGAAGA GCACTAGAGG ATCCCCGAT CCCCGGGCGA
>.....>>.....>
HCV-CLX-CMV      GCTCGAATTC GTAATCATGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC
HCVd3_-UTR      GCTCGAATTC GTAATCATGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      CGCTCACAAAT TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC
HCVd3_-UTR      CGCTCACAAAT TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      TGGGGTGCCT AATGAGTGAG CTAACCTACA TTAATTGCGT TGCCTCACT
HCVd3_-UTR      TGGGGTGCCT AATGAGTGAG CTAACCTACA TTAATTGCGT TGCCTCACT
>.....Plasmid-Sequenz.....>

```

```

HCV-CLX-CMV      GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA ACCTGTCGTG CCAGCTGCAT TAATGAATCG
HCVd3_-UTR      GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA ACCTGTCGTG CCAGCTGCAT TAATGAATCG
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GGTTCGCGTA TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC
HCVd3_-UTR      GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GGTTCGCGTA TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      TCGTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCGTT CGGCTGCGGC GAGCGGTATC
HCVd3_-UTR      TCGTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCGTT CGGCTGCGGC GAGCGGTATC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG
HCVd3_-UTR      AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA
HCVd3_-UTR      CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      AAGGCCGCGT TGCTGGCGTT TTTCCATAGG CTCCGCCCC CTGACGAGCA
HCVd3_-UTR      AAGGCCGCGT TGCTGGCGTT TTTCCATAGG CTCCGCCCC CTGACGAGCA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      TCACAAAAAT CGACGCTCAA GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT
HCVd3_-UTR      TCACAAAAAT CGACGCTCAA GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      AAAGATACCA GCGTTTCCC CTTGGAAGCT CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT
HCVd3_-UTR      AAAGATACCA GCGTTTCCC CTTGGAAGCT CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      CCGACCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC CTTCGGAAG
HCVd3_-UTR      CCGACCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC CTTCGGAAG
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      CGTGGCGCTT TCTCATAGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG
HCVd3_-UTR      CGTGGCGCTT TCTCATAGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      TCGTTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC
HCVd3_-UTR      TCGTTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA
HCVd3_-UTR      CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      CGACTTATCG CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA
HCVd3_-UTR      CGACTTATCG CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCCTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC
HCVd3_-UTR      GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCCTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      TACTACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC
HCVd3_-UTR      TACTACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAACAA ACCACCGCTG
HCVd3_-UTR      CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAACAA ACCACCGCTG
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAAA
HCVd3_-UTR      GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAAA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      GGATCTCAAG AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGTCTG ACGCTCAGTG
HCVd3_-UTR      GGATCTCAAG AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGTCTG ACGCTCAGTG
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      GAACGAAAAC TCACGTTAAG GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA
HCVd3_-UTR      GAACGAAAAC TCACGTTAAG GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT GAAGTTTTAA ATCAATCTAA
HCVd3_-UTR      TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT GAAGTTTTAA ATCAATCTAA
>.....Plasmid-Sequenz.....>

```

```

HCV-CLX-CMV      AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT TAATCAGTGA
HCVd3_-UTR      AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT TAATCAGTGA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTTCG TTCATCCATA GTTGCCTGAC
HCVd3_-UTR      GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTTCG TTCATCCATA GTTGCCTGAC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      TCCCGTTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC
HCVd3_-UTR      TCCCGTTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      AGTGCTGCAA TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC
HCVd3_-UTR      AGTGCTGCAA TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      AGCAATAAAC CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCCTGCAA
HCVd3_-UTR      AGCAATAAAC CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCCTGCAA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAATT GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA
HCVd3_-UTR      CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAATT GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTTGCCA TTGCTACAGG
HCVd3_-UTR      AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTTGCCA TTGCTACAGG
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTT
HCVd3_-UTR      CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTT
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAAGCG
HCVd3_-UTR      CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAAGCG
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      GTTAGCTCCT TCGGTCCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT
HCVd3_-UTR      GTTAGCTCCT TCGGTCCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      GTTATCACTC ATGGTTATGG CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC
HCVd3_-UTR      GTTATCACTC ATGGTTATGG CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAGTCATTC
HCVd3_-UTR      CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAGTCATTC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG CGTCAATACG
HCVd3_-UTR      TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG CGTCAATACG
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA
HCVd3_-UTR      GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAATCC
HCVd3_-UTR      AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAATCC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      AGTTCGATGT AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC
HCVd3_-UTR      AGTTCGATGT AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      TTTCAACCAGC GTTCTGGGT GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA
HCVd3_-UTR      TTTCAACCAGC GTTCTGGGT GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      AAAAGGGAAT AAGGCGACA CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCCTT
HCVd3_-UTR      AAAAGGGAAT AAGGCGACA CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCCTT
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA TGAGCGGATA
HCVd3_-UTR      TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA TGAGCGGATA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT
HCVd3_-UTR      CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT
>.....Plasmid-Sequenz.....>

```



```

HCV-CLX-CMV      TTCCCCGAAA AGTGCCACCT AAATTGTAAG CGTTAATATT TTGTTAAAAT
HCVd3_-UTR      TTCCCCGAAA AGTGCCACCT AAATTGTAAG CGTTAATATT TTGTTAAAAT
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      TCGCGTTAAA TTTTTGTTA AATCAGCTCAT TTTTAAACCA ATAGGCCGAA
HCVd3_-UTR      TCGCGTTAAA TTTTTGTTA AATCAGCTCAT TTTTAAACCA ATAGGCCGAA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      ATCGGCAAAA TCCCTTATA AATCAAAAGAA TAGACCGAGA TAGGGTTGAG
HCVd3_-UTR      ATCGGCAAAA TCCCTTATA AATCAAAAGAA TAGACCGAGA TAGGGTTGAG
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      TGTTGTTCCA GTTTGAAC AAGAGTCCACT ATTAAGAAGC GTGGACTCCA
HCVd3_-UTR      TGTTGTTCCA GTTTGAAC AAGAGTCCACT ATTAAGAAGC GTGGACTCCA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      ACGTCAAAGG GCGAAAAAC CGTCTATCAGG GCGATGGCCC ACTACGTGAA
HCVd3_-UTR      ACGTCAAAGG GCGAAAAAC CGTCTATCAGG GCGATGGCCC ACTACGTGAA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      CCATCACCCCT AATCAAGTT TTTTGGGTCG AGGTGCCGTA AAGCACTAAA
HCVd3_-UTR      CCATCACCCCT AATCAAGTT TTTTGGGTCG AGGTGCCGTA AAGCACTAAA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      TCGGAACCCT AAAGGGAGC CCCCATTAG AGCTTGACGG GGAAAGCCGG
HCVd3_-UTR      TCGGAACCCT AAAGGGAGC CCCCATTAG AGCTTGACGG GGAAAGCCGG
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      CTAGTTATTA ATAGTAATC AATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT
HCVd3_-UTR      CTAGTTATTA ATAGTAATC AATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      ATGGAGTTCG GCGTTACAT AACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC
HCVd3_-UTR      ATGGAGTTCG GCGTTACAT AACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      GCCCAACGAC CCCCGCCCT TTGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG
HCVd3_-UTR      GCCCAACGAC CCCCGCCCT TTGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      TAACGCCAAT AGGGACTTT CCATTGACGTC AATGGGTGGA GTATTTACGG
HCVd3_-UTR      TAACGCCAAT AGGGACTTT CCATTGACGTC AATGGGTGGA GTATTTACGG
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      TAAACTGCCC ACTTGGCAG TACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC
HCVd3_-UTR      TAAACTGCCC ACTTGGCAG TACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      CCCTATTGAC GTCAATGAC GGTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCAGT
HCVd3_-UTR      CCCTATTGAC GTCAATGAC GGTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCAGT
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      ACATGACCTT ATGGGACTT TCCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC
HCVd3_-UTR      ACATGACCTT ATGGGACTT TCCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      ATCGCTATTA CCATGGTGA TGCGGTTTTGG CAGTACATCA ATGGGCGTGG
HCVd3_-UTR      ATCGCTATTA CCATGGTGA TGCGGTTTTGG CAGTACATCA ATGGGCGTGG
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      ATAGCGGTTT GACTCACGG GGATTTCCAAG TCTCCACCCC ATTGACGTCA
HCVd3_-UTR      ATAGCGGTTT GACTCACGG GGATTTCCAAG TCTCCACCCC ATTGACGTCA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      ATGGGAGTTT GTTTTGGTA CAAAATCAAC GGGACTTTC AAAATGTCGT
HCVd3_-UTR      ATGGGAGTTT GTTTTGGTA CAAAATCAAC GGGACTTTC AAAATGTCGT
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      AACAACTCCG CCCATTGA CGAAAATGGGC GGTAGGCGTG TACGGTGGGA
HCVd3_-UTR      AACAACTCCG CCCATTGA CGAAAATGGGC GGTAGGCGTG TACGGTGGGA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      GGTCTATATA AGGTGAACC GTCAGAAGCTA GCCGGCCGAC GGTATCGATA
HCVd3_-UTR      GGTCTATATA AGGTGAACC GTCAGAAGCTA GCCGGCCGAC GGTATCGATA
>.....Plasmid-Sequenz.....>
HCV-CLX-CMV      AGCTTTTAAT ACGACTCAC TATA
HCVd3_-UTR      AGCTTTTAAT ACGACTCAC TATA
>.....>>..T7-Promotor..>>

```

**Abkürzungsverzeichnis und Glossar**

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CF	Cleavage Faktor
CPSF	cleavage/polyadenylation specificity factor
CrPV	Cricket Paralyse Virus
CSFV	Classical swine fever virus (klassisches Schweinefieber Virus)
CstF	cleavage stimulation factor
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EMCV	Encephalomyocarditisvirus
et al.	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	fetal bovine serum (fötales Rinderserum)
Fluc	Firefly Luciferase
FMDV	Foot-and-mouth disease virus (Maul-und-Klauenseuche Virus)
G	Guanin
G-Phase	Gap-Phase
GTP	Guanosintriphosphat
HAV	Hepatitis A Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
hnRNP L	nukleares Ribonukleoprotein L
IRES	Internal Ribosome Entry Site (interne Ribosomeneintrittsstelle)
ITAF	IRES trans-acting factor

Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KSHV	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus
l	Liter
Met	Methionin
min	Minute
mM	Millimol/l
M-Phase	Mitosephase
mRNA	messengerRNA (Boten-RNA)
NS	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PABP	Poly(A) binding protein (Poly(A)-Bindeprotein)
PAIP	PABP interacting protein (PAPB interagierendes Protein)
PAP	Poly(A)-Polymerase
PBS	Phosphate-buffered saline
PCBP	Poly(rC)-Bindeprotein
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	pondus hydrogenii, Säuregrad
PTB	Polypyrimidin-Trakt-Bindeprotein
PTV	porcine teschovirus (Porcines Teschovirus)
PV	Poliovirus
Rluc	Renilla Luciferase
RNA	Ribonukleinsäure
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RRL	rabbit reticulocyte lysate (Kaninchenretikulozyten-Lysat)
RT	Raumtemperatur
S-Phase	Synthese-Phase
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
U	Uracil

UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslated region (untranslatierte Region)
UV	ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
w/v	weight/volume (Gewicht/Volumen)
z.B.	zum Beispiel

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.1	Modell des Hepatitis C Viruspartikels .....	2
Abb. 1.2	Schematische Darstellung des HCV Genoms.....	3
Abb. 1.3	Organisation des HCV Polyproteins .....	3
Abb. 1.4	Sequenz und Sekundärstruktur der HCV 5'-UTR mit Beginn des viralen ORFs..	6
Abb. 1.5	Sequenz und Sekundärstruktur der HCV 3'-UTR im Anschluss des Polyprotein ORFs .....	7
Abb. 1.6	Der Infektionszyklus des Hepatitis C Virus .....	9
Abb. 1.7	Schematische Übersicht der Translationsinitiation bei eukaryotischen gecappten mRNAs .....	12
Abb. 1.8	Schematische Darstellung der IRES-Elemente der Picornaviren im Vergleich zu HCV- und CrPV-IRES .....	15
Abb. 1.9	Schematische Darstellung der Translationsinitiation an klassischen Picornavirus IRES-Elementen .....	16
Abb. 1.10	Schematische Darstellung der Polyadenylierungsreaktion am 3'-Ende neu synthetisierter RNAs in eukaryotischen Zellen.....	23
Abb. 1.11	Schematische Darstellung des Modells der Zirkularisierung einer gecappten und polyadenylierten mRNA.....	26
Abb. 1.12	Schematische Darstellung der einzelnen Phasen des Zellzyklus.....	28
Abb. 3.1	Die Sekundärstrukturen der HCV- und PTV 5'-UTR .....	51
Abb. 3.2	Schematische Darstellung der verwendeten Reporter-RNAs.....	52
Abb. 3.3	<i>In vitro</i> -Translation der Reporter-RNAs in RRL.....	52
Abb. 3.4	Effekt der HCV 3'-UTR auf die Translation in Huh7- und HeLa-Zellen.....	53
Abb. 3.5	Die HCV-Reporter-RNAs mit 3'-UTR beziehungsweise 200 Nukleotiden Sequenzanhang .....	54
Abb. 3.6	Kinetik der HCV- und PTV-Reporter RNAs mit und ohne HCV 3'-UTR in Huh7-Zellen .....	55
Abb. 3.7	<i>In vitro</i> -Translation der Reporter-RNAs mit Verlängerung der Konstrukte ohne HCV 3'-UTR in RRL.....	56
Abb. 3.8	Effekt der HCV 3'-UTR auf die HCV- und PTV IRES nach Verlängerung der Konstrukte ohne 3'-UTR <i>in vivo</i> .....	57
Abb. 3.9	Stimulation von HCV- und PTV IRES durch die HCV 3'-UTR nach Elektroporation.....	58
Abb. 3.10	Effekt der HCV 3'-UTR Mutanten auf die IRES-abhängige Translation der HCV IRES und PTV IRES .....	60
Abb. 3.11	Die Reporter-Konstrukte mit Poly(A)-Anhang .....	63
Abb. 3.12	Stimulation vom HCV- und PTV IRES durch Poly(A)-Anhang.....	63
Abb. 3.13	Transfektion der EMCV RNA Reporterkonstrukte in Huh7-Zellen.....	65
Abb. 3.14	Die gecappten Actin-Reporterkonstrukte .....	66

Abb. 3.15	<i>In vitro</i> -Translation der gecappten Reporter-RNAs in RRL .....	66
Abb. 3.16	Transfektion der gecappten Actin-RNAs in Zellen.....	67
Abb. 3.17	Relative Stimulationen durch die HCV 3'-UTR mit oder ohne Renilla Luciferase-RNA Kotransfektion und die Abhängigkeit der Stimulations- ergebnisse von unterschiedlichen Normalisierungsmethoden .....	72
Abb. 3.18	Rluc und WST1-Werte bei Kotransfektion von Fluc und Rluc Reporter-RNAs in Huh7- und HeLa-Zellen.....	73
Abb. 3.19	Schwankungen der Renilla Luciferase-Werte nach Transfektion mit und ohne Firefly-RNA in Huh7- und HeLa-Zellen.....	75
Abb. 3.20	Schwankung der relativen WST1-Werte bei Transfektion von nur einem Reporter oder Kotransfektion beider Reporter in Huh7-Zellen .....	76
Abb. 3.21	Stimulation der Translation durch die HCV 3'-UTR in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus.....	79
Abb. 3.22	Stimulation der Translation durch einen Poly(A)-Anhang von 50 A in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus .....	81
Abb. 3.23	Effekt der kurzen Poly(A)-Anhänge auf die <i>in vitro</i> -Translation in RRL .....	84
Abb. 3.24	Effekt der kurzen Poly(A)-Enden auf die <i>in vitro</i> -Translation im Thermo Scientific Pierce System .....	85
Abb. 3.25	Stimulation der IRES-abhängigen Translation durch verschiedene Poly(A)-Längen in Huh7- und HeLa-Zellen .....	85
Abb. 3.26	Stimulation der cap-abhängigen Translation durch verschiedene Poly(A)-Längen in Huh7- und HeLa-Zellen .....	86
Abb. 3.27	Beispiel für ein 1,5 %iges Agarosegel mit gecappten Actin-RNAs mit unterschiedlich langen Poly(A)-Anhängen .....	87
Abb. 3.28	<i>In vitro</i> -Translation der HCV IRES Reporter RNAs mit längeren Poly(A)-Anhängen in RRL .....	88
Abb. 3.29	Beispiel einer <i>in vitro</i> -Translation von gecappter Reporter-RNA mit Poly(A)-Anhängen in RRL .....	88
Abb. 3.30	Translation der HCV IRES Reporterkonstrukte mit Poly(A)-Anhängen im Thermo Scientific Lysat .....	89
Abb. 3.31	Effekt der verschieden langen Poly(A)-Anhänge auf die Aktivität der HCV IRES in Zellen .....	90
Abb. 3.32	Effekt der verschieden langen Poly(A)-Anhänge auf die cap- abhängige Translation in Zellen.....	91

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Übersicht der HCV-codierten Proteine mit Molekulargewicht und Funktionen .....	5
Tabelle 2: Übersicht der eukaryotischen Initiationsfaktoren.....	11
Tabelle 3: Übersicht einer Auswahl von viralen Genomen, welche IRES-Elemente besitzen, mit dazugehörigen Referenzen.....	14
Tabelle 4: Übersicht der ITAFs und ihre Wirkung an den unterschiedlichen IRES-Elementen.....	20
Tabelle 5: Gemessene Rohwerte nach Transfektion der Fluc Reporter-RNAs mit HCV IRES +/- HCV 3'-UTR mit beziehungsweise ohne Rluc-RNA Kotransfektion in Huh7-Zellen.....	70

## Publikationen

Bung, C., Bochkaeva, Z., Terenin, I., Zinovkin, R., Shatsky, I. N., and Niepmann, M. (2010) Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation. *FEBS Lett* 584(4), 837-42.

Bremer, C. M., Bung, C., Kott, N., Hardt, M., and Glebe, D. (2009) Hepatitis B virus infection is dependent on cholesterol in the viral envelope. *Cell Microbiol* 11(2), 249-60.

## Eingereichte Manuskripte

Bung, C., Fehr, C., Goergen, D., Hirnet, J., and Niepmann, M. (2011) Normalization of translation readouts after transfection of cells: the urgent need for an independent method monitoring transfection efficiency.

## Kongressbeiträge

Bung, C., Bochkaeva, Z., Terenin, I., Shatsky, I. N., and Niepmann, M. (2010) Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation.

*EMBO Conference: Protein Synthesis and Translational, September 2009, Heidelberg, Germany.*

Bung, C., Bochkaeva, Z., Terenin, I., Shatsky, I. N., and Niepmann, M. (2010) Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation.

*16<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, October 2009, Nice, France.*



### Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich auf dem Weg zu dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Albrecht Bindereif danke ich für die Betreuung und Vertretung der Arbeit im Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Michael Niepmann für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie des Arbeitsplatzes und den „Unmengen“ an Arbeitsmaterial (und nein, ich habe das Lipofektamin wirklich nicht getrunken ;-)!). Außerdem möchte ich ihm für seine stetige Diskussionsbereitschaft und seine Anregungen zur Problemlösung danken.

Auch unserem russischen Kooperationspartner Herrn Prof. Dr. Ivan Shatsky sei an dieser Stelle gedankt, da er aufgrund manch anstrengender Diskussion sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich natürlich auch bei meinen Kollegen Christiane Jünemann, Dagmar Goergen, Jura Henke und Dominik Conrad, mit denen man zusammen in den Jahren durch viele Höhen und Tiefen gegangen ist. Vielen Dank für eine tolle Arbeitsatmosphäre, gute Zusammenarbeit und zahlreiche Hilfestellungen.

Außerdem möchte ich meiner Kollegin und Freundin Carmen Fehr danken, mit der ich gemeinsam in den letzten Jahren durch das „dunkle Tal“ gewandert bin. Vielen Dank für deine Freundschaft.

Ein großes Dankeschön geht auch an unseren Globetrotter Juliane Hirnet. Unsere gemeinsame Zeit im Rundlabor werde ich nie vergessen... und Schokolade werde ich ab nun immer mit dir in Verbindung bringen ;-) Außerdem fand ich unsere nicht immer ganz einfachen Diskussionen sehr bereichernd und anregend. Ebenso ein dickes Danke für das kritische Korrekturlesen der Arbeit in Rekordzeit!

Auch den Mitgliedern der ehemaligen AG Beck, Ralf und Barbara sowie Ewald, möchte ich danken für manch wertvollen Tipp im Laboralltag.

Des Weiteren möchte ich Mona Saniewski danken für eine wunderbare Freundschaft. Die Gespräche mit dir bei unzähligen Kannen Tee haben mir in dieser Zeit sehr geholfen!

Außerdem möchte ich mich bei der besten kleinen Schwester der Welt bedanken, die in den letzten Wochen oft am Telefon und auch persönlich grandiose Aufbauarbeit geleistet hat und versucht hat, dafür zu sorgen, dass ich nicht vereinsame. Danke Steffi!

Zum Schluss möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die hier nicht persönlich erwähnt wurden, die mir aber in der ganzen Zeit mit Rat und Tat zuverlässig zur Seite standen und sehr geduldig zugehört haben.

## **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 öffentlichen 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 den „Satzungen der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, im Mai 2011

Christiane Bung