

Interaktion des Hepatitis C Virus mit zellulären Faktoren

Dissertation

vorgelegt von

Gesche K. Gerresheim

M. Sc. Biologin

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

an der Justus-Liebig-Universität Gießen

März, 2020

“An idea is like a virus. Resilient. Highly contagious. The smallest seed of an idea can grow. It can grow to define or destroy you.” [1]

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2014 bis März 2020 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Niepmann im Biochemischen Institut des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt. Die Promotion wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 1021 (RNA viruses: RNA metabolism, host response and pathogenesis) gefördert.

Erstgutachter:

Prof. Dr. Peter Friedhoff

Institut für Biochemie

Fachbereich für Biologie und Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Michael Niepmann

Biochemisches Institut

Fachbereich Humanmedizin

Justus-Liebig-Universität Gießen

Zusammenfassung

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) ist wie alle Viren auf zelluläre Interaktionspartner angewiesen, von denen jedoch noch nicht alle identifiziert oder näher charakterisiert sind. Um mehr zum heutigen Erkenntnisstand beizutragen und neue Therapieansätze zu entwickeln, ist die weitere Erforschung der HCV-Wirt-Interaktion unabdingbar. HCV gehört zu den membranumhüllten *Flaviviridae*, die ein einzelsträngiges Plus-Strang RNA-Genom besitzen. Eine Anlagerung der leberspezifischen microRNA-122 (miR-122) an mindestens fünf hoch konservierte Bindungsstellen im HCV-Genom ist von immenser Bedeutung für die Replikation, Translation und Stabilisierung der RNA. Das Virus befällt Hepatozyten, wobei die chronische Infektion oft zu Leberzirrhosen und hepatozellulären Karzinomen (HCC) führt. Obwohl es gut wirksame Medikamente gibt, ist aufgrund der hohen genetischen Varianz keine Impfung möglich. Zudem bilden sich vermehrt Resistenzen aus, und die bereits entstandenen Leberschäden sowie einige stoffwechselbedingte Änderungen in den Zellen bleiben auch nach erfolgreicher Elimination des Virus bestehen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst die drei hoch konservierten miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-codierenden Region (5B.2 und 5B.3) und der 3'UTR (S3), welche bislang kaum beschrieben wurden, näher untersucht werden. Es zeigte sich in Mutationsstudien, dass die Anlagerung der miR-122 an die Bindungsstelle 5B.2 einen positiven Effekt auf die virale Replikation auswirkt. Die Bindung an 5B.3 wies einen schwächeren und an S3 keinen signifikanten Effekt auf. Insgesamt spielt die miR-122 eine sehr komplexe Rolle in der Regulation des HCV-Replikationszykluses.

Hauptaugenmerk dieser Thesis war die Analyse des Einflusses einer HCV-Infektion auf das zelluläre Transkriptom und Translatom mit Hilfe des Ribosome Profiling. Diese Methode ermöglicht die Detektion von Veränderungen der zellulären Genexpression zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die Ergebnisse machten deutlich, dass die virale Replikation zu keiner allumfassenden Veränderung der zellulären Genexpression führt. Nur wenige Gene waren signifikant differenziell exprimiert. Diese Gene stehen vor allem im Zusammenhang mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER)-Stress, der Beeinflussung von Signalwegen, der HCV-Replikation und der Karzinogenese. Transkriptionell herunter reguliert waren interessanter Weise Untereinheiten von Komplexen der mitochondrialen Atmungskette, was möglicherweise zu einer oft in Krebszellen beobachteten metabolischen Umprogrammierung (Warburg Effekt) der Hepatozyten führt.

Summary

Viruses like the Hepatitis-C-Virus (HCV) depend on cellular interaction partners, but not all of these factors are identified or characterized in detail. Therefore, studying HCV-host-interaction is required to understand underlying mechanisms and to develop new therapeutic approaches. HCV belongs to the family of *Flaviviridae* and has a positive-sense single-stranded RNA genome. Five highly conserved microRNA-122 (miR-122) target sites located on the viral RNA are involved in enhancing replication, translation, and stability of the genome. HCV preferentially infects human hepatocytes, often leading to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Although powerful direct-acting antivirals (DAAs) are available, there is no efficient vaccine due to rapid emergence of virus quasispecies. Furthermore, liver diseases and metabolic changes recur with a very high incidence even after successful clearance of HCV.

In this research the three highly conserved miR-122 target sites in the NS5B coding region (5B.2 and 5B.3) and in the 3'UTR (S3) of the HCV RNA were supposed to be analyzed. In full-length genomes, mutations in the miR-122 target sites revealed that 5B.2 is positively involved in regulating overall genome replication efficiency. Mutation of 5B.3 showed a weaker and S3 no significant effect. Thus, the miR-122 target sites are involved in a complex interplay in regulating the HCV replication cycle.

Focus of this work was the investigation of transcriptome and translome changes due to an HCV-infection with Ribosome Profiling. This method produces a snapshot of actively translating ribosomes in a cell. We found that established viral replication does not cause global changes in host gene expression. Only few genes are significantly differentially expressed. These genes are mainly related to ER stress, interference with signaling pathways, HCV replication and cancer development. Transcriptional downregulation mainly affects mitochondrial respiratory chain complex core subunit genes, which could contribute to cancer cell-like metabolic reprogramming, called Warburg effect.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Summary.....	IV
Inhaltsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Das Hepatitis C Virus	1
1.1.1 Systematik.....	2
1.1.2 Organisation des Viruspartikels	2
1.1.2.1 Genomaufbau	3
1.1.2.2 Exprimierte Proteine	5
1.2 Replikationszyklus des HCV	6
1.2.1 Anlagerung und Aufnahme in die Wirtszelle	6
1.2.2 IRES-abhängige Initiation der Translation.....	8
1.2.3 Translation und Prozessierung des Polyproteins	10
1.2.4 Replikation des HCV-RNA-Genoms	11
1.2.5 Zusammenbau und Freisetzung der Viruspartikel.....	13
1.3 Interaktion zwischen HCV und Wirtsfaktoren.....	13
1.3.1 HCV und nicht-codierende RNAs.....	14
1.3.1.1 HCV und miR-122.....	17
1.3.2 HCV und die Entstehung von Zirrhosen und Krebs.....	19
1.4 Zielsetzung.....	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.2 Geräte	25

2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	26
2.1.3.1	Spezielle Chemikalien und Reagenzien	26
2.1.4	Puffer und Lösungen	27
2.1.5	Antikörper und Magnetische Beads	32
2.1.6	Enzyme	32
2.1.7	Kit-Systeme	33
2.1.8	Plasmide.....	33
2.1.9	Nukleotide und Oligonukleotide	35
2.1.9.1	Nukleotide.....	35
2.1.9.2	RNA-Oligonukleotide	35
2.1.9.3	DNA-Oligonukleotide	35
2.1.10	Größen und Längenstandards	38
2.1.11	Bakterien	38
2.1.12	Zelllinien	39
2.1.13	Kulturmedien	39
2.2	Mikrobiologische Methoden	40
2.2.1	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien.....	40
2.2.2	Kultivierung von Bakterien	40
2.2.3	Transformation	40
2.2.3.1	Schnelle Transformation	40
2.2.3.2	Standard Transformation	41
2.3	Zellbiologische Methoden.....	41
2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	41
2.3.2	Auftauen von Zellen.....	42
2.3.3	Einfrieren von Zellen.....	42
2.3.4	Zellzahlbestimmung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer	42

2.3.5	Transfektion.....	43
2.3.5.1	Transfektion mittels Lipofectamine 2000.....	43
2.3.5.2	Transfektion mittels Elektroporation.....	43
2.4	Virologische Methoden	44
2.4.1	Produktion und Gewinnung extrazellulärer viraler Partikel.....	44
2.4.2	Infektion von Zellen.....	44
2.5	Molekularbiologische Methoden	45
2.5.1	Arbeiten mit DNA und RNA.....	45
2.5.1.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Qubit®.....	45
2.5.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.5.1.3	Extraktion aus Agarosegelen.....	46
2.5.1.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	46
2.5.1.5	Phenol-Chloroform Extraktion.....	46
2.5.1.6	Präzipitation von Nukleinsäuren.....	47
2.5.2	Arbeiten mit DNA.....	47
2.5.2.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	47
2.5.2.2	Mutagenese-PCR.....	48
2.5.2.3	Restriktionsverdau.....	50
2.5.2.4	Dephosphorylierung.....	50
2.5.2.5	Ligation.....	50
2.5.2.6	Plasmid-Präparation.....	51
2.5.2.7	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	51
2.5.3	Arbeiten mit RNA.....	51
2.5.3.1	Transkription (in vitro).....	51
2.5.3.2	DNase I-Verdau.....	52
2.5.3.3	Reinigung der RNA.....	52

2.5.3.4	Hybridisierung von miR.....	52
2.6	Proteinbiochemische Methoden.....	53
2.6.1	Nachweis von Proteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	53
2.6.1.1	Aussäen und Fixieren der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie..	53
2.6.1.2	Färben von Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie	53
2.6.2	Nachweis von Proteinen mittels Western Blot.....	54
2.6.2.1	Lyse der Zellen	54
2.6.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
2.6.2.3	Western Blot	55
2.6.2.4	Immunochemie zur Detektion der Proteine	56
2.7	Komplexe Methoden zur Analyse von RNA.....	56
2.7.1	Quantitative-Reverse-Transkriptase-PCR.....	56
2.7.1.1	Lyse der Zellen und Isolation der Gesamt-RNA	56
2.7.1.2	Reverse Transkription.....	57
2.7.1.3	Quantitative PCR	58
2.7.1.4	Auswertung der qPCR	58
2.7.2	Ribosome Profiling Methode.....	59
2.7.2.1	Aussäen und Transfektion der Zellen.....	60
2.7.2.2	Vorbereitung der Sucrosegradienten	61
2.7.2.3	Zelllyse	61
2.7.2.4	RNA-Verdau	62
2.7.2.5	Ultrazentrifugation, Fraktionierung und Messung der Gradienten ..	62
2.7.2.6	Fragmentierung der Transkriptom-RNA	63
2.7.2.7	Erste Größenselektion der Fragmente	63
2.7.2.8	Dephosphorylierung.....	64
2.7.2.9	Linker-Ligation	65

2.7.2.10	Größenselektion 2.....	65
2.7.2.11	Reverse Transkription der Proben	65
2.7.2.12	Größenselektion 3.....	66
2.7.2.13	Zirkularisierung	66
2.7.2.14	rRNA-Depletion.....	67
2.7.2.15	Zyklus-Anpassung der PCR.....	68
2.7.2.16	Finale PCR-Amplifikation	68
2.7.2.17	Größenselektion 4.....	69
2.7.2.18	Kontrolle mit Hilfe des Bioanalyzers	69
2.7.2.19	Sequenzierung der Proben	69
2.7.2.20	Analyse der Daten	69
3	Ergebnisse	70
3.1	Produktion des HCV-Jc1 in Zellkultur	70
3.1.1	Herstellung des viralen Genoms.....	70
3.1.2	Nachweis der HCV-Replikation.....	71
3.2	Die miR-122-Bindung an das HCV-Genom.....	75
3.2.1	Mutagenese der miR-122-Bindungsstellen S1, S2, 5B.2, 5B.3 und S3	76
3.2.2	Analyse der Funktion der miR-122-Bindungsstellen im HCV-Genom...	77
3.3	Einfluss der HCV-Infektion auf die zelluläre Genexpression.....	83
3.3.1	Der erste Ribosome Profiling Durchlauf.....	84
3.3.1.1	Auswertung des ersten Ribosome Profiling Durchlaufs.....	91
3.3.2	Der zweite Ribosome Profiling Durchlauf.....	94
3.3.2.1	Auswertung des zweiten Ribosome Profiling Durchgangs.....	98
3.3.2.2	Differenziell exprimierte Gene und Signalwege.....	103
4	Diskussion	109
4.1	Funktioneller Einfluss der miR-122-Bindung an das HCV-Genom.....	109

4.1.1	Die miR-122-Bindung an die NS5B-codierende Region und 3`UTR....	110
4.2	Ribosome Profiling mit HCV-infizierten Zellen	112
4.2.1	Durchführung der Ribosome Profiling Experimente	113
4.2.2	Einfluss der miR-122 auf die Genexpression in Huh-7.5-Zellen	114
4.2.3	Einfluss der HCV-Infektion auf die Genexpression in Huh-7.5-Zellen .	115
4.2.3.1	Differenziell regulierte Gene.....	116
4.2.3.2	Translationelle Regulation von Genen	119
4.2.3.3	Differenziell regulierte Signalwege	121
4.2.3.4	Der Warburg-Effekt und HCV.....	122
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	125
5	Literatur	127
6	Anhang	156
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	156
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	163
6.3	Plasmide.....	165
6.4	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	168
6.4.1	Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen	168
6.4.2	Internationaler Vortrag	169
6.4.3	Unterstützte Abschlussarbeiten	169
6.5	Danksagung	170
6.6	Eidesstaatliche Erklärung	171

1 Einleitung

Viren sind mit einer Größe von 20 – 1200 nm millionenfach kleiner als ein Mensch [2]. Dies ist ein Grund, warum Viren erst Ende des 19. Jahrhunderts entdeckt und zunächst für eine Art Gift gehalten wurden (lat. *virus*, „Gift, Schleim“) [3]. Heute werden Viren zumeist als kleine Partikel, die sich nicht selbstständig außerhalb einer Wirtszelle vermehren können, definiert.

1.1 Das Hepatitis C Virus

Wie sich vom Namen ableiten lässt (lat. *hepar*, *hepatos*, „Leber“), befällt das Hepatitis C Virus (HCV) vor allem Leberzellen, wobei das einzige natürliche Reservoir der Mensch ist. Die Übertragung erfolgt parenteral, hauptsächlich durch medizinische Eingriffe und injizierenden Drogenkonsum. Jährlich infizieren sich 3 – 4 Millionen Menschen mit dem Virus, und 399.000 erliegen den Folgen der daraus resultierenden Erkrankungen [4,5]. Weltweit liegt die Prävalenz bei durchschnittlich 3 %, wobei das regionale Vorkommen von 0,4 % bis zu 12,3 % schwankt [6]. Es kann sowohl zu akuten, oft asymptomatischen, als auch chronischen Infektionen kommen. Das Risiko, an einer Leberzirrhose zu erkranken, liegt bei einem chronischen Verlauf zwischen 15 und 40 %. Hepatozelluläre Karzinome (engl. *hepatocellular carcinoma*, HCC) und Leberversagen sind häufig die Folge. Neben der Replikation in Hepatozyten weisen mehrere klinische und experimentelle Studien zudem auf eine Infektion des lymphatischen Systems hin [7,8].

Die anfängliche Interferon-Therapie konnte 1998 mittels Einsatz von Ribavirin, einem Nukleosid-Analogen, und 2001 durch Pegylieren des Interferons deutlich verbessert werden [9,10]. Mittlerweile gibt es viele potente direkt auf die Replikation des Virus wirkende Medikamente (engl. *direct-acting antivirals*, DAAs), welche sich gegen die HCV-Protease NS3, das Phosphoprotein NS5A und die Polymerase NS5B richten [11]. Heutzutage kann bei 90 % aller behandelten Patienten das Virus eliminiert werden. Welche Medikamente zum Einsatz kommen, richtet sich vor allem nach dem zu behandelnden Genotyp. Eine Impfung gegen HCV ist aufgrund der hohen genetischen Varianz des Virus nach wie vor nicht möglich. Ein weiteres Problem ist, dass die Krankheit bei vielen Menschen erst sehr spät diagnostiziert wird und/oder diese keinen Zugang zu den sehr kostspieligen Medikamenten haben. Zudem bilden sich durch indirekte Anpassung des Virus vermehrt Resistenzen aus, und die bereits entstandenen Leberschäden, sowie einige stoffwechselbedingten Änderungen in den Leberzellen, bleiben auch nach erfolgreicher Behandlung bestehen [12,13].

1.1.1 Systematik

Viren werden vom Internationalen Komitee für Virustaxonomie (engl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) systematisch in Familien und Gattungen unterteilt [14]. Das HC-Virus gehört zur Familie der membranumhüllten *Flaviviridae*, welche ein nicht-segmentiertes Plus-Strang RNA-Genom (Baltimore-Gruppe IV) ohne Poly(A)-Trakt besitzen. Ihre Replikation findet im Zytoplasma der Wirtszelle, in speziellen Membranvesikeln, statt [15]. Die *Flaviviridae* werden in vier Genera unterteilt: Flaviviren, zu denen viele humanpathogene Viren wie das Dengue Virus und das Gelbfieber Virus (lat. *flavus*, „gelb“) zählen, Pegiviren, Pestiviren und Hepaciviren. Hepaciviren unterscheiden sich von den anderen Gattungen vor allem dadurch, dass sie sich nur schlecht in Zellkulturen vermehren lassen und eine geringere Schwimmdichte aufweisen. Neben dem am besten charakterisierten HCV (*Hepacivirus C*), gibt es auch Mitglieder der Hepaciviren, welche Pferde (*Hepacivirus A*), verschiedene Affen (*Hepacivirus B und D*), Nagetiere (*Hepacivirus E – I*), Fledermäuse (*Hepacivirus J – M*) und Rinder (*Hepacivirus N*) infizieren können [16–21].

HCV wird in 7 Genotypen, welche untereinander über 30 % Unterschiede im codierenden Bereich aufweisen, und 86 Subtypen gegliedert [22,23]. Die große Varianz begründet sich durch die hohe Fehlerrate der viralen RNA-abhängigen-RNA-Polymerase, welche auch im Wirt für die Entstehung von Quasispezies verantwortlich ist und somit einen großen Teil zu der Immunevasion des Virus beiträgt. Weltweit am weitesten verbreitet ist Genotyp 1 mit 49,1 %, gefolgt von 2 und 3 (zusammen 34,7 %) [24]. Personen, die sich mit dem HCV-Genotyp 3 infizieren, tragen das höchste Risiko, eine Fibrose und Krebs zu entwickeln [22], wobei auch alle anderen Genotypen diese Erkrankungen auslösen können. Die Bestimmung des Genotyps wird also vor allem durchgeführt, um eine speziell angepasste Therapie für die Patienten zu ermöglichen.

1.1.2 Organisation des Viruspartikels

HCV-Partikel weisen eine pleomorphe Form mit einer Größe von 40 – 100 nm auf [25]. Wie alle *Flaviviridae* sind sie von einer Lipid-Doppelmembran zellulären Ursprungs umgeben. In diese sind sowohl Proteine der Wirtszelle als auch die viralen Glykoproteine E1 und E2 (engl. *envelope*) eingelagert. Rückschließend von anderen Flaviviren geht man davon aus, dass E2 sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit E1 bildet [26]. Das darunterliegende Kapsid wird aus den viralen Core-Proteinen gebildet und umhüllt das ~9,6 Kilobasen (kb) große, positiv (+) orientierte und einzelsträngige (ss) RNA-Genom (siehe Abbildung 1-1).

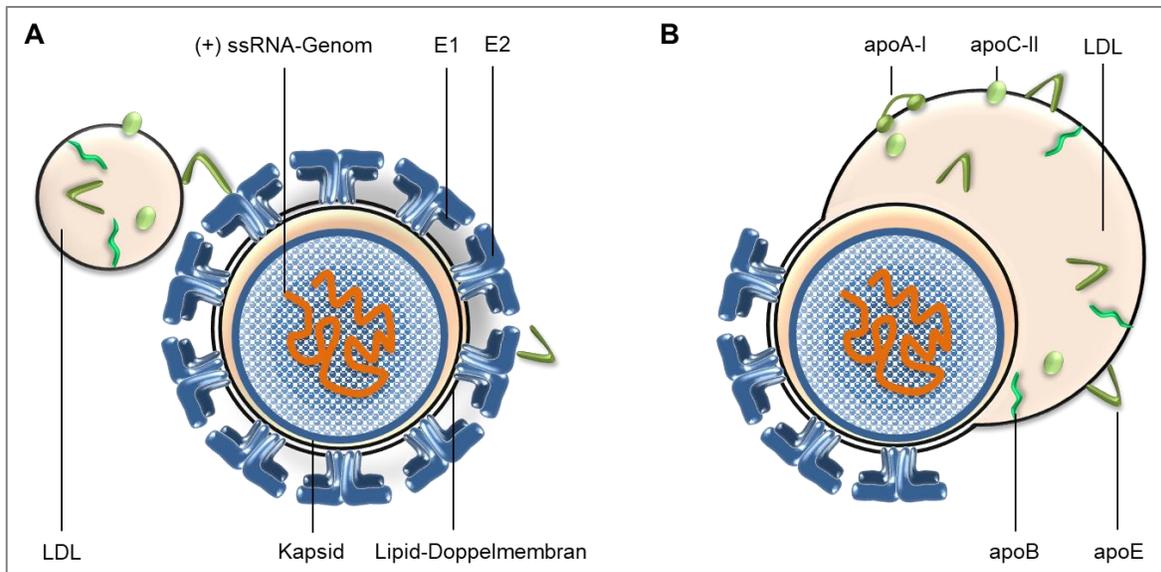


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Morphologie von HCV-Partikeln. Dargestellt sind die Modelle der lipoviralen Partikel in denen **(A)** die Lipoproteine mit geringer Dichte (engl. *low density lipoprotein*, LDL) peripher mit dem Virus verbunden sind oder **(B)** HCV sich mit dem LDL eine Hülle teilt und als Hybridpartikel vorliegt. Das einzelsträngige und positiv orientierte ((+)ss) RNA-Genom wird von dem Kapsid umhüllt. Dieses umgibt eine Doppelmembran zellulären Ursprungs, in welche die viralen Glykoproteine E1 und E2 eingelagert sind. Die LDLs sind mit verschiedenen Apolipoproteinen (apo) assoziiert. Eigene Darstellung mit Information aus Lindenbach und Rice [26].

Aufgrund der Interaktion der HCV-Partikel mit speziellen Serum-Lipoproteinen und Lipiden (engl. *low density lipoprotein*, LDL) weisen diese eine geringere Dichte im Vergleich zu anderen membranumhüllten Viren auf. Die gebildeten Lipoviralen Partikel (LVP) fördern das Eindringen in die Wirtszelle und schützen zudem vermutlich das Virus vor Antikörpern. Beteiligt an dieser Interaktion sind verschiedene Apolipoproteine (apo) wie apoA-I, apoB, apoC-II und apoE. Nicht sicher ist, ob das Virus mit den Lipoproteinen peripher verbunden ist (Abbildung 1-1, A) oder mit ihnen ein Hybridpartikel bildet (B) [27,28].

1.1.2.1 Genomaufbau

Mit einer Genomlänge von ca. 9600 Nukleotiden (nt) besitzt HCV als Mitglied der *Flaviviridae* ein eher kleines Genom (durchschnittlich 9 – 13 kb) [29]. Der schematische Aufbau ist in der Abbildung 1-2 dargestellt. Das RNA-Genom besitzt einen einzelnen offenen Leserahmen (engl. *open reading frame*, ORF), der an beiden Enden von nicht translatierten Regionen flankiert wird (engl. *untranslated region*, UTR).

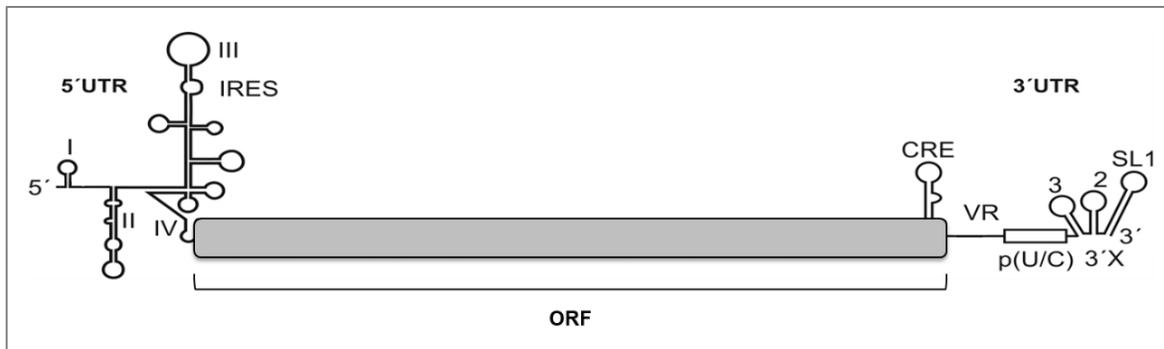


Abbildung 1-2: Genomorganisation des HCV. Der offene Leserahmen (ORF) wird von zwei nicht translatierten Regionen (UTR) flankiert. IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, CRE: cis-agierendes Replikationselement, VR: variable Region, p(U/C): poly-Uracil/Cytosin-Trakt, SL: Haarnadelschleifen (engl. *stem loop*). Verändert nach Niepmann [30].

Die 5'-gelegene UTR des HCV-Genoms bildet eine hochkonservierte Sekundärstruktur, bestehend aus vier Haarnadelschleifen (engl. *stem loops*, SL) [31]. SL I und II sind unerlässlich für die Replikation des HCV-Genoms, und die Region zwischen SL I und II beinhaltet zwei Bindungsstellen für die leberspezifische microRNA-122 (miR-122), wobei sich die Anlagerung der miR-122 positiv auf die Replikation, Translation und Stabilität der HCV-RNA auswirkt [32–37]. Auf die Interaktion der miR-122 mit HCV soll im Kapitel 1.3.1.1 näher eingegangen werden. Im Gegensatz zu den meisten eukaryotischen mRNAs und vielen viralen (+)RNA-Genomen besitzt HCV kein Cap zur Initiation der Translation. Diese Aufgabe übernimmt die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), welche von den SLs II-IV und den ersten 20 – 30 nt der codierenden Sequenz gebildet wird. An die IRES können die 40S-Ribosomen-Untereinheiten sowie andere zelluläre Faktoren wie eIF3 binden und die Translation einleiten (siehe 1.2.2) [38].

Die 3'UTR kann in drei Hauptabschnitte unterteilt werden: die variable Region (VR), den poly-Uracil/Cytosin-Trakt (p(U/C)) und die 3'X Region. Für die letztgenannte Region liegen zwei unterschiedliche Strukturmodelle vor: zum einen eine aus drei SLs bestehende (SL 1 – 3) und zum anderen eine aus SL1 und der sogenannten DLS (engl. *dimerization linkage sequence*) gebildete Struktur [31]. Die 3'UTR ist für die virale Replikation, Translation, Enkapsidierung und Infektiosität von besonderer Bedeutung [39–41].

Eine weitere für das Virus essenzielle Haarnadelstruktur (5BSL3.2) ist das cis-agierende Replikationselement (CRE), welches sich im NS5B-codierenden Bereich befindet. CRE agiert als ein negativer Regulator der Translation und wirkt sich positiv auf die Replikation aus [42]. Es trägt des Weiteren vermutlich zur Bildung der Genom-Dimerisierung bei [43]. Zudem agiert das Element mit mehreren anderen Sekundärstrukturen und zellulären Proteinen zusammen [44].

1.1.2.2 Exprimierte Proteine

Die HCV-Proteine lassen sich in Strukturproteine (C, E1, E2) und Nicht-Strukturproteine (p7, NS2 – NS5) unterteilen, oder auch in das Aufbau- und Replikations-Modul (siehe Abbildung 1-3).

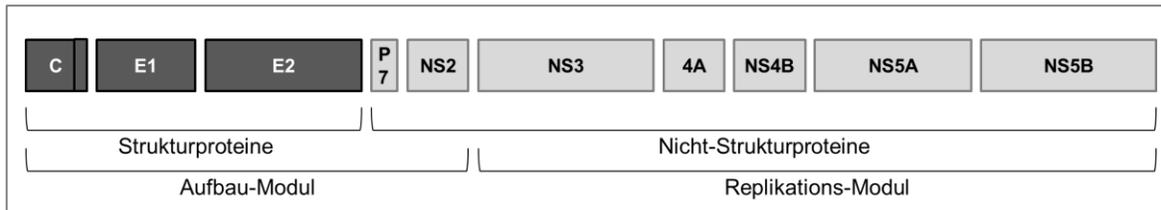


Abbildung 1-3: Aufbau des HCV-Polyproteins. Nach co- und post-translationalen Prozessierungen entstehen aus dem Polyprotein die Strukturproteine Core (C), E1 und E2, sowie die Nicht-Strukturproteine (p7 – NS5B). Die Proteine lassen sich auch in ein sogenanntes Aufbau-Modul und Replikations-Modul unterteilen, wobei letzteres dem Namen entsprechend den Replikationskomplex des Virus bildet.

Nach der IRES-vermittelten Translation kommt es zur Prozessierung des ca. 3000 Aminosäuren langen Polyproteins (siehe 1.2.3). Das Core-Protein bildet das virale Nukleokapsid und trägt, indem es die RNA (Chaperon-Aktivität) bindet und mit Lipidorganellen (engl. *lipid droplets*, LD) assoziiert ist, zur Verpackung des Genoms bei [45,46]. Zudem reguliert es unter anderem die zelluläre Transkription. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*, MHC)-I wird beispielsweise hoch reguliert [47], und es kommt durch die Rekrutierung der DNA Methyltransferase 1 sowie der Histon-Deacetylase 1 zu epigenetischen Promotor-Stilllegungen [48–50]. Die beiden stark glykosylierten Typ-I-Transmembranproteine E1 und E2 sind vor allem an der Anlagerung an die Zelle und die Rezeptor-vermittelte Aufnahme in die Zelle beteiligt [51,52]. Die beiden Proteine bilden Heterodimere, wobei E2 zusätzlich an sich selbst binden kann [26]. Ebenfalls als Oligomer tritt das kleinste exprimierte Protein p7 auf. Es gehört zur Gruppe der Viroporine und fungiert als hydrophober Eisenkanal [53,54]. Essentiell für die Produktion infektiöser Partikel ist zudem NS2, welches mit p7 unter anderem die viralen Komponenten miteinander vereinigt [55]. In Verbindung mit NS3 weist es eine autokatalytische Funktion als Cystein-Protease auf [56]. NS3 besitzt N-terminal eine Serin-Protease, welche zusammen mit ihrem Cofaktor NS4A zur Spaltung des Polyproteins beiträgt, und C-terminal eine Helikase/ATPase, die wichtig für die Replikation ist [57]. NS4A verankert das NS3/NS4A-Heterodimer in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und fördert die ATP-Hydrolyse [58,59]. Zudem leitet es den NS3-4A-Komplex zu den mitochondrialen Membranen, wo durch Spaltung des MAVS (engl. *mitochondrial antiviral-*

signaling protein) die zelluläre Interferon-Antwort unterdrückt wird [60]. Ein weiteres oft als Oligomer vorliegendes Membranprotein ist NS4B, welches an der Bildung des sogenannten membranösen Netzes (engl. *membranous web*, MW) sowie des Replikationskomplexes beteiligt ist. Hierbei interagiert es sowohl mit der HCV-RNA als auch mit anderen Proteinen, was beim Zusammenbau der Partikel eine wichtige Rolle spielt [61,62]. NS5A ist ein RNA-bindendes Phosphoprotein mit Zinkfingerdomäne. Es ist in der Membran verankert und rekrutiert zelluläre Proteine, wodurch es sowohl eine Rolle bei der Replikation als auch bei dem Zusammenbau des Virus spielt [63,64]. Das zuletzt translatierte HCV-Protein ist die RNA-abhängige-RNA-Polymerase NS5B, welche die typische Konformation einer rechten Hand hat [65]. Neben der Replikation des Genoms hat NS5B eine cis-regulierende Funktion bei der Bildung des Replikationskomplexes, interagiert mit verschiedenen zellulären Proteinen und unterstützt den Partikel-Zusammenbau [66–68].

1.2 Replikationszyklus des HCV

Der HCV-Replikationszyklus lässt sich in mehrere Abschnitte unterteilen (Übersicht siehe Abbildung 1-4). Über die Anlagerung und Rezeptor-vermittelte Endozytose gelangt das Virus in die Wirtszelle, wo es zu einer pH-abhängigen Fusion und Freisetzung des viralen Genoms kommt (1.2.1). Die HCV-RNA wird IRES-abhängig direkt am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert (1.2.2, 1.2.3). Nach Prozessierung des entstandenen Polyproteins kommt es zur Replikation und Bildung neuer Genome in membranösen Vesikeln (1.2.4). Die virale RNA wird verpackt und gelangt über den sekretorischen Weg aus der Zelle (1.2.5) [69]. Im Folgenden soll auf die einzelnen Schritte des Zyklus näher eingegangen werden.

1.2.1 Anlagerung und Aufnahme in die Wirtszelle

Wie bei vielen Viren, gelangt das HC-Virus bei einer primären Infektion über das Blut zu den Wirtszellen. Die weitere Verbreitung erfolgt vor allem über direkte Zell-Zell-Transmission. Eine erste Anlagerung des Virus an die Zelle erfolgt durch Bindung an Heparan-Sulfat-Proteoglykan und den Scavenger-Rezeptor B1 (SRB1). Vermutet wird, dass dieser erste Kontakt über apoE beziehungsweise E2 erfolgt [70,71]. Auch Glycoaminoglycane (GAGs), welche eine hohe Affinität zu apoE aufweisen, sind an der primären Bindung beteiligt [72].

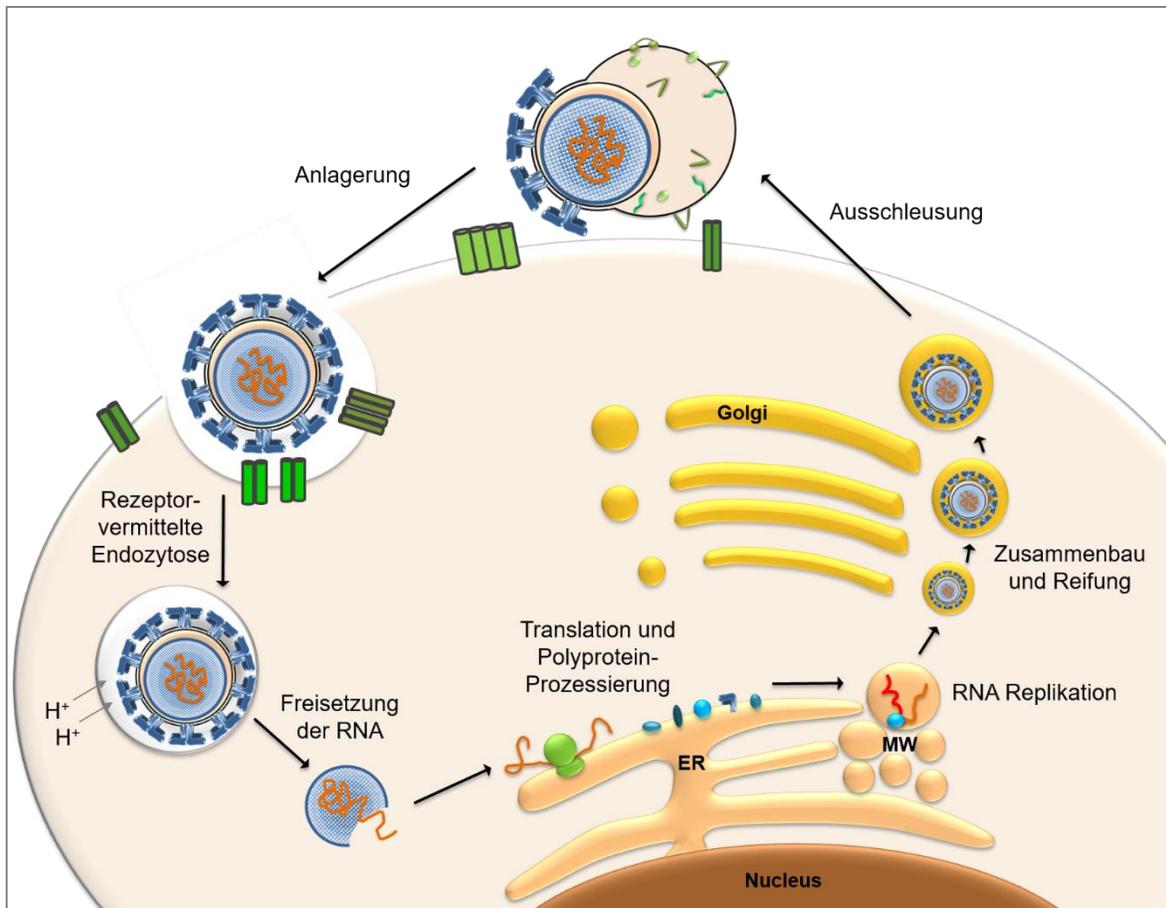


Abbildung 1-4: Darstellung des HCV-Replikationszyklus. Der Zyklus beginnt mit der Anlagerung des Virus an zelluläre Rezeptoren und der so vermittelten Endozytose. In der Zelle kommt es zu einer pH-abhängigen Fusion der Membranen und Freisetzung des HCV-RNA-Genoms. Es folgt die Translation und Polyprotein-Prozessierung am Endoplasmatischen Retikulum (ER). In dem gebildeten membranösen Netz (engl. *membranous web*, MW) wird die RNA repliziert. Die Partikel werden anschließend zusammengebaut und über den sekretorischen Weg aus der Zelle geschleust.

Die Anlagerung des Virus an SRB1 erlaubt den Kontakt von E2 mit dem Tetraspanin CD81 [73], was den HCV-Mantel auf die pH-abhängige Fusion mit der Zelle vorzubereiten scheint [74]. Durch diese Interaktion wird ergänzend die Raf/MEK/ERK Signalkaskade und die Rho GTPase aktiviert, welche für einen Umbau des Aktin-Zytoskeletts sorgen [75]. Dies ermöglicht den Kontakt zu den Tight-Junction Proteinen Claudin-1 und Occludin, welche essentiell für die Aufnahme des Virus in die Zelle sind [76–78]. Die Endozytose in die Wirtszelle wird letztendlich durch Clathrin vermittelt [79]. Eine endosomale Azidifizierung sowie die durch Konformationsänderung der Glykoproteine vermittelte Fusion der Membranen resultieren in der Freisetzung der viralen RNA in das Zytoplasma [80].

1.2.2 IRES-abhängige Initiation der Translation

Bis zur Entdeckung der komplexen Sekundärstrukturen einer IRES 1988 in Polioviren und Encephalomyokarditis Viren (EMCV) wurde davon ausgegangen, dass die Initiation der Translation obligatorisch Cap (m^7GpppN)-abhängig ist [81,82]. In den darauffolgenden Jahren wurden vier Gruppen an viralen IRES-Strukturen charakterisiert, welche unterschiedlich strukturiert sind und verschiedene eukaryotische Initiationsfaktoren benötigen [83–86]. Auf die Initiation durch die HCV-IRES soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Die HCV-IRES wird von den SLs II – IV zusammen mit den ersten Nukleotiden der codierenden Sequenz gebildet und umfasst ca. 340 nt [38,87]. Die HCV-5'UTR sowie die Translationsinitiation ist schematisch in Abbildung 1-5 dargestellt. Im Gegensatz zur Cap-abhängigen Translationsinitiation kann die HCV-IRES die 40S-Ribosomen-Untereinheit (UE) direkt und ohne die Unterstützung weiterer Faktoren an das Startcodon binden [88]. Von besonderer Bedeutung für die Bindung des Ribosoms an das AUG ist die Kernsequenz der IRES, eine Pseudoknotenstruktur geformt von den Abzweigungen am SL III_f [89,90]. Der apikale Teil des SL II sorgt für die nötige Konformationsänderung der 40S-UE und interagiert mit SL IV [91–93]. Um den 48S-Präinitiationskomplex zu bilden, werden die eIFs 2, 3 und 5 benötigt. Faktor-4-Gruppenmitglieder, welche normalerweise an das Cap binden und durch Interaktion mit poly(A)-Bindeproteinen (PABP) für die Zirkularisierung und Bindung des 43S-Prä-Initiationskomplexes mitverantwortlich sind, werden für den Start der Translation des HCV-Polyproteins nicht benötigt [88]. Nach der direkten Anlagerung der 40S-UE an die virale IRES bindet eIF3 an den apikalen Teil von SL III [94]. Es konnte gezeigt werden, dass die eIF3-Bindung eher von der Geometrie von SL III_{abc} abhängt als von seiner Primärsequenz [95]. Deletiert man SL III_b, wird die Affinität gegenüber eIF3 stark reduziert. Dennoch kann sich der 80S-Komplex bilden, wenn auch mit deutlich geringerer Effizienz als beim Wildtyp [96,97]. Eine der wichtigsten konservierten Regionen der IRES ist jedoch der äußere Teil von SL III_d. Das GGG-Motiv ist essentiell für die Translation aller HCV Genotypen und HCV-ähnlichen IRESs [98–100], denn das Triplet interagiert mit einem CCC-Motiv der 18S rRNA [101]. Die Initiator-tRNA, GTP und eIF2 formen den ternären Komplex (eIF2-GTP-tRNA^{Met}), welcher sich an den SL IV mit integriertem AUG anlagert. Zusammen mit der 40S-UE formt sich der 48S-Komplex, in dem die Met-tRNA an das AUG in der P-Stelle des Ribosoms bindet. Der Faktor 5 unterstützt zum einen die Startcodonerkenkung durch den ternären Komplex und agiert zum anderen als Aktivator der GTPase von eIF2. Durch die GTP-Hydrolyse kommt es zur Freisetzung der eIFs. Die Bindung der 60S-Ribosomenuntereinheit erfolgt mit Hilfe der GTP-Hydrolyse durch eIF5B [102]. Hierbei ist zudem der SL II wichtig, denn wird dieser deletiert, kann sich die 60S-UE

nicht anlagern [97]. Es wird vermutet, dass, im Gegensatz zur Cap-abhängigen Initiation, eIF3 mit dem 80S-Ribosom weiterhin assoziiert bleiben kann [103].

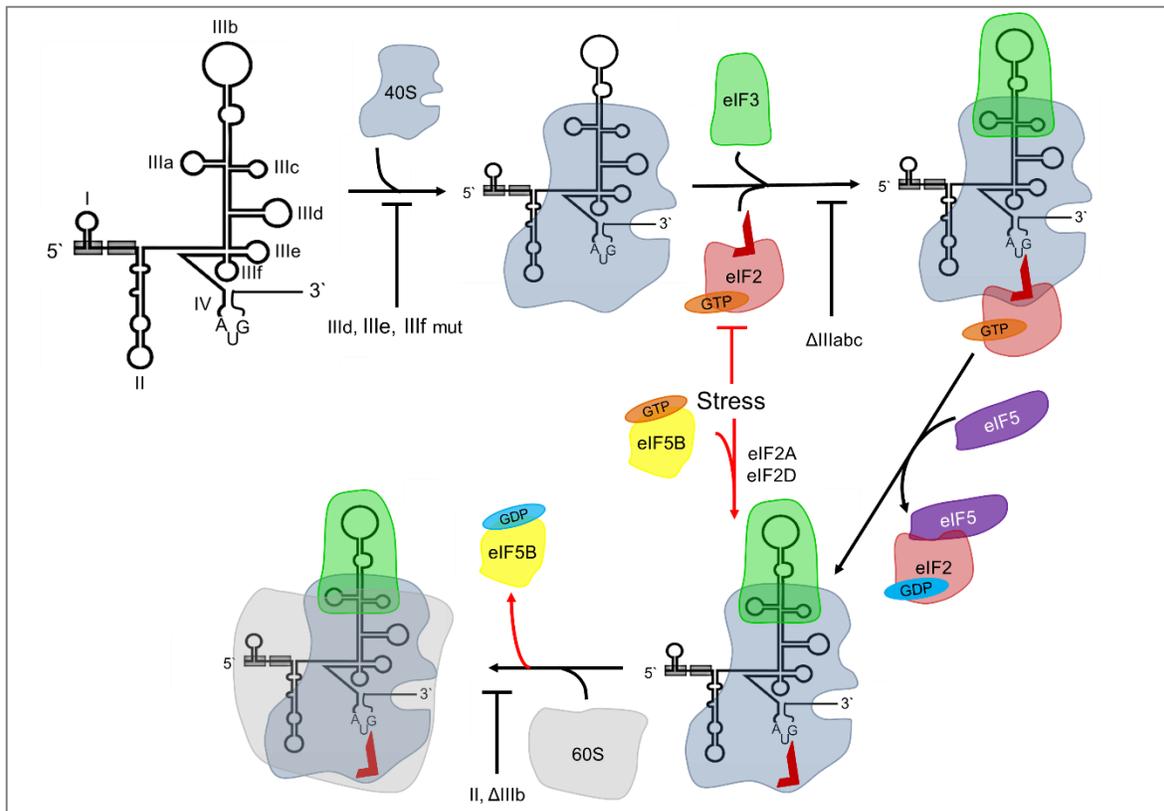


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der HCV-IRES-abhängigen Initiation der Translation. Die ribosomale 40S-Untereinheit bindet direkt, ohne Hilfe weiterer eukaryotischer Initiationsfaktoren (eIF) an die IRES. Durch eIF3-Anlagerung an den apikalen Teil von SL III wird die Bindung von 40S gestärkt. Die Initiator-tRNA, GTP und eIF2 formen den ternären Komplex, welcher sich an den SL IV mit integriertem AUG anlagert. Faktor 5 agiert als GTPase-Aktivator, wodurch es zur GTP-Hydrolyse und Freisetzung von eIF-GDP kommt. Durch die anschließende Anlagerung der 60S-Untereinheit und Bildung des 80S-Ribosoms kommt es zur Initiation der Translation. Durch Stress kann die Aktivität von eIF2 unterdrückt werden, wobei HCV in der Lage ist, andere Faktoren (eIF5B, 2A oder 2D) zu nutzen (rote Pfeile). Einzelne Schritte der Initiation lassen sich durch Mutationen in der IRES inhibieren (schwarze Markierung (⊣) unter den Pfeilen). Eigene Darstellung mit Informationen aus [115].

Zellen können als Reaktion auf virale Infektion oder andere Stressoren wie Hypoxie, Nahrungsmangel, Temperaturschwankungen und ER-Stress die Aktivität von eIF4E und eIF2 unterdrücken. So wird die zelluläre Proteinsynthese gemindert, was zu einer Energieeinsparung von bis zu 50 % führt [104,105]. Einige eukaryotische RNAs werden in solchen Situationen möglicherweise ebenfalls durch IRESs reguliert. Hierzu zählen unter anderem mRNAs für Wachstumsfaktoren wie der *Fibroblast growth factor 2* [106], die

Onkogene *c-myc* und *p58* [107,108] und *La* [109]. Die molekularen Mechanismen zellulärer IRES-Strukturen sind jedoch bis heute nur wenig verstanden und deutlich schlechter charakterisiert als die der viralen IRESs. Im Fall einer HCV-Infektion kommt es in der Zelle zur Aktivierung der Proteinkinase R, welche wiederum eIF2 durch eIF2 α Phosphorylierung inhibiert [110]. HCV ist in der Lage, andere Faktoren, namentlich den eIF2-ähnlichen eIF5B-GTP [111], eIF2D [112] und eIF2A [113], zur Rekrutierung der Initiator-tRNA und 60S-UE zu nutzen. In eIF2A und eIF2D depletierten Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Initiation der Translation an der HCV-IRES auch bei phosphorylierten eIF2 α stattfindet [114], was mit der Verwendung von eIF5B konsistent ist.

1.2.3 Translation und Prozessierung des Polyproteins

Nach der IRES-abhängigen Initiation kommt es zur vollständigen Translation und Prozessierung des Polyproteins. Neben den eIFs tragen auch eine Vielzahl an anderen RNA-bindenden Proteinen zu der viralen Translation bei. Diese sogenannten ITAFs (IRES trans-agierenden Faktoren) sind am zellulären RNA-Metabolismus beteiligt und weisen meist mehrere RNA-Bindungsdomänen auf. Prominente Beispiele der translationsfördernden ITAFs sind das La-Protein, NS1-assoziiertes Protein (NSAP1), heterogenes nukleares Ribonukleoprotein (hnRNP) L und D, Insulin-like growth factor 2 (IGF2), mRNA-Bindungs Protein 1 (IMP-1), sowie das Sm-ähnliche Proteine (LSm1-7) [38,116]. Auch miR-122 wirkt sich positiv auf die Bildung des HCV-Polyproteins aus [33]. Andere zelluläre Proteine senken die IRES-abhängige Initiation der Translation, wie DEAD Box Protein 5 (DDX5) und Poly-[ADP-Ribose] Polymerase 1 (PARP1) [44].

Einige weitere Regionen des HCV-Genoms tragen ebenfalls zur Regulation der Translation bei. So wird diese beispielsweise zusätzlich von der 3'UTR stimuliert [117,118]. Vor allem die variable Region, der poly(U/C) Trakt und SL 1 sind hier von Bedeutung [119]. Über den Einfluss des CRE auf die Translation existieren sich widersprechende Veröffentlichungen. Einerseits wurde gezeigt, dass CRE mit dem SL IIIId innerhalb der IRES interagiert, was wiederum die Translation inhibiert [120], andererseits, dass die Interaktion zwischen CRE und dem SL 2 der 3'UTR die Translation stimuliert [121]. Es konnte gezeigt werden, dass die kompensierende Mutation der Nukleotide 53 – 55 (AAC) im SL II zu einer hundertprozentigen Inhibierung der viralen Translation führt [122]. Zwei Haarnadelstrukturen in der Core-codierenden Sequenz wirken sich zudem positiv auf die Translation aus [123]. Durch das Stoppcodon UAG wird die Translation am Ende des ORF des HCV-Genoms terminiert.

Um die einzelnen funktionalen Proteine zu bilden, kommt es zur Prozessierung des Polyproteins (siehe Abbildung 1-6). Das co- und post-translational verlaufende Schneiden

erfolgt sowohl durch zelluläre als auch virale Proteasen. Die Strukturproteine und p7 werden hierbei proteolytisch von einer zellulären Signalpeptidase des ER geschnitten. Das Core Protein weist eine C-terminale Erkennungssequenz auf, welche von einer anderen zellulären Signal-Peptid-Peptidase erkannt und gespalten wird. Die viralen Proteine NS2/3 spalten sich autokatalytisch. Alle weiteren Trennungen erfolgen durch die Serinprotease NS3 zusammen mit ihrem Co-Faktor NS4A [124]. Die am ER translatierten und prozessierten Proteine bleiben in der Membran lokalisiert, wobei NS3 die einzige Ausnahme bildet.

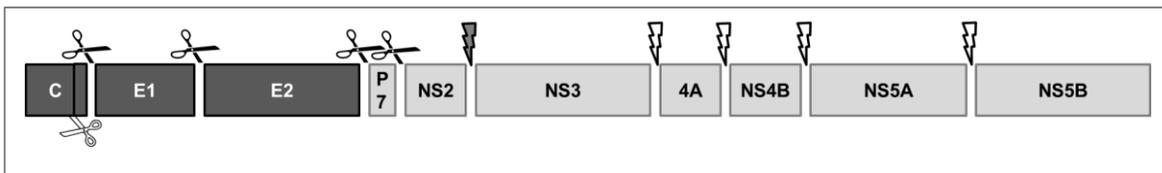


Abbildung 1-6: Prozessierung des HCV-Polyproteins. Die Strukturproteine und p7 werden proteolytisch von einer zellulären Signalpeptidase des Endoplasmatischen Retikulums geschnitten (schwarze Schere). Das Core Protein weist eine C-terminale Erkennungssequenz auf, welche von einer anderen zellulären Signal-Peptid-Peptidase erkannt und gespalten wird (weiße Schere). Die viralen Proteine NS2/3 spalten sich autokatalytisch (dunkler Blitz). Alle weiteren Trennungen erfolgen durch die Serinprotease NS3 (heller Blitz). Eigene Darstellung mit Informationen aus [124].

Es wird vermutet, dass es durch die Interaktionen zwischen dem 5'- und dem 3'- Ende des Virus, beziehungsweise einer möglichen Zirkularisierung des Genoms, zu einem Umschalten zwischen Translation und Replikation kommen kann [30]. Eine Rolle spielt hierbei vermutlich die Interaktion zwischen miR-122, PTB und PCPB2 [125]. Zudem könnten Proteine, welche spezifisch an die RNA binden, oder RNA-Sekundärstrukturen zu diesem Wechsel führen [126]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es durch die Bindung von NS3 an die virale RNA zur Verdrängung des La-Proteins kommen kann und somit zur Reduktion der Translation und vermehrten Replikation des Genoms [127]. Auch durch die Bindung des Core Proteins an den SL IIIId kommt es zur Blockierung der Translation [128].

1.2.4 Replikation des HCV-RNA-Genoms

Ein Merkmal der HCV-Infektion ist die Entstehung von Membranvesikeln, welche das sogenannte membranöse Netz (engl. *membranous web*, MW) bilden. Als dominante Form wurden Doppel-Membranvesikel mit einem Durchmesser von 80 bis 180 nm beobachtet, welche als Ort der Replikation gelten und vom ER abstammen [129–131]. Das MW schützt den Replikationskomplex sowohl vor Proteasen als auch Nukleasen und der zellulären Immunantwort [132]. Lange wurde davon ausgegangen, dass alleine NS4B durch

Oligomerisierung für die Bildung des MW verantwortlich ist [133,134]. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass nur die kombinierte Expression aller Replikationsproteine zu der Bildung des MW führt. Einige zelluläre Proteine, wie die Phosphatidylinositol 4-Kinase (PI4KIIIa), Prolin-Serin-Threonin Phosphatase-interagierendes Protein 2 (PSTPIP2) und Cyclophilin A (CypA), sowie Lipide, sind ebenfalls von essentieller Bedeutung für die Replikation [135–137]. Die einzelnen Vesikel des MW sind größtenteils mit dem ER verbunden und nur ca. ein Zehntel besitzt eine Öffnung zum Zytoplasma [130]. Diese Öffnungen sind jedoch sowohl für die Aufnahme von Nukleotiden als auch zur Abgabe der gebildeten RNA aus den Vesikeln in das Zytoplasma von Bedeutung. Neuen Erkenntnissen zu Folge bilden sich die Doppel-Membranvesikel hauptsächlich *in vitro*, denn in Biopsien konnten vor allem Vesikel mit einer einzelnen Membran nachgewiesen werden [138].

Die erhöhte Replikation des HCV-Genoms startet ungefähr 12 bis 24 Stunden nach der Infektion [127]. Den Kern des Replikationskomplexes bilden hierbei die viralen Proteine NS3-NS5B zusammen mit der HCV-RNA, wobei als Schlüsselenzym die RNA-abhängige-RNA-Polymerase NS5B gilt. Obwohl die einzelnen viralen Proteine gut charakterisiert sind (siehe auch Abschnitt 1.1.2.2), verbleibt das genaue Zusammenspiel des Komplexes teils unklar. NS5B ist C-terminal stark hydrophob und in der Membran verankert. Mit einer "geschlossenen rechten Hand"-Konformation kann die katalytische Domäne nur ein einzelsträngiges RNA-Molekül umfassen und startet die Produktion der RNA vermutlich *de novo* [65,139]. Es ist jedoch aufgrund des SLs 1 am Ende des HCV-Genoms nicht völlig klar, wie genau dies abläuft. Nach der Bindung der ersten beiden Nukleotide am 3'-Ende und Synthese des Dinukleotidprimers kommt es zur Bindung eines GTPs an eine allosterische Bindungsstelle der Polymerase und zur Konformationsänderung von NS5B, wodurch Platz für den entstehenden RNA-Doppelstrang gebildet wird [140,141]. Nach der vollständigen Elongation des Minusstranges terminiert die Synthese durch das Erreichen des Strang-Endes. Der gebildete Strang dient nun als neue Vorlage für die Plusstrang-Synthese. Diese scheint deutlich effizienter und schneller abzulaufen als die des Minusstranges, wodurch ein deutlicher Überschuss an HCV-Genomen gebildet wird [30,124,142]. Die Initiation erfolgt ebenfalls *de novo* am 3'-Ende des Minusstranges.

Als Intermediat der Replikation entsteht ein RNA-Doppelstrang, das heißt ein Pathogen-assoziiertes molekulares Muster, welches vom Immunsystem mit Hilfe des Toll-like Rezeptors 3 erkannt werden kann. Die Anzahl an dsRNA in Patienten korreliert zudem mit der Expression von Interferon-stimulierten Genen [143].

1.2.5 Zusammenbau und Freisetzung der Viruspartikel

Der finale Schritt des HCV-Replikationszyklus beinhaltet den Zusammenbau und die Freisetzung der viralen Partikel. HCV nutzt dabei den sekretorischen Weg der LDL in der Wirtszelle. Neben dem Umgestalten der Membranen zum MW kommt es zu einer veränderten Lipidzusammensetzung und Verteilung in der Zelle [144]. An der Assemblierung des Virus sind zytosolische Lipidtröpfchen (engl. *lipid droplets*, LD) und mehrere zelluläre Faktoren, die physiologisch Lipoproteine bilden, beteiligt [46]. Eine zentrale Rolle bei dem Zusammenbau der HCV-Partikel spielt Core, welches durch Abspaltung der Domäne 3 zusammen mit verschiedenen zellulären Proteinen zu den LDs rekrutiert wird [145]. Unter anderem durch den Einfluss der zytosolischen Phospholipase A2 (cPLA2) und der Diacylglycerol-O-Acyltransferase 1 (DGAT-1) assoziiert sowohl Core als auch NS5A mit den LD [146,147]. Beide viralen Proteine besitzen RNA-Bindedomänen und interagieren miteinander. Es wird vermutet, dass NS5A für das Umschalten zwischen der RNA-Replikation und der Verpackung des Genoms von essentieller Bedeutung ist [28]. Auch andere Proteine des viralen Replikationskomplexes spielen eine Rolle beim Zusammenbau der Viren. NS2 interagiert sowohl mit NS3-4A als auch mit E1/E2 und bringt die Komponenten am ER zusammen. NS3 ist mit seiner Helikase-Domäne vermutlich am Verpacken der viralen RNA beteiligt [148,149]. Die Apolipoproteine werden für den Zusammenbau ebenfalls benötigt, wobei vor allem apoB und apoE, das mit NS5A und den Hüllproteinen interagiert, eine zentrale Rolle spielen [150]. Die viralen Partikel werden schließlich über den sekretorischen Weg zum Golgi-Apparat transportiert, wo die Hüllproteine noch einmal modifiziert werden [151,152]. An der finalen Ausschleusung der Partikel aus der Zelle sind Mikrotubuli und Endosomen beteiligt [153].

1.3 Interaktion zwischen HCV und Wirtsfaktoren

Alle biologischen Prozesse, bereits auf kleinster Ebene, beruhen auf Interaktionen zwischen Systemen und Akteuren. Viren sind nicht in der Lage, sich selbstständig zu replizieren, sondern sind ausnahmslos von ihren Wirten und deren Faktoren abhängig. Das HC-Virus stellt hierbei keine Ausnahme dar. Einige der essentiellen Wirtszellfaktoren wurden bereits im Abschnitt 1.2 genannt. So spielen die Apolipoproteine und verschiedene Rezeptoren wie CLDN1 und OCLN eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme des Virus in die Zellen. Auch an der Bildung des MW sind zelluläre Proteine wie CypA und PI4KIIIa maßgeblich beteiligt. Die Translation erfolgt mit Hilfe der eIFs, ITAFs und weiterer Faktoren. Auf die Interaktion zwischen HCV und nicht-codierenden RNAs sowie den Einfluss auf die Entwicklung von Leberzellkarzinomen soll im Folgenden etwas näher eingegangen werden.

1.3.1 HCV und nicht-codierende RNAs

Lange wurden nicht-codierenden (nc) RNAs als „Müll“ bezeichnet, bis sich nach und nach verschiedenste essentielle biologische Funktionen offenbarten. Zu den ncRNAs, welche allesamt nicht in Proteine translatiert werden, zählen beispielsweise die als erstes entdeckten Transfer-RNAs (tRNA), ribosomale RNAs (rRNA), sowie verschiedene regulatorische RNAs [154]. Im Vergleich zu den ncRNAs stellen die proteincodierenden Bereiche der mRNAs mit ca. 2 % nur einen geringen Teil der zellulären RNA dar [155]. In der folgenden Tabelle 1-1 sind einige regulatorische ncRNAs aufgeführt und kurz charakterisiert.

Tabelle 1-1: Beispiele regulatorischer nicht-codierender (nc) RNAs. Zusammengefasst aus [156–158].

ncRNA	Funktion
Kleine nukleare RNA (snRNA)	Splicing
Kleine nukleoläre RNA (snoRNA)	Modifikation von RNAs
Antisense-RNA (aRNA)	Genregulation, RNA-Abbau oder Stabilisierung
Kleine interferierende RNA (siRNA)	RNA-Interferenz
PIWI interagierende RNA (piRNA)	Transposonabwehr, epigenetische Effekte
Lange RNA (lncRNA)	Verschiedene regulatorische Funktionen
microRNA (miRNA)	Posttranskriptionale Genregulation, Silencing

Aufgrund des Einflusses von ncRNAs auf die Genexpression der Zellen ist es nicht weiter verwunderlich, dass auch die HCV-Replikation in Verbindung mit ihnen steht. Durch die Wechselbeziehung zwischen ncRNAs und HCV kann es zum einen zu einer veränderten Replikation des Virus kommen, zum anderen zu einer veränderten Expression der zellulären RNAs und einem möglichen Ungleichgewicht in den Hepatozyten. Es wird vermutet, dass dies zu der Entstehung des HCV-induzierten HCCs beitragen kann (siehe auch 1.3.2) [159].

Verschiedene lncRNAs interagieren nachweislich mit HCV. Die lncRNAs sind einzelsträngige, über 200 nt lange RNAs, welche eine Rolle in der Proliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose, sowie in der Stammzellerhaltung und Entwicklung spielen [160]. Sie werden ähnlich wie mRNAs gebildet und zum Teil gespliced, gecappt und polyadenyliert. Die meisten werden dabei spezifisch in bestimmten Geweben und zu bestimmten Zeiten exprimiert [161]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass aufgrund einer HCV-Infektion die lnc-ITM2C-1 hochreguliert wird und es so zu einer geringeren Expression der Interferon-stimulierenden Gene kommt, was sich wiederum positiv auf die virale Replikation auswirkt [162]. Einen gegensätzlichen Effekt zeigt lncRNA EGOT durch

Unterdrückung der antiviralen Immunantwort [163]. Die lncRNA-IFI6 wirkt sich durch Modifikation des Interferon-induzierten Proteins 6 ebenfalls negativ auf die HCV-Replikation aus [164]. Auch GAS5, BISPR, und lncITPRIP-1 unterdrücken die HCV-Replikation [165–167]. Oft sind die Interaktionen sehr komplex. Die Serin-Threonin-Kinase Wee1 beispielsweise ist von besonderer Bedeutung für den Eintritt der Zellen in die Mitose und steht bei Fehlregulierung in Zusammenhang mit der Krebsentstehung. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer HCV-Infektion die lncRNA NORAD mit einer anderen ncRNA, namentlich miR-373, interagiert und dadurch die Expression der Wee1 erhöht wird [168].

Auch andere miRNAs interagieren direkt, durch Bindung der viralen RNA, oder indirekt, durch Regulation zellulärer RNAs, mit HCV. Die miRNAs sind um die 20 – 24 nt lange, einzelsträngige RNAs, die durch spezifische Bindung an mRNA, zumeist an die 3'-UTR, für die posttranskriptionelle Repression der Genexpression von immenser Bedeutung sind. Die Biogenese der miRNAs ist in der Abbildung 1-7 schematisch zusammengefasst.

Sie entstehen aus von der Polymerase II generierten Primärtranskripten (pri-miRNA), die zunächst von RNase III Drosha-Proteinen zusammen mit den dsRNA-Bindeproteinen DGCR8 in pre-miRNA geschnitten werden. Nach dem Export aus dem Nukleus durch Exportin-5/Ran-GTP wird die pre-miRNA von Dicer zusammen mit TRBP, ebenfalls eine RNase III und ein dsRNA-Bindeprotein, in die reife miRNA prozessiert. Der Führungsstrang kann zusammen mit dem Argonaute-Protein 2 (Ago2), welches eine Endonukleaseaktivität besitzt, den sogenannten RNA-Induzierten-Silencing-Komplex (RISC) bilden, der Gegenstrang der miRNA wird degradiert. Durch unvollständige Bindung zwischen Ziel-mRNA und der im Ribonukleoproteinkomplex gebundenen miRNA (miRNP) kommt es zu einer Inhibierung der Translation, bei vollständiger Komplementarität hingegen zu einer Degradierung [170,169].

Meistens liegen die Ziel-Sequenzen der miRNPs in der 3'UTR von zellulären mRNAs und wirken dort vor allem auf die Stabilität der RNAs. Bei den deutlich seltener vorkommenden Bindungsstellen in der codierenden Region kommt es vermutlich eher zur Regulation der Translation [171]. Es wird angenommen, dass ca. 60 % aller Gene von miRNAs in ihrer Expression beeinflusst werden [172].

Dysregulation verschiedener miRNAs stehen im Zusammenhang mit einer Vielzahl an Erkrankungen. Einige miRNAs regulieren unter anderem die Immunantwort der Zelle. Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass beispielsweise miR-155, miR-130a und miR-21 durch eine HCV-Infektion hochreguliert werden [173–175]. Die miR-155 spielt eine wichtige Rolle bei der zellulären Immunantwort, indem sie die Bildung von T-Zellen begünstigt, aber auch Monozyten aktiviert und die Interferon (INF)-Produktion von

Killerzellen reguliert [176,177]. Die Hochregulierung von miR-130a wiederum sorgt für eine verminderte Sekretion von INF und verstärkte HCV-Replikation [174].

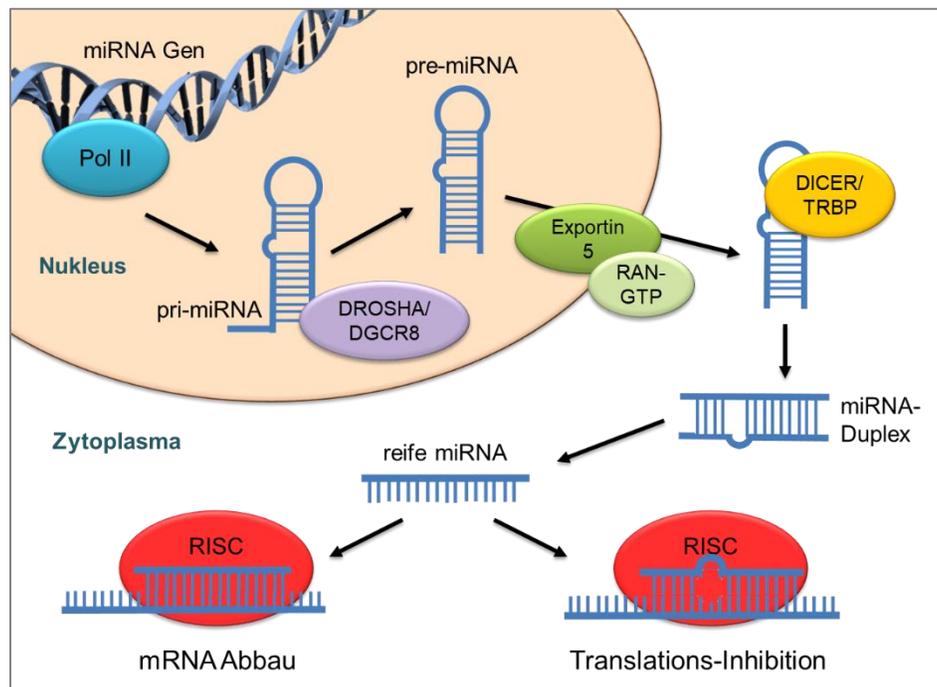


Abbildung 1-7: Biogenese der miRNAs. Die Polymerase II (Pol II) generiert Primärtranskripte (pri-miRNA), die zunächst von Drosha-Proteinen zusammen mit DGCR8 in pre-miRNA geschnitten werden. Exportin-5 zusammen mit Ran-GTP schleusen die pre-miRNA aus dem Nucleus aus. Im Zytoplasma wird sie von Dicer zusammen mit TRBP zum miRNA-Duplex prozessiert. Die reife miRNA kann zusammen mit Argonaute-Protein 2 den RNA-Induzierten-Silencing-Komplex (RISC) bilden. Bei einer unvollständigen Bindung zwischen Ziel-mRNA und der im RISC gebundenen miRNA kommt es zu einer Inhibierung der Translation, bei vollständiger Komplementarität hingegen wird die gebundene mRNA degradiert. Eigene Darstellung mit Informationen aus [169].

Die miR-21 unterdrückt die Typ 1 INF-Bildung und schützt so HCV vor der Immunantwort. Zudem spielt sie eine Rolle bei der Regulierung verschiedener Effektoren des Toll-like-Rezeptor (TLR)-Signalwegs, welcher für die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen verantwortlich ist [178]. Auch viele andere miRNAs aktivieren oder inaktivieren Signalwege, wodurch sie einen immensen Einfluss auf die Zellen haben. Auf weitere Beispiele [179] soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden. Bei der Entstehung von HCV-induziertem HCC spielen miRNAs ebenfalls eine wichtige Rolle [180]. In vergangenen Studien konnte eine Vielzahl von in HCV-infizierten Zellen regulierten miRNAs, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, identifiziert werden [181]. Die Forschung zur Interaktion einer speziellen miRNA mit HCV, der miR-122, sticht jedoch mit

über 2000 Einträgen in der biomedizinischen Datenbank PubMed Central besonders heraus [182].

1.3.1.1 HCV und miR-122

Die zunächst in Mäusen entdeckte und in verschiedenen Vertebraten hochkonservierte leberspezifische miR-122 macht bis zu 72 % der gesamten miRNA-Menge in adulten Hepatozyten aus [183,184], was sie zu der am höchsten exprimierten miRNA in Geweben überhaupt macht [185]. Neben der Regulation der Eisenhomöostase und der Interferon-Signalwege spielt die miR-122 im Cholesterin-Haushalt eine wichtige Rolle [186,151,187]. Im HCC ist miR-122 oft herunterreguliert, was mit einer schlechten Prognose korreliert [188,189]. Eine HCV-Infektion führt zu einem Abfall an der frei verfügbaren miR-122-Menge in den Zellen, wodurch weniger für die endogene Ziel-mRNA zur Verfügung steht und was möglicherweise zur Tumorgenese beiträgt [190].

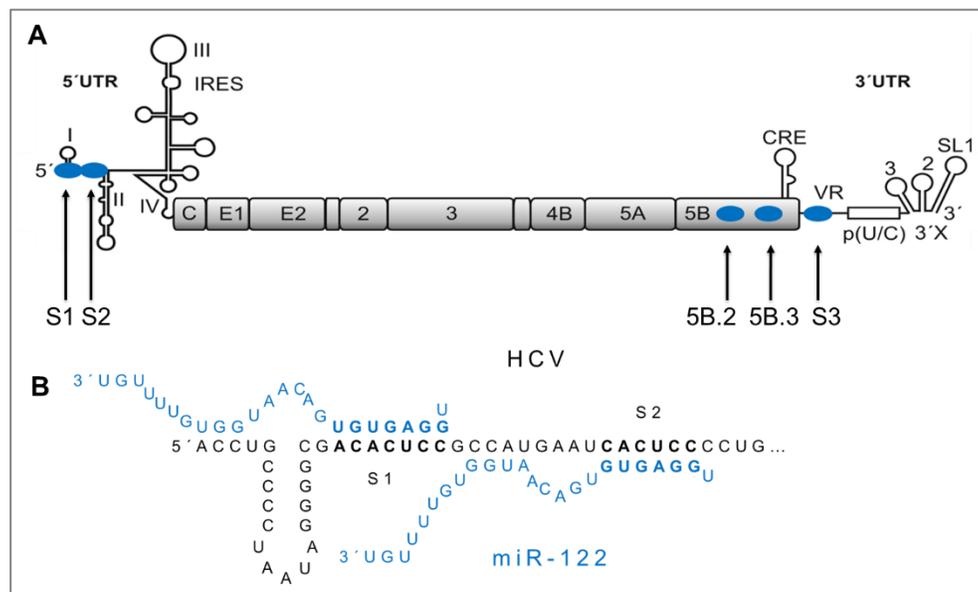


Abbildung 1-8: Interaktion der miR-122 mit HCV. A: Schematische Darstellung des HCV-Genoms mit der 5'UTR, dem Polyprotein-codierenden-Bereich, der 3'UTR sowie den konservierten Bindungsstellen S1, S2, 5B.2, 5B.3 und S3 der miR-122 (Blaue Ovale). **B:** Bindung der miR-122 (blau) an S1 und S2 in der HCV-5'UTR (schwarz). Die miR-122 bindet sowohl mit ihrer *seed*-Sequenz (dick) als auch mit der *supplemental*-Sequenz. UTR: nicht translatierte Region, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, CRE: cis-agierende Replikationselement, VR: variable Region, p(U/C): poly-Uracil/Cytosin-Trakt, SL: Haarnadelschleifen. Verändert nach Niepmann [30].

Es konnten durch Sequenzanalysen je nach HCV-Isolat mindestens fünf miR-122-Bindungsstellen im viralen Genom detektiert werden (siehe Abbildung 1-8, A) [191]. Verschiedene Studien zeigten, dass miR-122 in Assoziation mit Ago2 an die virale RNA bindet [192–194]. Die zwei am besten charakterisierten und hochkonservierten miR-Stellen S1 und S2 liegen, konträr zu den meisten zellulären Bindungsstellen, am Anfang der viralen 5'-UTR [195]. Zudem konnte in der IRES eine Anlagerung an den SL IV in 60 von 106 HCV-Isolaten detektiert werden [190,196]. In der NS5B-codierenden Region liegen zwei weitere konservierte Bindungsstellen (5B.2 und 5B.3), sowie in einigen Isolaten eine dritte (5B.1). Die fünfte zur miR-122 komplementäre und sehr stark konservierte Sequenz befindet sich in der VR der 3'-UTR des HCV-Genoms [191].

Besonders wichtig für die Bindung der miR-122 ist die von Ago2 exponierte *seed*-Sequenz (Nukleotide 2 – 7; 5'-GGAGUG-3'), wobei zunächst die Nukleotide 2 – 5 präsentiert werden [197]. Die Bindung wird durch Anlagerung einer sogenannten *supplemental*-Sequenz (Nukleotide 14 – 20) weiter verstärkt (siehe Abbildung 1-8, B) [194]. Ein Adenosin, welches gegenüber der ersten Position der miRNA liegt, kann zusätzlich die Affinität zur Ziel-RNA erhöhen [198].

Die Bindung der miR-122 an S1 und S2 sowie deren Auswirkungen auf den HCV-Lebenszyklus sind am besten beschrieben und am stärksten ausgeprägt. Im Jahr 2005 konnte das erste Mal ein funktioneller Zusammenhang zwischen der miR-122 und HCV gezeigt werden. Zellen, in denen die miR-122 *in vitro* sequestriert wurde, wiesen eine deutlich verminderte Anzahl an HCV-Genomen auf. Dies ist gegensätzlich zu der Unterdrückung der Translation und der Degradation der zellulären mRNAs, zu welcher es durch die Bindung der miRNAs normalerweise kommt. Es wurde daraufhin zunächst ein positiver Effekt auf die HCV-Replikation postuliert [32]. Dies scheint jedoch eher an dem Schutz der nicht-gecappten viralen RNA vor dem Abbau, hauptsächlich durch die Exoribonuklease 1 (XRN1) und einer zusätzlichen Stabilisierung des nicht-gecappten HCV-Genoms, als an einer direkten Stimulation der RNA-Synthese zu liegen [199–201,34]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Elongation der viralen Replikation nicht von der miR-122 abhängt [202]. Ein Einfluss des miRNPs auf die Replikation findet allerdings wahrscheinlich durch das Mitwirken beim Umschalten zwischen dieser und der Translation des HCV-Genoms statt [125]. Deutlich positiv wirkt sich die Bindung der miR-122 an die 5'-UTR auf die Translation des viralen Polyproteins aus. Dies konnte als Erstes durch die Sequestrierung der microRNA in Leberkarzinomzellen, sowie durch die Addition in miR-122-negativen-HeLa-Zellen und die damit verbundene replikationsunabhängige Translationsänderung gezeigt werden [33]. Die Bindung des Ago/miR-Komplexes an S1 und S2 führt dabei kooperativ zu einer Steigerung der Translation [35]. Der positive Effekt der miR-122 auf den HCV-Replikationszyklus sorgt auch insgesamt für eine deutlich gesteigerte

Produktion von infektiösen Viruspartikeln in Zellen [203]. Neueren Erkenntnissen zu Folge erfüllt der gebundene Komplex an der 5'UTR zudem eine Art Chaperon-Funktion, indem die korrekte Faltung und Struktur der IRES unterstützt wird [204,205].

Über die genauen Auswirkungen der miRNP-Bindung an die NS5B-codierende Region und die 3'-UTR ist nur wenig bekannt. Die Anlagerung der miR-122 zusammen mit Ago2 konnte für diese Stellen bereits einige Male demonstriert werden [190,206,194]. Über die Funktion der Bindung gibt es jedoch nahezu keine veröffentlichten Studien.

Eine miR-122 unabhängige Replikation des HCV ist nur auf sehr basalem Level möglich [207]. Knock-out von miR-122 in Zellen sorgt für eine drastische Reduktion der Menge an HCV-Genomen und eignet sich somit als Ansatz für die Entwicklung neuer Virostatika. Die Antisense-Xenonukleotidsäure (engl. *locked nucleic acid*, LNA) Miravirsen bindet die miR-122 und wurde bereits in einer Phase-II-Studie getestet [208]. Darauf basierend wurde RG-101 entwickelt, bei welchem der Inhibitor an einen Liganden des leberspezifischen Asialoglycoprotein Rezeptor gebunden ist. Zwar konnte hier in klinischen Studien zunächst ein deutlicher Rückgang der viralen Last detektiert werden, jedoch kam es bei einem Großteil der Patienten zu einem Absetzeffekt [209]. Auch zirkuläre RNAs, welche stabiler sind als lineare und auch natürlicherweise in Zellen vorkommen, können genutzt werden, um miRNAs zu binden und sequestrieren [210].

1.3.2 HCV und die Entstehung von Zirrhosen und Krebs

Die chronische Infektion mit HCV führt oftmals zu Leberfibrosen, Zirrhosen und der Manifestation von HCC. Häufig beginnt dieser Prozess mit einer Fibrosierung, welche grundsätzlich eine Wundheilung durch die Bildung von extrazellulärer Matrix darstellt. Eine Fibrose ist eine übermäßige Vermehrung des Bindegewebes und die daraus folgende Verhärtung des Gewebes. Viele Hepatozyten gehen bei dem Prozess zugrunde [211,212]. Eine der Hauptfaktoren bei der Entstehung von Leberfibrosen scheinen die hepatischen Ito- oder Stern-Zellen (engl. *hepatic stellate cells*, HSC) zu sein, welche bei Entzündungen aktiviert werden. Aktivierte ItoS zeichnen sich durch erhöhte Proliferation, Kontraktilität und Chemotaxis aus und sorgen für die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen [213]. Die Endstufe der Fibrose ist die Zirrhose, bei der die Leber stark vernarbt ist und es zu einem Rückstau des venösen Blutes in der Pfortader kommt. Zudem kann die Leber ihrer Entgiftungsfunktion nur noch partiell nachkommen. 30 Jahre nach Beginn einer chronischen HCV-Infektion besteht bei Patienten ein 41 %iges Risiko, eine Zirrhose zu entwickeln [8], und zudem ein jährliches Risiko von 1 – 4 %, an einem HCC zu erkranken [214]. Ist bereits eine Zirrhose ausgebildet, steigt dieses Risiko auf 5 – 7 % [215].

Viele andere Faktoren beeinflussen die Krebsentstehung, wie Vorerkrankungen, das Alter und die Dauer der Infektion [216].

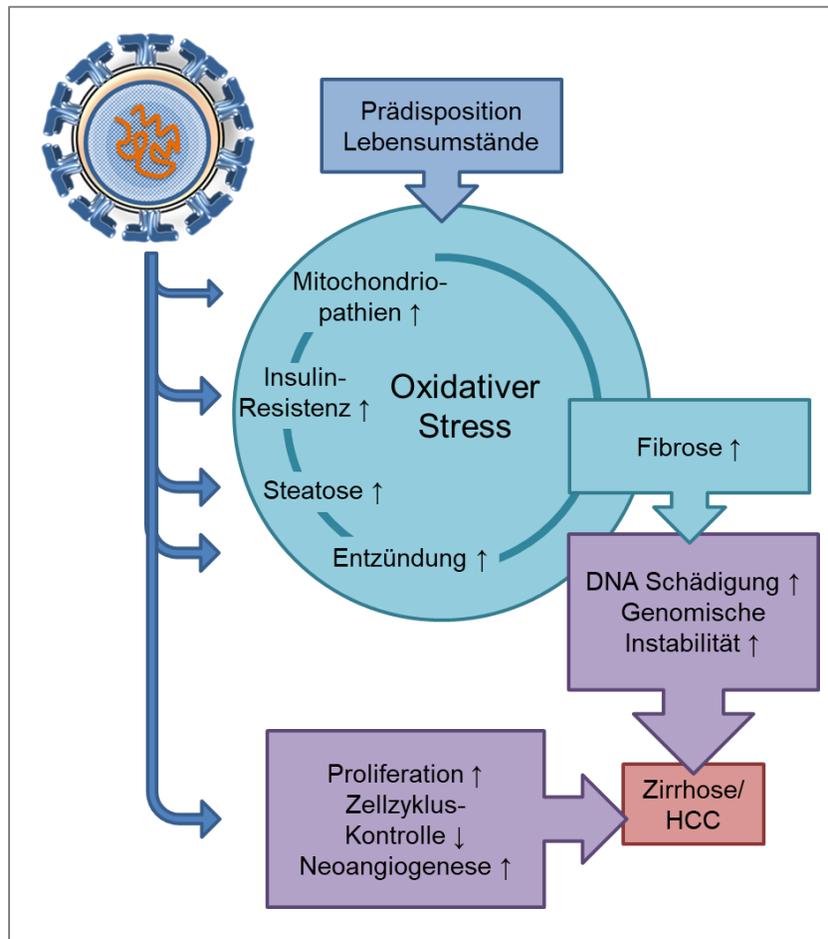


Abbildung 1-9: Modell der Entstehung vom HCV-induziertem Leberkrebs. Die Infektion mit HCV, Prädispositionen und Lebensgewohnheiten können zu der Bildung von malignen Transformationen führen. Durch Schädigungen der DNA sowie veränderte Signal- und Stoffwechselwege entstehen Fibrosen/Zirrhosen, welche die Wahrscheinlichkeit, an einem hepatozellulären Karzinom (HCC) zu erkranken, maßgeblich erhöhen. Verändert nach Bartosch [218].

Sequenzierungen der nächsten Generation (engl. *next generation sequencing*, NGS) und bioinformatische Studien ermöglichen die Untersuchung von großen Datenmengen und eröffnen somit neue Möglichkeiten bei der Erforschung von HCV-induziertem HCC. So konnten beispielsweise im Jahr 2014 durch die Analyse von über 500 HCC-Genomen nicht nur etliche maßgeblich den Krebs fördernde und veränderte Gene, sondern auch 11 beeinflusste Signalwege identifiziert werden [217].

Die Hepatokarzinogenese ist ein vielschichtiger Prozess, zu dem HCV sowohl direkt als auch indirekt über immun-vermittelte Entzündungen beiträgt. Zudem wird sie durch vorliegende genetische Prädispositionen und Lebensweisen begünstigt (siehe Abbildung 1-9) [218].

Ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Lebererkrankungen ist die übermäßige Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Rahmen von oxidativem Stress. ROS sind vor allem von den Mitochondrien gebildete Sauerstoffradikale und Peroxide, welche als Nebenprodukt der Zellatmung entstehen. Einige extramitochondriale Enzyme wie die NADPH-Oxidase und Cytochrom P450-Enzyme tragen ebenfalls zu ihrer Bildung bei. In physiologischer Konzentration dienen sie als wichtige Signalmoleküle und zur Abwehr von Pathogenen. Kommt es jedoch zu einem Ungleichgewicht und somit zur übermäßigen Bildung von ROS, schädigen diese die Zellen nicht nur auf der metabolischen, sondern auch auf genetischer Ebene [219,220]. Zudem können ROS das Wachstum und die Proliferations-Signalwege aktivieren und so zur Tumorgenese beitragen [221]. Erhöhte Werte an ROS konnten bereits in HCV-infizierten Patienten nachgewiesen werden [222].

Das virale Core-Protein sorgt durch seine Assoziation mit der mitochondrialen Membran für die Entstehung von Stress und führt zu Veränderungen des antioxidativen Enzymsystems [223,224]. Die Anwesenheit von NS5A korreliert wiederum mit der erhöhten Calcium-Abgabe aus dem ER, welches unter anderem von den Mitochondrien aufgenommen wird [225]. Calcium ist ein wichtiges Signalmolekül und interagiert mit vielen unterschiedlichen anderen Systemen und Signalwegen, wie der ROS-Bildung, welche wiederum Einfluss auf die Calcium-Speicherung und den Influx hat [226].

HCV kann durch den Eingriff in den Lipid-Metabolismus der Zellen Steatosen, also eine Verfettung der Leber, hervorrufen. Virale Proteine interagieren mit Lipoproteinen und sorgen damit nicht nur für eine Aktivierung der Lipogenese, sondern gleichzeitig auch für eine geringere Verstoffwechslung der Fette [227,144]. Die Akkumulation von freien Fettsäuren sorgt wiederum für oxidativen Stress und die Bildung von ROS sowie die Aktivierung anderer toxischer Signalwege [228].

Diabetes mellitus erhöht das Risiko an HCC zu erkranken zusätzlich, wobei eine HCV-Infektion wiederum die Wahrscheinlichkeit einer Insulinresistenz erhöht [229]. Core beispielsweise reguliert die Expression der Insulin Rezeptor Substrate 1 und 2 herunter, und NS5A steigert die Glukoneogenese [230,231]. Die allgemeine Folge von Hyperglykämie ist die Bildung von ROS, inflammatorische Cytokinfreisetzung und eine erhöhte Apoptoserate durch die Aktivierung der Proteinkinase C und NADPH-Oxydasen [232].

Entzündungen führen maßgeblich zu oxidativem Stress. Im Falle einer HCV-Infektion kommt es unter anderem indirekt, aufgrund von Reaktionen des Immunsystems, zu einer chronischen Entzündung der Leber. Die Inhibierung von Typ I IFN, der Einfluss auf die CD4-

Zell-Differenzierung sowie die vermehrte Bildung von Cytokinen sind nur einige Gründe hierfür [233,234]. Da HCV verschiedene Mechanismen verwendet, um vom Immunsystem nicht eliminiert zu werden, sammeln sich vermehrt Lymphocyten in der Leber und sorgen für eine Verstärkung der Entzündung [235].

Epigenetische Mechanismen der befallenen Zelle werden durch das HCV ebenfalls beeinflusst. Hierzu zählt unter anderem die bereits genannte veränderte Expression von ncRNAs und die damit einhergehende veränderte Genexpression (1.3.1). Es konnte gezeigt werden, dass beispielsweise die bekanntermaßen den Zellzyklus und Genexpression regulierenden lncRNAs LINC01419, AK021443, PVT1, HOTAIR, HULC, UCA1, MALAT1 und HEIH in HCV-induziertem HCC eine veränderte Expression aufweisen [236–242]. Aber auch Veränderungen im Methylierungsmuster der Zelle können zu der Krebsentstehung beitragen [180,243].

Einer der Hauptgründe für die von HCV-induzierte Hepatokarzinogenese, neben dem oxidativen Stress, ist vermutlich der direkte Einfluss des Virus auf anti- und prooncogene Signaltransduktionswege. Ein Beispiel ist das Retinoblastoma Protein (Rb), welches die Zellproliferation kontrolliert, indem es die E2F-Transkriptionsaktivität senkt. NS5B kann direkt an Rb binden, was zu einem Abbau des Proteins führt und so zur Aktivierung des Zellzyklus [244]. Core und NS2 aktivieren zudem Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen, wodurch der Zellzyklus weiter stimuliert wird [245,246].

Einige der viralen Proteine interagieren auch mit dem MAP (engl. *mitogen-activated protein*)-Kinase-Weg, was zusätzlich Erkrankungen fördern kann [247–249]. Die MAPK-Wege sind mehrstufige Signalwege, die mittels Cytokinen, Wachstumsfaktoren und Stress aktiviert werden und so zu Proliferation, Differenzierung, Entwicklung, Apoptose, Entzündungen und Stressantwort erheblich beitragen. Eine Fehlregulation steht im direkten Zusammenhang mit der Krebsentwicklung [250]. Viele der an der MAPK-Kaskade beteiligten Proteine sind in HCC-Patienten überexprimiert, einige sogar in bis zu 100 % der analysierten Proben [251].

Die natürliche Apoptose der Zelle wird ebenfalls durch das HCV auf verschiedene Weise gestört und blockiert. Mehrere der viralen Proteine interagieren mit p53, welches Zellzyklus-Pausen und den natürlichen Zelltod kontrolliert und einen wichtigen Tumormarker darstellt [252]. Ergänzend blockiert HCV die antiproliferatorische und proapoptotische Wirkung von Tumornekrosefaktoren (TNF)- α und TNF- β [253–256]. TNFs haben je nach Situation und Stimulus verschiedene Aufgaben in der Zelle. Neben der Apoptose und Proliferation können sie auch zur Nekrose, Angiogenese, Immunzellaktivierung und Zellmigration führen und spielen somit bei gestörter Homöostase eine große Rolle bei der Krebsentstehung.

Heute kennen wir zwar einige der HCV-induzierten Faktoren, die zur Zirrhose und HCC-Entstehung beitragen können, wie genau die einzelnen Mechanismen jedoch ineinandergreifen und welche bis jetzt unentdeckt sind, können nur weitere Studien zeigen.

1.4 Zielsetzung

Die chronische Infektion mit dem Hepatitis C Virus ist weltweit eine der Hauptursachen für die Entstehung von Leberzirrhosen. Oftmals resultiert daraus Krebs, selbst wenn das Virus bereits mit Hilfe von Medikamenten aus den Patienten eliminiert wurde. Dies ist einer der Gründe, warum es so wichtig ist, die HCV-Wirts-Interaktion auch weiterhin intensiv zu erforschen.

In den letzten Jahren wurden viele essentielle Wirtszellfaktoren charakterisiert, wie die leberspezifische miR-122. An mindestens fünf Stellen des HCV-Genoms kann sich diese miRNA, in Verbindung mit dem Ago2-Komplex, spezifisch anlagern. Besonders gut charakterisiert sind die zwei Bindungsstellen in der 5'UTR der viralen RNA. Die Anlagerung des miR/Ago-Komplexes an diese Bereiche des viralen Genoms ist essentiell für die Translation, Replikation und Stabilisierung der HCV-RNA. Die Funktion der anderen hoch konservierten Bindungsstellen ist jedoch bis jetzt kaum untersucht worden. Neben der miR-122 konnten bereits viele weitere zelluläre Faktoren bestimmt werden, welche einen positiven oder einen negativen Einfluss auf die Replikation des Virus ausüben. Mithilfe von Microarrays und NGS-Analysen wurden vermehrt Veränderungen in dem zellulären Transkriptom als Antwort auf verschiedene Reize detektiert. Zudem machte es die Massenspektrometrie möglich, das Proteom näher zu erforschen. Die meisten Studien haben sich jedoch nicht mit der Analyse des Translatoms in Kombination mit dem Transkriptom beschäftigt, was eine umfassendere Untersuchung der Genexpression zulässt.

Um neue Erkenntnisse über die HCV-Wirts-Interaktion zu erlangen, war es ein Ziel dieser Arbeit, die drei stark konservierten miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-codierenden Region sowie der 3'UTR näher zu untersuchen. Des Weiteren sollte der Einfluss der HCV-Infektion auf das zelluläre Transkriptom und Translatom mit Hilfe des Ribosome Profiling analysiert werden, um Veränderungen der zellulären Genexpression und mögliche neue Interaktionspartner zu detektieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-1: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten (100 kDa)	Merck
Chromatographie Papier 3MM (Whatman)	VWR
Costar UV Plate (96 Well)	Sigma-Aldrich
Cryo-Röhrchen	Sarstedt
Elektroporationsküvetten (4 mm)	Bio-Rad
Petrischalen	Sarstedt
Phase Lock Gel™ Heavy	VWR
Pipettenspitzen (10 µl – 1250 µl)	Sarstedt
PVDF Membran, Immobilon-P (0,45 µm)	Millipore
Reaktionsgefäße (200 µl – 50 ml)	Sarstedt
Röntgenfilme, CL-XPosure™ (18 cm x 24 cm)	Thermo Scientific
Serologische Pipetten (5 ml – 50 ml)	Sarstedt
Zellkulturflaschen (25 cm ² – 175 cm ²)	Sarstedt
Zellkulturplatten (6 Well, 12 Well)	Sarstedt
Zellkulturschalen (9 cm – 15 cm)	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Ultrazentrifugationsröhrchen (14 mm x 89 mm)	Beckman Coulter

2.1.2 Geräte

Tabelle 2-2: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Avanti JXN-26 Centrifuge, Rotoren JA-25.50, JA-10	Beckman Coulter
Bakterien-Inkubator Certomat® H	Braun
Bi-Destille, Destamat	Heraeus
Bioanalyser 2100	Agilent
Blotapparatur, Fastblot B43/44	Biometra
CO ₂ -Inkubator Serie CB	Binder GmbH
Digitales pH-Meter 644	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG
Elektrophorese Netzgerät, EPS 500/400	Pharmarcia Fine Chemicals
Elektroporator, GenePulser Xcell™	Biorad
Filmkassetten, Cronex Lightning Plus	Du Pont
Fluorometer Qubit™	Invitrogen
Geldokumentationssystem, GelDoc XR	Biorad
Gel-Elektrophoresekammern	von Keutz
Heizblock, Akku Block™	Labnet
Heizblock, MBT 250	Kleinfeld Labortechnik
Heiz-Magnetrührer US 152	Stuart
Kippschüttler DuoMax1030	Heidolph Instruments
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf
MagnaRack™	Invitrogen
Mastercycler ep realplex ²	Eppendorf
Microplate Reader Epoch	BioTek
Mikroskop, Leica DM IL invers	Leica Microsystems
Pipetboy	Integra
Pipetten (2 µl – 1000 µl)	Gilson
Platteninkubator B15	Thermo Scientific
Sterilbank, Lamin Air HA 2448 BS	Heraeus
Tecan infinite M200 multimode reader	Tecan
Thermocycler, T1	Biometra
Thermocycler, TProfessional	Biometra

Tischzentrifuge, Centrifuge 5415C und 5417R	Eppendorf
Ultrazentrifuge LE-80	Beckman Coulter
Vortex Genie 2™	Bender & Hoben
Waage	Sartorius
Wasserbad Julabo	Julabo
Zählkammer, Neubauer-improved (0,1 mm Tiefe)	Superior Marienfeld

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Die für diese Arbeit standardmäßig verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den folgenden Firmen bezogen:

Merck
 Sigma-Aldrich
 Carl Roth GmbH Co. KG
 Life Technologies GmbH.

2.1.3.1 Spezielle Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2-3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Quelle
Cycloheximide solution - ready made (100 mg/ml)	Sigma-Aldrich
GlycoBlue™™	Invitrogen
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich
Rotiphorese Bisacrylamidlösung 40 (29:1, 19:1)	Carl Roth
SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain	Invitrogen
TRIzol™ LS Reagent	Ambion

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 2-4: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer und Lösung	Endkonzentration	Ansatzschema
Blocklösung	5 % Milchpulver (EDEKA) in PBS-T gelöst	
DNA-Extraktionspuffer	300 mM NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 8) 1 mM EDTA	Für 50 ml: 3 ml 5 M 0,5 ml 1 M 100 µl 0,5 M Auffüllen mit ddH ₂ O
DNA-Probenpuffer	75 % Glycerin 50 mM EDTA (pH 8,0) einige Körner Bromphenolblau und Xylencyanol	Für 20 ml: 15 ml 2 ml 0,5 M Auffüllen mit ddH ₂ O
DTT	1 M	Für 10 ml: 1,5 g Auffüllen mit ddH ₂ O, Lagerung bei -20°C
EDTA	0,5 M	Für 100 ml: 14,61 g Auffüllen mit ddH ₂ O
Elektroporationspuffer (Zytopmix)	120 mM KCl 0,15 mM CaCl ₂ 10 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ (pH 7,6) 25 mM HEPES (pH 7,6) 2 mM EDTA (pH 7,6) 5 mM MgCl ₂	Für 100 ml: 4,8 ml 2,5 M 15 µl 1 M 5 ml 0,2 M 2,5 ml 1 M 2 ml 0,1 M 5 ml 0,1 M Mit KOH auf pH 7,6 einstellen, Sterilfiltration, Auffüllen mit ddH ₂ O,

		kurz vor Gebrauch Zugabe von: 2 mM ATP (pH 7,6) und 5 mM Gluthathion (pH 7,6)
MgCl ₂	0,5 M	Für 100 ml: 10,16 g Auffüllen mit ddH ₂ O
NaCl	5 M	Für 500 ml: 146,1 g Auffüllen mit ddH ₂ O
NaOH	1 M	Für 1 l: 40 g Auffüllen mit ddH ₂ O
Natriumacetat	3 M	Für 50 ml: 20,41 g Auffüllen mit ddH ₂ O
Paraformaldehyd (PFA) 4 %	4 % PFA lösen in ddH ₂ O 5 mM NaOH 1 x PBS	Für 100 ml: 4 g 80 ml 100 µl (5 M) auf 65°C erhitzen und wieder abkühlen 10 ml (10 x) mit 37 % Salzsäure auf pH 7,4 einstellen, Auffüllen mit ddH ₂ O, Lagerung bei -20°C
PBS-Glycin	1 x PBS 10 mM Glycin	Für 500 ml: 500 ml 0,375 g
PBS-T	1 x PBS 0,5 % Tween® 20	Für 100 ml: 99,5 ml 0,5 ml

Polysomen Lysepuffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 250 mM NaCl 1,5 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 0,5 % Triton X-100 100 µg/ml Cycloheximid 20 U/ml TURBO DNase	Für 50 ml: 1 ml 1 M 2,5 ml 5 M 150 µl 0,5 M 50 µl 1 M 1,25 ml 20 % Auffüllen mit ddH ₂ O, Lagerung bei -20°C, vor Gebrauch: 1 µl/ml 10 µl/ml
PPPC 2x	100 mM Tris HCl pH 6,8 24 % Glycerin 8 % SDS 0,02 % Coomassie-Blau G-250 2 % β-Mercaptothanol	Für 50 ml: 5 ml (1 M) 12 ml (100 %) 4 g 0,01 g 1 ml (100 %) Auffüllen mit ddH ₂ O
RNA-Extraktionspuffer	0,3 M NaOAc (pH 5,3) 1 mM EDTA 0,1% SDS	Für 50 ml: 5 ml 3 M 100 µl 0,5 M 500 µl 10 % Auffüllen mit ddH ₂ O
RNA-Probenpuffer	80 % Formamid 10 % Glycerol 50 mM EDTA (pH 7,5) einige Körner Bromphenolblau und Xylencyanol	Für 20 ml: 16 ml 2 ml 2 ml 0,5 M Auffüllen mit ddH ₂ O
SDS-Laufpuffer	0,1 % SDS 25 mM Tris-Base 192 mM Glycin	Für 1 l (10 x): 10 g 30 g 144 g Auffüllen mit ddH ₂ O, vor Gebrauch auf 1 x verdünnen

Sucrose	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 250 mM NaCl 15 mM MgCl ₂ 10 % oder 60 % Sucrose 1 mM DTT 100 µg/ml Cycloheximid	Für 200 ml: 4 ml 1 M 10 ml 5 M 6 ml 0,5 M 20 oder 120 g Auffüllen mit ddH ₂ O, vor Gebrauch: 1 µl/ml 1 µl/ml
Transferpuffer	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin 0,037 % SDS 20 % Methanol	Für 1 l: 5,8 g 2,9 g 3,7 ml (10 %) 200 ml (100 %) Auffüllen mit ddH ₂ O
Transformations- Puffer 1	30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 100 mM RbCl ₂ 15 % Glycerol	Für 400 ml: 1,18 g 0,59 g 3,96 g 4,84 g 60 ml pH 5,8 mit Essigsäure einstellen Auffüllen mit ddH ₂ O Sterilfiltrieren
Transformations- Puffer 2	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl ₂ 15 % Glycerol	Für 100 ml: 0,21 g 1,1 g 0,12 g 15 ml pH 6,5 mit KOH einstellen Auffüllen mit ddH ₂ O Sterilfiltration
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	40 mM Tris-Base 1 mM EDTA; pH 8,0	Für 1 l (50 x) 242 g 100 ml 0,5 M

	20 mM Essigsäure	57,1 ml konz. Auffüllen mit ddH ₂ O, vor Gebrauch auf 1 x verdünnen
Tris HCl	1 M	Für 1 l: 121,1 g pH-Wert einstellen mit HCl Auffüllen mit ddH ₂ O
Tris/EDTA (TE)- Puffer	10 mM Tris/HCl; pH 8,0 1 mM EDTA; pH 8,0	Für 50 ml: 0,5 ml 1 M 0,1 ml 0,5 M Auffüllen mit ddH ₂ O
Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer	89 mM Tris-Base 89 mM Borsäure 2 mM EDTA	Für 1 l (10 x): 108 g 55 g 40 ml 0,5 M Auffüllen mit ddH ₂ O, vor Gebrauch auf 1 x verdünnen
Trizin-Gelpuffer	3 M Tris-Base 0,3 % SDS	Für 500 ml: 181,5 g 15 ml (10 %) mit HCl auf pH 8,45 einstellen Auffüllen mit ddH ₂ O
Western Blot Lysepuffer	10 mM Tris HCL, pH 8,0 140 mM NaCl 0,025 % NaN ₃ 1 % Triton X-100	Für 100 ml (10 x): 10 ml (1 M) 8,2 g 0,25 g 10 ml (100 %) Auffüllen mit ddH ₂ O, vor Gebrauch auf 1 x verdünnen

2.1.5 Antikörper und Magnetische Beads

Tabelle 2-5: Verwendete Antikörper und Magnetische Beads

Antikörper	Verdünnung	Quelle
Anti-Hepatitis C Virus NS3 antibody [8 G-2]	1:500	Abcam
Goat-anti-mouse IgG1, Alexa Fluor® 488 conjugate	1:200	Thermo Scientific
Hepatitis C Virus Core Antigen Monoclonal Antibody (C7-50)	1:1000	Thermo Scientific
Anti-GAPDH-71.1 Monoclonal Antibody	1:150000	Sigma-Aldrich
Goat-anti-mouse IgG HOR	1:50000	Life Technologies
Streptavidin C1 DynaBeads		Invitrogen

2.1.6 Enzyme

Tabelle 2-6: Verwendete Enzyme

Enzym	Quelle
Antarctic Phosphatase	NEB
Circ Ligase	Biozym
DNase I (RNase-frei)	NEB
OneTaq DNA-Polymerase	NEB
Proteinase K	NEB
Q5-Polymerase	NEB
Restriktionsendonukleasen, diverse	NEB
RNase I, 100 U/μL	Invitrogen
Super Script III reverse Transkriptase	Invitrogen
SUPERase Inhibitor	Invitrogen
T4 DNA Ligase	NEB
T4 Polynukleotid Kinase	NEB
T4 RNA Ligase 2	NEB
T7 RNA-Polymerase	Thermo Scientific
Turbo DNase	Invitrogen

2.1.7 Kit-Systeme

Tabelle 2-7: Verwendete Kit-Systeme

Kit	Quelle
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Scientific
GeneJet Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Scientific
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
GeneJet RNA Cleanup and Concentration Micro Kit	Thermo Scientific
PerfeCTa SYBR Green FastMix	Quanta Biosciences
qScript Flex cDNA Kit	Quanta Biosciences
Qubit™ Assay Kits	Thermo Scientific
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
SuperSignal™ West Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific

2.1.8 Plasmide

Tabelle 2-8: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pFK-JFH1-J6 C 846_dg (Jc1)_12961	T7-Promotor, HCV-Jc1 codierende Sequenz, HDV Ribozym, T7-Terminator, Ampicillinresistenz	Thomas Pietschman, AG Bartenschlager, Heidelberg, DE
pUC18_J6-JFH1_NS5B- 3'-UTR_5B.2m	pUC18 Plasmid Sequenz, NS5B-Sequenz_5B.2m, 3'-UTR	Nadia Dünnes AG Niepmann Gießen, DE
pUC18_J6-JFH1_NS5B- 3'-UTR_5B.3m	pUC18 Plasmid Sequenz, NS5B-Sequenz_5B.3m, 3'-UTR	Nadia Dünnes AG Niepmann Gießen, DE
pFK-Jc1-S1m	Basiert auf pFK-JFH1-J6 C 846_dg (Jc1)_12961 mit Mutation in der miR-122 Bindungsstelle S1	Gesche Gerresheim, AG Niepmann Gießen, DE

pFK-Jc1-S2m	Basiert auf pFK-JFH1-J6 C 846_dg (Jc1)_12961 mit Mutation in der miR-122 Bindungsstelle S2	Gesche Gerresheim, AG Niepmann Gießen, DE
pFK-Jc1-5B.2m	Basiert auf pFK-JFH1-J6 C 846_dg (Jc1)_12961 mit Mutation in der miR-122 Bindungsstelle 5B.2	Gesche Gerresheim, AG Niepmann Gießen, DE
pFK-Jc1-5B.3m	Basiert auf pFK-JFH1-J6 C 846_dg (Jc1)_12961 mit Mutation in der miR-122 Bindungsstelle 5B.3	Gesche Gerresheim, AG Niepmann Gießen, DE
pFK-Jc1-S3m	Basiert auf pFK-JFH1-J6 C 846_dg (Jc1)_12961 mit Mutation in der miR-122 Bindungsstelle S3	Gesche Gerresheim, AG Niepmann Gießen, DE
pFK-Jc1-5B.2/3m	Basiert auf pFK-JFH1-J6 C 846_dg (Jc1)_12961 mit Mutation in der miR-122 Bindungsstelle 5B.2 und 5B.3	Gesche Gerresheim, AG Niepmann Gießen, DE
pFK-Jc1-5B.2/3/S3m	Basiert auf pFK-JFH1-J6 C 846_dg (Jc1)_12961 mit Mutation in der miR-122 Bindungsstelle 5B.2, 5B.3 und S3	Gesche Gerresheim, AG Niepmann Gießen, DE
pFK-Jc1-GND	Basiert auf pFK-JFH1-J6 C 846_dg (Jc1)_12961 mit Mutation in dem aktieven Zentrum der Polymerase	Gesche Gerresheim, AG Niepmann Gießen, DE

2.1.9 Nukleotide und Oligonukleotide

2.1.9.1 Nukleotide

Tabelle 2-9: Verwendete Nukleotide

Nukleotide	Quelle
Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Carl Roth
Ribonukleosid-Triphosphate (rNTPs)	Carl Roth

2.1.9.2 RNA-Oligonukleotide

Tabelle 2-10: Verwendete RNA-Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Quelle
miR-122 mat	pUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	Biomers
miR-122*	pAACGCCAUUAUCACACUAAAUA	Biomers
NI-NI-20	AUGUACACGGAGUCGACCCAACGCGAp	Biomers
NI-NI-19	AUGUACACGGAGUCGAGCUCAACCCGC AACGCGAp	Biomers

2.1.9.3 DNA-Oligonukleotide

Tabelle 2-11: Verwendete DNA-Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Quelle
miRNA Cloning Linker	rAppCTGTAGGCACCATCAAT – NH ₂	NEB
Reverse Transkription RP	pAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAA GAGTGTAGATCTCGGTGGTCGC-(SpC18)-CACTCA- (SpC18)-TTCAGACGTGTGCTC TTCCGATCTATTGATGGTGCCTACAG	Biomers
Universal PCR Primer RP	AATGAACGGCGACCACCGAGATCTACACT CTTCCCTACACGACGCTCTTCCG ATC*T	NEB
Index Primer 2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>ACATCGGTGACTGGAGTTCAGACGT</u> GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Index Primer 4	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TGGTCAGTGACTGGAGTTCAGACGT</u> GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB

Index Primer 5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>CACTGTGTGACTGGAGTTCAGACGT</u> GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Index Primer 6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>ATTGGCGTGACTGGAGTTCAGACGT</u> GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Index Primer 7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>GATCTGGTGACTGGAGTTCAGACGT</u> GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Index Primer 12	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TACAAGGTGACTGGAGTTCAGACGT</u> GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Index Primer 13	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TGTTGACTGGTGACTGGAGTTCAGACGT</u> GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Index Primer 14	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>ACGGAACGTGACTGGAGTTCAGACGT</u> GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Index Primer 15	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TCTGACATGTGACTGGAGTTCAGACGT</u> GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Index Primer 16	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>GGACGGGTGACTGGAGTTCAGACGT</u> GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Index Primer 18	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>GTGCGGACGTGACTGGAGTTCAGACGT</u> GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Index Primer 19	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>CGTTTCACGTGACTGGAGTTCAGACGT</u> GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Index Primer 20	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>AAGGCCACGTGACTGGAGTTCAGACGT</u> GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Index Primer 21	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TCCGAAACGTGACTGGAGTTCAGACGT</u> GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB

Index Primer 22	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TAC <u>GTACGGT</u> GACTGGAGTTCAGACGT GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Index Primer 23	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AT <u>CCACTC</u> GTGACTGGAGTTCAGACGT GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Index Primer 25	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATAT <u>CAGT</u> GTGACTGGAGTTCAGACGT GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Index Primer 27	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AA <u>AGGAAT</u> GTGACTGGAGTTCAGACGT GTGCTCTTCCGATC-s-T	NEB
Seltene- Codons-mut-for	CATTACTCTTCGGCCTGCTCCTGCTTTT CGTGGGGGTGGGCCTCTTCCACTCCCCG	Biomers
Seltene- Codons-mut- rev	CGGGGAGTAGGAAGAGGCCACCCCCAC GAAAAGCAGGAGCAGGCCGAAGAGTAATG	Biomers
Seltene- Codons-for	CCGCAGATACTACCTGACCAGAGACCCAAC	Biomers
Seltene- Codons-rev	GGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAG	Biomers
S1-mut-for	AATAGGGGCGAGACTACGCCATGAATCAC TCCCCTG	Biomers
S1-mut-rev	GATTCATGGCGTAGTCTCGCCCCTATTAG GGGCAG	Biomers
S2-mut-for	GCCATGAATCTATCCCCTGTGAGGAACTA CTGTC	Biomers
S2-mut-rev	CCTCACAGGGGATAGATTCATGGCGGAGT GTCGC	Biomers
S1S2-for	CTGAGATACTACAGCGTGAGCTATGAGA AAGCGC	Biomers
S1S2-rev	GACAACGACTTTCGCCACGCTCCCTGC ATAGAG	Biomers
S3-mut-for	GCACACACTAGGTACTCTGCATAGCTAAC TGTTCC	Biomers

S3-mut-rev	CAGTTAGCTATGCAGAGTACCTAGTGTGT GCCGCTC	Biomers
S3-for	CTCCAACCATATGGGTTTCGCATGGTCCTA ATGACAC	Biomers
S3-rev	CACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACG TCTAAG	Biomers
GAPDH-for (RT und qPCR)	GAGTCAACGGATTTGGT CGT	Biomers
GAPDH-rev (qPCR)	GATCTCGCTCCTGGAAG ATG	Biomers
NS3-for (RT und qPCR)	GTATGCCACGGCATTCAAG	Biomers
NS3-rev (qPCR)	GATATAGGTCGACGGCTCCA	Biomers

2.1.10 Größen und Längenstandards

Tabelle 2-12: Verwendete Größen und Längenstandards

Standard	Quelle
Hyper Ladder 1 kb	Bioline
Hyper Ladder 25 bp	Bioline
PAGE Ruler (prestained)	Thermo Scientific

2.1.11 Bakterien

Tabelle 2-13: Verwendete Bakterien

Bakterium	Beschreibung	Quelle
<i>Escherichia coli</i> TOP10F'	F- <i>mcrA</i> (<i>mrr- hsdRMS- mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacX74 recA1 araΔ139 Δ(<i>ara-leu</i>) 7697<i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen

2.1.12 Zelllinien

Tabelle 2-14: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
Huh-7	Humane Hepatokarzinoma-Zelllinie: Adhärent wachsende Zelllinie, die ursprünglich von einer humanen Biopsie stammt. Unter anderem tragen sie eine Mutation im p53 Gen.	Sato Laboratorien, Okayama University, Japan
Huh-7.5	Humane Hepatokarzinoma-Zelllinie: Derivat von Huh-7-Zellen, aus welchen mit Hilfe von Interferon ein HCV-Replikon eliminiert wurde. Huh-7.5-Zellen lassen sich unter anderem aufgrund einer Mutation im RIG-I Gen besonders gut mit HCV infizieren.	Rice Laboratorien, Rockefeller Universität, NY, USA

2.1.13 Kulturmedien

Tabelle 2-15: Verwendete Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung	Quelle
Lennox Broth (LB)- Medium	Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 5 g/l Sterilisation durch Autoklavieren	Carl Roth
LB-Platten	400 ml LB-Medium 2 % Bacto Agar Sterilisation durch Autoklavieren	Carl Roth
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high Glucose	Mit hohem Glukosegehalt (4,5 g/l), L-Glutamine, Phenol Rot	Life Technologies
10 % DMEM	DMEM 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) 1 % Penicillin/Streptomycin	
Kryomedium	DMEM 20 % FBS 10 % DMSO	

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Die Herstellung von chemisch-kompetenten Bakterien dient der Permeabilisierung der Zellwand, was für eine effektive Aufnahme der DNA im Rahmen einer Transformation nötig ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Calciumchlorid-Methode angewendet.

Zunächst wurden die *E. coli* Top 10F' Bakterien in 5 ml LB-Medium überführt und in bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2,5 ml der Kultur in 250 ml LB-Medium mit 20 mM MgSO₄ gegeben und bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von ca. 0,6 weiter inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugieren bei 4°C und 4.500 rpm 3 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 100 ml eiskaltem Transformations-Puffer 1 resuspendiert. Es folgte eine 20 min Inkubation auf Eis sowie eine erneute Zentrifugation bei 4.500 rpm, 4°C für 5 min. Das Pellet konnte anschließend in 10 ml Transformations-Puffer 2 gelöst und für 30 min auf Eis inkubiert werden. Die Zellen wurden aliquotiert und bei -40°C gelagert.

2.2.2 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung der kompetenten *E. coli* TOP10F' erfolgte entweder auf LB-Agarplatten oder in flüssigem LB-Medium. Vor Gebrauch wurde das LB-Medium mit 3 µl/ml Ampicillin-Stammlösung versetzt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank oder auf dem Schüttelinkubator bei 30°C.

2.2.3 Transformation

Eine Transformation dient der Vervielfältigung von Plasmid-DNA durch das gezielte Einbringen von Nukleinsäure in kompetente Bakterien. Für diese Arbeit ist zum einen eine schnelle Methode der Transformation zur Anwendung gekommen als auch die Standardmethode.

2.2.3.1 Schnelle Transformation

Da die schnelle Transformation eine relativ niedrige Effizienz aufweist, wird sie nur bei Transformationen mit bereits etablierten Plasmiden verwendet und nicht für Ligations-Reaktionen.

Zunächst wurden die kompetenten *E. coli* TOP10F' auf Eis aufgetaut und 50 µl der Bakterienlösung versetzt mit 1 µg Plasmid-DNA für 15 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze konnten anschließend auf je einer halben, im Brutschrank aufgewärmten

Selektiv-Agarplatte (Amp) ausplattiert und üN bei 30°C inkubiert werden. Durch den Einsatz der Antibiotika konnten ausschließlich die Bakterien mit aufgenommenen Plasmiden, welche ein Resistenzgen beinhalten, wachsen.

2.2.3.2 Standard Transformation

Die Standard Transformation weist eine höhere Effizienz als die schnelle Transformation auf und wird deshalb für das Einbringen von neu ligierter Plasmid-DNA in Bakterien verwendet.

Das Auftauen der kompetenten *E. coli* TOP10F⁻ erfolgte auf Eis. Danach wurden 100 µl der Bakterienlösung mit 10 µl des Ligationsansatzes gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis konnten die Bakterien 30 s bei 42°C hitzegeschockt werden. Anschließend erfolgte eine 1 min Abkühlung auf Eis. 1 ml Medium wurde zugegeben und die TOP10F⁻ 1 h bei 30°C auf dem Heizblock geschüttelt. Die Bakterien wurden bei 3.500 rpm ab zentrifugiert, 900 µl Überstand abgenommen, der Rest resuspendiert und 100 µl der Lösung auf eine LB-Selektions-Agarplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C üN.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Innerhalb dieser Arbeit wurden die Zelllinien Huh-7 und Huh-7.5 verwendet. Huh-7 ist eine adhärent wachsende humane Hepatokarzinoma-Zelllinie, welche ursprünglich aus einer Leberbiopsie stammt. Bei Huh-7.5-Zellen handelt es sich um eine Linie, die durch die Infektion von Huh-7-Zellen mit einem HCV-Replikon und anschließender Heilung der Zellen durch eine Interferon-Behandlung entstanden ist.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C, hoher Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Als Medium kam DMEM mit 2 – 10 % FBS (abhängig vom Experiment) zum Einsatz. In regelmäßigem Abstand wurden die Zellen passagiert, wofür zunächst das alte Medium abgenommen und anschließend mit 1 x PBS kurz gewaschen wurde. Das Ablösen und Separieren der Zellen erfolgte mit 0,5 % Trypsin/EDTA-Lösung. Anschließend wurden die Zellen in Verhältnissen von 1:2 bis 1:20 in Zellkulturflaschen ausgesät, mit Medium aufgefüllt und weiter im Brutschrank gelagert. Für experimentelle Zwecke erfolgte die Zählung der Zellen (siehe 2.3.4), woraufhin diese in definierten Mengen in Zellkulturflaschen, Schalen oder Wellplatten eingesetzt werden konnten.

2.3.2 Auftauen von Zellen

Für die Kultivierung (2.3.1) war es erforderlich, die im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen aufzutauen. Dafür wurde zunächst ein Wasserbad (37°C) verwendet und die Zellen danach in 10 ml vorgewärmtes DMEM mit 10 % FBS überführt. Die Inkubation erfolgte zunächst entweder direkt in einer 25 cm² Zellkulturflasche im Brutschrank oder nach zentrifugieren (400 g für 10 min) und waschen der Zellen mit Medium. Nach ca. 6 h erfolgte ein Wechsel des Mediums. Sobald die Zellen über 90 % Konfluenz aufwiesen, wurden sie in eine größere Zellkulturflasche passagiert. Nach zweiwöchiger Inkubation waren die Zellen bereit für die experimentelle Nutzung.

2.3.3 Einfrieren von Zellen

Um die Huh-Zelllinien zu erhalten, mussten möglichst junge Passagen der in Kultur gehaltenen Zellen erneut eingefroren werden. Hierfür wurde eine mit PBS gewaschen und trypsinierte Zell-Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt, ein Teil zum Zählen (2.3.4) abgenommen und bei 400 g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit Kryomedium auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml wurde in Kryoröhrchen überführt, diese in einen auf 4°C vorgekühlten Isopropanoltank gegeben und bei -40°C üN eingefroren, so dass die Proben 1°C/min abkühlen konnten. Am darauf folgenden Tag konnten die Zellen in den Stickstofftank bei -196°C umgelagert werden. Es war darauf zu achten, dass die Lagerung nur in der Gasphase und nicht in der Flüssigphase erfolgte, damit kein Stickstoff in die Röhrchen läuft und sie beim Auftauen zum Explodieren bringt. Außerdem vermeidet die Lagerung in der Gasphase die Kontamination mit eventuell in der Flüssigphase schwimmenden Bakterien.

2.3.4 Zellzahlbestimmung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer

Um Zellen in einer definierten Menge einsetzen zu können, erfolgte die Zählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Kammer besteht aus vier Großquadraten mit einem Volumen von je 0,1 µl. Ein Großquadrat ist wiederum in 16 Kleinquadrate eingeteilt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau verdünnt. Nach Befestigung des Deckglases auf der Zählkammer wurde diese mit 10 µl Probe gefüllt und die lebenden Zellen in den vier Großquadraten gezählt. Die Zellzahl ließ sich mit der folgenden Formel berechnen:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Mittelwert der Zellzahl in den Großquadraten} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.3.5 Transfektion

Die Transfektion dient dem Einbringen von RNA bzw. DNA in eukaryotische Zellen. Grundsätzlich kann man zwischen transienter und stabiler Transfektion unterscheiden, wobei im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit der transienten Transfektion gearbeitet wurde.

2.3.5.1 *Transfektion mittels Lipofectamine 2000*

Die Transfektion mittels Lipofectamine ist eine chemisch basierte Methode, bei der Nukleinsäuren über Liposomen in Zellen eingebracht werden können. Dabei bilden die positiv geladenen Liposomen Komplexe mit der negativ geladenen Nukleinsäure und können anschließend mit der ebenfalls negativ geladenen Plasmamembran verschmelzen.

Am Tag vor der Transfektion wurden pro 6 Well $2,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät, wobei die Menge bei anderen Zellkulturschalen entsprechend angepasst werden konnte. Für die Lipofektion wurden zwei separate Ansätze pro zu transfizierender Probe angesetzt. Ein Ansatz enthielt die RNA (0,3 pmol/6 Well) in DMEM (0 % FBS) und der andere Lipofectamine 2000 (3 μ l Lipofectamine/1 μ g RNA). Nach einer 5 min Inkubation bei RT wurden die Ansätze vereinigt, gründlich gevortext und weitere 15 min bei RT inkubiert. Anschließend konnten die Proben auf die jeweiligen Zellen gegeben werden.

2.3.5.2 *Transfektion mittels Elektroporation*

Bei einer Elektroporation wird die Zellmembran der Zielzellen durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert, wobei Nukleinsäuren durch Elektrotransfer in die Zellen eindringen können. Dies ermöglicht die Transfektion zu einem genau definierten Zeitpunkt.

Zunächst wurden die Huh-Zellen trypsinisiert, wieder in Medium aufgenommen und 5 min bei 800 g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes konnte das Zellpellet in PBS resuspendiert und die Zellen mit Hilfe einer Zählkammer gezählt werden (2.3.4). Pro Elektroporation wurden 4×10^6 Zellen benötigt. Die entsprechende Menge an Zellsuspension musste wie zuvor zentrifugiert und die Zellen auf 1×10^7 Zellen/ml Zytomix mit Glutathion und ATP eingestellt werden. 400 μ l der Suspension wurden mit der zu transfizierenden Nukleinsäure (2,5 pmol) gemischt, in eine 4 mm Elektroporationsküvette überführt und bei 270 V für 20 ms mit einem *Square Wave* Pulse elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen in 12 ml 10 % DMEM überführt und resuspendiert. Pro 6 Well wurden $3,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät, wobei die Menge bei anderen Zellkulturschalen entsprechend angepasst werden konnte. Nach 6 – 8 h Inkubation bei 37°C erfolgte ein Wechsel des Mediums, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

2.4 Virologische Methoden

2.4.1 Produktion und Gewinnung extrazellulärer viraler Partikel

Zur Ernte der extrazellulären HCV-Partikel wurde der Zellkulturüberstand von zuvor mit HCV-RNA transfizierten Zellen mit Hilfe einer Ultracel Membran konzentriert und von niedermolekularen Bestandteilen gereinigt. Das verwendete Medium war 2%iges DMEM ohne Phenolrot. Die Gewinnung der Viren erfolgte frühestens 6 d nach Transfektion in Huh-7.5-Zellen.

Zunächst wurde der Zellüberstand abgenommen und Zelltrümmer bei 1.000 g in einem Ausschwingrotor für 10 min ab zentrifugiert. Die virusproduzierenden Zellen wurden entweder gesplittet oder direkt mit frischem Medium im Brutschrank weiter inkubiert, um 3 bis 5 Tage später erneut virale Partikel zu gewinnen. Der zentrifugierte Überstand wurde anschließend mit Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten nach Herstellerangaben 20 – 200 x konzentriert. Durch die Wahl einer Molekulargewichtsabscheidegrenze von 100 kDa wurde die Menge an immunstimulierenden Substanzen wie z. B. Interferone im Überstand reduziert. Der konzentrierte Überstand wurde direkt verwendet oder für spätere Infektionsexperimente bei -80°C gelagert.

2.4.2 Infektion von Zellen

Einen Tag vor der Infektion musste eine definierte Menge an Huh-7- bzw. Huh-7.5-Zellen ausgesät werden, wobei die verwendeten Kulturbehälter je nach Experiment variierten. Der gereinigte und konzentrierte infektiöse Überstand (2.4.1) wurde entweder unverdünnt oder in Verdünnungsreihen (mit 0 % DMEM) auf die Zellen gegeben. Nach 1 – 4 h Inkubation bei 37°C im Brutschrank erfolgte ein Austausch des Mediums gegen frisches 2 %iges DMEM. Eine nicht infizierte Probe ("Mock") wurde stets als Negativkontrolle mitgeführt. Für einige Experimente wurde auch der nicht infizierte Überstand konzentriert und als Kontrolle auf die Zellen gegeben.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Arbeiten mit DNA und RNA

2.5.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Qubit®

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde ein Qubit® verwendet. Die Messmethode des Gerätes beruht auf der Detektion von Fluoreszenz, welche von einem Farbstoff emittiert wird, wenn dieser an das jeweilige Zielmolekül bindet. Je nach zu messender Nukleinsäure werden verschiedene Assay Kits eingesetzt. Die Durchführung der Messung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht es, Nukleinsäuren ihrer Größe nach zu trennen. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass DNA- und RNA-Moleküle aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen sind und somit entlang eines elektrischen Feldes in Richtung Anode durch das Gel wandern. Durch die verwendete Konzentration der Agarose kann die Vernetzungsdichte beeinflusst werden und somit die Geschwindigkeit, mit der sich die verschieden großen Nukleinsäuren, abhängig von ihrem Molekulargewicht und ihrer Struktur, durch die Matrix bewegen.

Je nach aufzutrennender Fragmentgröße wurde die Agarose in 1 x TAE- oder TBE-Puffer in der Mikrowelle so gelöst, dass eine Konzentration von 0,8 – 2 % vorlag. Nach kurzer Abkühlzeit wurde die Lösung in einen Gelschlitten mit passendem Kamm gegossen. Vor dem Laden der Proben auf das Gel mussten diese mit Ladepuffer versetzt werden. Zum Abschätzen der Laufhöhe der Proben ist der Ladepuffer mit Bromphenolblau und Xylencyanol angesetzt. Zudem wurde zur genaueren Größenbestimmung der Nukleinsäure-Banden ein passender Marker auf die Gele aufgetragen. Die angelegte Spannung variierte zwischen 90 und 120 V. Nach Beendigung des Laufes wurden die analytischen Gele in einer Ethidiumbromidlösung (1:10.000 in 1 x TAE) für 5 – 20 min inkubiert und die Banden mit Hilfe der GelDoc unter UV-Licht detektiert. Zum Schutz der Nukleinsäuren vor der UV-Strahlung wurden präparative Gele mit SYBR™ Gold (1:10.000) 30 min im Dunkeln auf einem Kippschüttler inkubiert und die Banden mit Hilfe eines Blaulicht-Illuminators sichtbar gemacht.

2.5.1.3 Extraktion aus Agarosegelen

Um mittels Agarose-Gelelektrophorese gezielt Nukleinsäure-Fragmente zu gewinnen, wurden diese mit Hilfe des Blaulicht-Illuminators detektiert und die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die anschließende Reinigung der DNA bzw. RNA erfolgte mit dem „GenJet Gel Extraction Kit“ nach Anleitung des Herstellers (Thermo Scientific).

2.5.1.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese dient, wie die Agarose-Elektrophorese, der Auftrennung von Nukleinsäuren. Da PAA höher konzentriert werden kann, kommt sie vor allem bei der Verwendung von kleinen Fragmenten zum Einsatz. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 6 – 15 %ige Gele verwendet. Neben Bisacrylamid (19:1) enthielten RNA-Gele 7 M Harnstoff, um die Nukleinsäuren zu denaturieren. Als Laufpuffer diente 1 x TBE.

Die Gele wurden zwischen zwei in Gelgießständern fest eingespannte Glasscheiben gegossen. Die Polymerisierung erfolgte durch die Zugabe von N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS). Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt, wobei für eine denaturierende Elektrophorese Formamid (FA)-Puffer verwendet wurde. Zur Größenbestimmung lief zusätzlich ein Marker mit. Die angelegte Spannung variierte zwischen 100 und 200 V. Die Detektion der Banden erfolgte wie bei der Agarose-Gelelektrophorese beschrieben (2.5.1.2).

2.5.1.5 Phenol-Chloroform Extraktion

Um Nukleinsäurelösungen von unerwünschten Proteinen zu reinigen, kann eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt werden. Hierzu musste zunächst die zu säubernde Lösung auf mindestens 200 µl mit ddH₂O aufgefüllt und anschließend mit 1 Volumen Phenol ergänzt werden. Die Probe wurde ca. 10 s gevortext, wodurch sich das Phenol verteilt und die Proteine denaturieren. Nach einer 3 min Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde die wässrige Phase, in welcher die Nukleinsäuren vorliegen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einer 1:1 Phenol/Chloroform Mischung versetzt. Nach erneutem Vortexen, Zentrifugieren und Überführung der wässrigen Phasen konnte der Schritt mit reinem Chloroform wiederholt werden, um Reste des Phenols zu entfernen. Anschließend folgte die Präzipitation der Nukleinsäuren (2.5.1.6).

Um Verluste zu verringern, wurde die Nukleinsäurelösung alternativ auf mindestens 400 µl aufgefüllt, mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gevortext und in Phase Lock Gel Heavy Röhrchen überführt. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend für 5 min bei RT und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, wodurch sich die Gelmatrix zwischen die wässrige und organische Phase legt. Die obere wässrige Phase, in der sich die

Nukleinsäuren befinden, kann anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und präzipitiert werden.

2.5.1.6 Präzipitation von Nukleinsäuren

Die Präzipitation oder Fällung von DNA und RNA dient der Konzentrierung und Reinigung der Nukleinsäuren. Durch die Zugabe von saurem Salz werden die Nukleinsäuren ungeladen, wodurch sich ihre Löslichkeit verringert und sie in Alkohol ausfallen.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Fällung mit Ethanol oder Isopropanol. Für die Ethanolpräzipitation wurde zu der behandelnden Lösung zunächst 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat hinzugefügt und anschließend mit 2,5-fachem Volumen 100 % Ethanol gemischt, sodass eine Endkonzentration von 70 % Ethanol vorlag. Alternativ konnte anstelle von Ethanol 1 Volumen Isopropanol verwendet werden. Bei sehr geringen Mengen an RNA wurde zudem 1 µl GlycoBlue™ zugegeben. Das Fällern erfolgte für mindestens 1 h und maximal 1 h bei -20°C im Gefrierschrank. Die Resuspension der Nukleinsäure erfolgte nach einer 20 min Zentrifugation bei 14.000 rpm, zweimaligem Waschen mit 70 %igem Ethanol und sorgfältiger Entfernung ethanolischer Flüssigkeitsreste in der gewünschten Menge wässriger Flüssigkeit.

2.5.2 Arbeiten mit DNA

2.5.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Ziel einer Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ist die *in vitro* Amplifikation eines gewünschten Nukleinsäure-Fragmentes. Unter geeigneten gepufferten Bedingungen werden, neben der Ausgangs-DNA (Template), zwei die Zielsequenz flankierende DNA-Oligonukleotide (Primer), Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) sowie eine hitzestabile DNA-Polymerase als synthetisierendes Enzym eingesetzt. Eine PCR besteht aus mehreren Zyklen, die sich aus den Phasen Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation zusammensetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Thermocycler „TProfessional“ und „T1 Thermocycler“ von Biometra verwendet. Es wurden die nachfolgend zusammengefassten Komponenten und Parameter für einen Standard-PCR-Ansatz verwendet.

Tabelle 2-16: Für eine PCR verwendeten Komponenten und Parameter

Eingesetzte Menge	Komponente
200 ng	DNA-Template
10 µl	5 x OneTaq Reaction Buffer
1 µl	10 mM dNTPs
1 µl	100 pmol/µl Primer 1
1 µl	100 pmol/µl Primer 2
1 µl	OneTaq Polymerase
x µl	H ₂ O
50 µl	Gesamtvolumen

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	7 min	
Zyklische Denaturierung	95°C	10 s	30 x
Zyklische Hybridisierung	Primer T _m - 5°C	30 s	
Zyklische Elongation	68°C	30 s/500 bp	
Finale Elongation	68°C	7 min	

Für präparative PCRs wurde das Gesamtvolumen auf das Zehnfache erhöht.

2.5.2.2 Mutagenese-PCR

Eine Mutagenese-PCR wird durchgeführt, um mit Hilfe von spezifischen Primern Nukleotide eines DNA-Abschnittes auszutauschen, einzufügen oder zu deletieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die sogenannte „*Overlap-Extension-PCR*“ eingesetzt. Dafür werden pro Mutagenese drei PCR-Reaktionen benötigt. Für die ersten beiden wird je ein flankierender und ein mutagener Primer verwendet. So entstehen zwei Fragmente, die an der mutierten Stelle überlappen. In der dritten PCR werden die zwei entstandenen PCR-Fragmente mit Hilfe der flankierenden Primer fusioniert (siehe Abbildung 2-1). Der Vorteil dieser Methode ist, dass kurze mutierte PCR-Produkte entstehen, welche direkt zur Klonierung eingesetzt werden können.

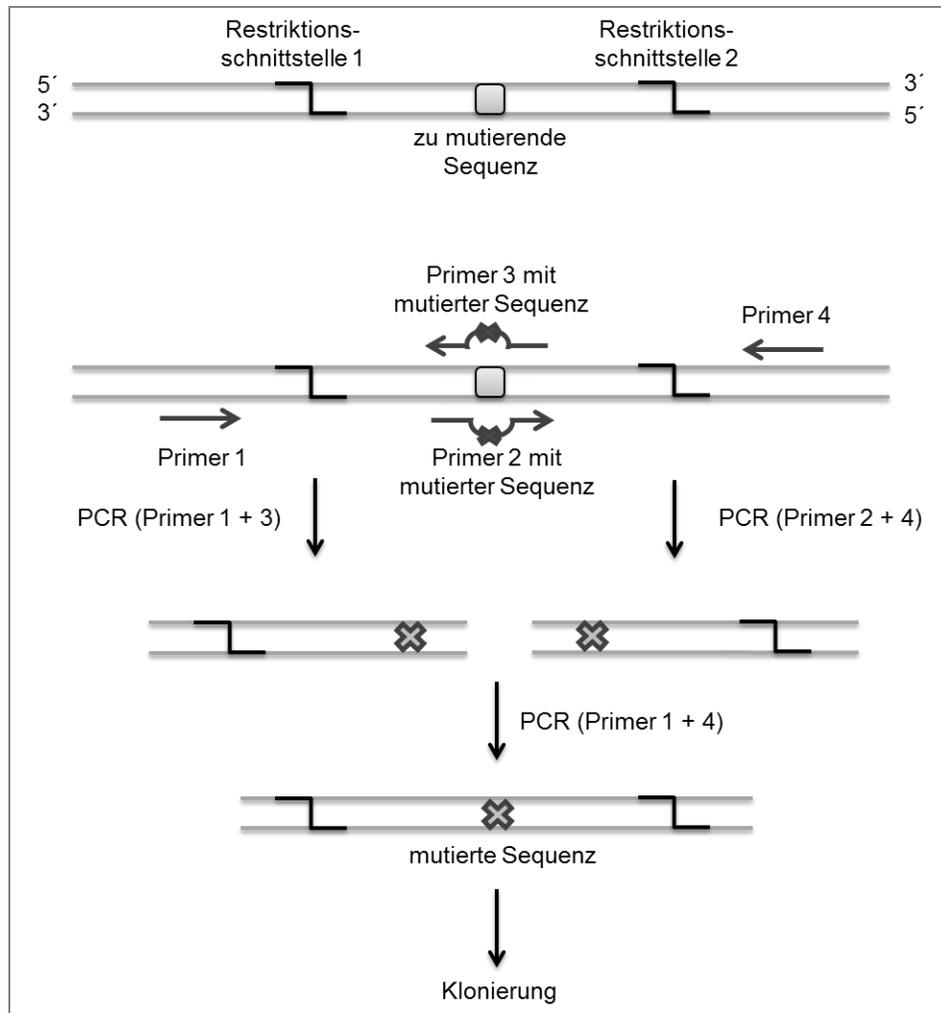


Abbildung 2-1: Methode der Mutagenese-PCR (Overlap-Extension-PCR). Drei PCR-Reaktionen werden zur Mutagenese benötigt, wobei bei den ersten beiden je ein flankierender und ein mutagener Primer verwendet wird. In der dritten PCR werden die zwei entstandenen PCR-Fragmente mit Hilfe der flankierenden Primer (1 + 4) fusioniert.

Der Ansatz erfolgte wie bei der Standard-PCR (2.5.2.1), mit dem Unterschied, dass anstelle der One *Taq* Polymerase die *Phusion* oder *Q5*-Polymerase verwendet wurde. Diese Polymerasen sind zum einen schneller als die konventionelle *Taq*-Polymerase und, was entscheidend ist, sie weisen eine sehr viel niedrigere Fehlerrate auf, da sie eine 3'-5' Exonukleaseaktivität enthalten.

2.5.2.3 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau dient der gezielten Fragmentierung von DNA. Hierfür werden Endonukleasen eingesetzt, welche die Nukleinsäure an spezifischen Erkennungssequenzen schneiden. Es lässt sich generell ein präparativer von einem analytischen Restriktionsverdau unterscheiden. Der präparative Verdau wird vor allem bei Klonierungen eingesetzt, da sich einzelne Fragmente anschließend isolieren und neu kombiniert wieder gezielt ligieren lassen. Dazu werden Vektor und Inserts mit den gleichen oder kompatiblen Endonukleasen geschnitten. Der analytische Verdau dient vor allem der Längenkontrolle von präparierten Plasmiden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden jeweils mit den dazugehörigen Puffern nach Angaben des Herstellers NEB verwendet.

2.5.2.4 Dephosphorylierung

Zur Verhinderung der Religation eines Vektors bei der Klonierung wird nach einer Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme eine *Antarctic Phosphatase* eingesetzt, um den 5'-Phosphatrest der DNA zu entfernen. Die Inkubation erfolgte mit 1 U Phosphatase/μg DNA 1 h bei 37°C. Diese Dephosphorylierung verhindert die Selbst-Ligation der Vektor-Enden in *cis*, wohingegen die teilweise Ligation mit Fragmenten, die 5'-Phosphate tragen, möglich ist und dann in den Bakterien nach Reparatur vervollständigt wird.

2.5.2.5 Ligation

Eine Ligation dient der gezielten Verknüpfung von DNA-Fragmenten. Hierfür wird das Enzym T4 DNA Ligase eingesetzt, welches unter ATP-Verbrauch eine Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der endständigen 3'-OH-Gruppe herstellt.

Um ein molares Verhältnis von 1:4 zwischen Vektor und Inserts einstellen zu können, wurden zunächst alle Konzentrationen der Fragmente am Qubit® gemessen (2.5.1.1). Die Berechnung der einzusetzenden Menge erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Insert (ng)} = \frac{4 \times (\text{Vektor (ng)} \times \text{Größe des Inserts (kb)})}{\text{Größe des Vektors (kb)}}$$

Für den Ligationsansatz wurde mindestens 1 μl pro Nukleinsäure-Lösung verwendet sowie 1 μl T4 DNA Ligase und 2 μl 10 x Puffer pro 20 μl Gesamtansatz. Aufgefüllt wurde mit ddH₂O. Die Ligation erfolgte üN bei 14°C im Schüttelinkubator, gefolgt von der Transformation in *E. coli* Zellen (2.2.3.2).

2.5.2.6 Plasmid-Präparation

Eine Plasmid-Präparation dient der Isolierung gereinigter Plasmid-DNA aus zuvor transformierten Bakterien. Im Rahmen dieser Arbeit wurden das „GenJet Plasmid Miniprep“ sowie das „GenJet Plasmid Maxiprep“ Kit nach Herstellerangaben verwendet. Das Prinzip der Kits beruht auf der alkalischen Lyse. Mithilfe der ersten Lösung werden die Bakterien resuspendiert und eine isotonische Umgebung geschaffen. Danach werden durch beigesetztes SDS und NaOH die Zellen lysiert, die Proteine denaturiert und die doppelsträngige DNA dissoziiert. Durch die Neutralisierung des alkalischen Milieus wird die genomische DNA von der Plasmid-DNA getrennt. Dies ist möglich, da die relativ kleine Plasmid-DNA schneller renaturieren kann als die chromosomale DNA, dadurch nicht irregulär verklumpt und somit auch nach dem Zentrifugieren im Überstand verbleibt.

Für die kleine Präparation ("Mini") wurden 4 ml Bakterienkultur und für eine große Präparation ("Maxi") 250 ml Bakterienkultur verwendet (2.2.2).

2.5.2.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Überprüfung einer eingeführten Mutation oder einer erfolgreichen Klonierung wurde die isolierte Plasmid-DNA sequenziert. Hierfür wurden 100 ng/µl DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 12 µl an die Firma SeqLab gesendet, welche die Sequenzierung übernahm. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des BioEdit-Programms und einem Alignment an die gewünschte Plasmidsequenz mit „Clustal Omega“.

2.5.3 Arbeiten mit RNA

RNasen sind nicht wie andere Enzyme durch Autoklavieren vollständig zu inaktivieren. Aus diesem Grund muss bedacht und unter Verwendung von speziell präparierten Reagenzien und Materialien gearbeitet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei RNA-Arbeiten ausschließlich RNase-freie Chemikalien und Lösungen verwendet. Glaswaren und Spatel wurden bei 280°C über 8 h gebacken und Plastikware ün in einer 0,1 M NaOH / 1 mM EDTA inkubiert. Zudem wurden Nuklease-freie Filter-Pipettenspitzen verwendet.

2.5.3.1 Transkription (in vitro)

Das verwendete HCV-Jc1 [257] und seine Derivate (Wt und Mutanten, ~9,7 kb) wurden *in vitro* transkribiert. Hierfür wurde die T7-RNA-Polymerase, welche ursprünglich aus dem *E. coli* befallenden Phagen T7 stammt, verwendet.

Die Polymerase benötigt zur Initiation der Transkription die Promotorsequenz TAATACGACTCACTATA, welche sich auf den verwendeten Plasmiden direkt vor dem

ersten Nukleotid der HCV-Sequenz befindet. Um ein möglichst exaktes Ende der RNA zu generieren, befinden sich auf den Plasmiden in direktem Anschluss an das Genom ein HDV-Ribozym, sowie der T7-Terminator. Zur Sicherheit wurden die Plasmide vor der Transkription zusätzlich linearisiert, unter Einsatz von Phenol/Chloroform gereinigt und mit Ethanol präzipitiert (2.5.1.5, 2.5.1.6). Die Schnittstelle befindet sich im Anschluss an den Terminator.

Der Transkriptionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 2-17: Zusammensetzung des verwendeten Transkriptionsansatzes

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration
Transkriptionspuffer	10 x	1 x
rNTPs	25 mM	3750 µM
DTT	100 mM	10 mM
DNA Template		25 ng/µl
T7-Polymerase	50000 U/ml	1 U/µl
MgCl ₂	25 mM	5 mM

Je nach Bedarf wurden 50 – 400 µl Transkriptionsreaktion angesetzt, aliquotiert und bei 37°C inkubiert. Nach 2 h wurden nochmals 0,5 U/µl Polymerase hinzugefügt und für weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Es folgte ein DNase I-Verdau (2.5.3.2), die Reinigung der RNA (2.5.3.3) und Kontrolle über ein Agarosegel (2.5.1.2).

2.5.3.2 DNase I-Verdau

Um Template-DNA in einem Transkriptionsansatz zu verdauen, wird diese mit DNase I verdaut. Hierfür wurde DNase I Reaktionspuffer sowie 0,1 U/µl Enzym zu der fertigen Transkription gegeben und 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

2.5.3.3 Reinigung der RNA

Die Reinigung der synthetisierten RNA erfolgt entweder unter Einsatz des „GeneJet RNA Cleanup and Concentration Micro Kit“, über Phenol-Chloroform Extraktion (2.5.1.5) und Präzipitation oder über eine denaturierende PAA-Gelelektrophorese (2.5.1.4).

2.5.3.4 Hybridisierung von miR

Um biologisch aktive miRs in Zellen einzubringen, müssen diese für die Transfektion als partieller Doppelstrang vorliegen. Hierfür wurden die zwei Einzelstränge (*sense* und

antisense) in äquimolaren Mengen gemischt und zunächst in einem Thermocycler auf 90°C erhitzt. Anschließend wurde die Temperatur um 1°C pro Minute bis auf 4°C reduziert. Die entstandenen Duplexe konnten direkt verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Nachweis von Proteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie

2.6.1.1 Aussäen und Fixieren der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Um Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop analysieren zu können mussten diese zunächst auf Deckgläschen ausgesät und fixiert werden.

Die Huh-Zellen für die Mikroskopie wurden zunächst mit 1 x PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin/EDTA von der Flasche abgelöst (2.3.1). In dieser Zeit konnten runde Deckgläschen zum Sterilisieren in 100 % Ethanol erhitzt und dann getrocknet werden. Diese wurden in 12 Well-Platten vorgelegt, mit je 1 ml 1 x PBS gewaschen und anschließend für 10 min mit 0,01% Poly-L-Lysin (Molekülmasse: 30.000 – 70.000 Da) überschichtet und erneut gewaschen. Alternativ konnten die Zellen auch direkt in 24 oder 96 Well-Platten ausgesät werden.

Zum Fixieren der Zellen musste zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit 1 ml 1 x PBS gewaschen werden. Danach konnten sie durch Zugabe von je 1 ml 3 % Paraformaldehyd für mindestens 20 min fixiert werden. Anschließend wurden die Zellen viermal 5 min mit je 1 ml eiskaltem PBS-Glycin gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte durch die Zugabe von 500 µl kaltem Aceton und einer Inkubation von 10 min bei -20°C. Anschließend wurden die Zellen erneut 3 x mit PBS-Glycin gewaschen.

2.6.1.2 Färben von Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Vor der Färbung der Zellen für die Mikroskopie mussten diese zunächst für 10 min bei RT mit einer 1 % BSA (Bovine Serum Albumin)-Lösung in PBST-Glycin geblockt werden, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Darauf folgend konnten die Zellen mit dem NS3-Antikörper (1:500 in BSA-Blockierungslösung) 1,5 h bei RT inkubiert werden. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit PBS-Glycin wurden sie 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper (Goat-anti-mouse IgG1, Alexa Fluor® 488, 1:200) inkubiert und anschließend erneut gründlich mindestens 3 x mit PBS-Glycin gewaschen. Die finale Inkubation erfolgte mit 1 ml DAPI-Lösung 1:2000 in PBS-Glycin für 5 min bei RT. Es folgten drei weitere Waschschriffe. Am Ende wurden die gefärbten Zellen mit 13 µl Moviol (mit

1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan versetzt) auf Objektträgern eingebettet oder direkt unter dem Mikroskop betrachtet. Die Lagerung der Proben erfolgte im Dunkeln bei 4°C.

2.6.2 Nachweis von Proteinen mittels Western Blot

2.6.2.1 Lyse der Zellen

Die für einen Western Blot in 12 Well-Platten ausgesäten Zellen wurden vor dem Lysieren zunächst mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 130 µl WB-Lysepuffer/Well für 20 min bei 4°C. Um die Zelltrümmer aus der Suspension zu entfernen, wurde die Lösung in ein Reaktionsgefäß überführt und 20 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand konnte danach in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und mit 130 µl 2 x PPC gemischt werden. Die Suspension wurde 10 min bei 95°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.6.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die „Sodium Dodecyl Sulfate“-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Zuvor werden die Proteine noch durch Hitze und DTT, welches Disulfidbrücken reduziert, denaturiert. SDS ist ein anionisches Detergens, welches sich an die Proteine anlagert und sie somit, in einem etwa gleichmäßigen Ladungs-zu-Masse-Verhältnis, negativ lädt und maskiert. Dadurch wird eine Auftrennung mit Hilfe einer angelegten Spannung möglich. Die Gele bestehen aus Polyacrylamid-Netzwerken, die durch die Polymerisierung von Acrylamid und Bisacrylamid durch die Zugabe von TEMED und APS gebildet werden. Jedes Gel besteht aus zwei Teilen: oben ein Sammelgel mit einer geringeren Acrylamidkonzentration und neutralem pH-Wert zum Fokussieren der Proteine, und darunter ein Trenngel mit höherer Acrylamidkonzentration und schwach alkalischen pH-Wert. Bei neutralem pH-Wert ist Glycin wenig negativ geladen, nimmt die Proteine langsam in einer Front mit und fokussiert sie dadurch in einer Bande im weitporigen Sammelgel, wohingegen das Glycin bei alkalischen pH-Wert im Trenngel weitgehend negativ geladen ist und schnell die Proteine überholt, die dann im dichteren Acrylamid nach ihrer Größe retardiert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zusammensetzung der Gele ist der Tabelle 2-18 zu entnehmen.

Tabelle 2-18: Zusammensetzung der SDS-Gele

Komponente	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12 %)
40 % Bisacrylamid (29:1)	375 µl	1800 µl
Trizin-Gelpuffer	750 µl	2000 µl
Glycerol	-	650 µl
H ₂ O	1842 µl	1484 µl
APS	30 µl	60 µl
TEMED	3 µl	6 µl
Gesamtvolumen	3 ml	6 ml

Die Gele wurden zwischen zuvor frisch gereinigte und in Gelgießständern fest eingespannte Glasscheiben gegossen. Das zuerst hergestellte Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine ebene Oberfläche zu erhalten. Nach der Polymerisierung konnte das Sammelgel bis zum Rand der Glasplatten gegossen und ein Kamm eingesetzt werden. Nach vollständigem Aushärten wurde der Kamm entfernt und die Gele in die SDS-Gelelektrophorese-Kammer überführt, welche mit SDS-Puffer gefüllt wurde. Die Proben wurden bei 95°C für 10 min denaturiert und 20 µl zum Beladen der Gele verwendet. Zur Kontrolle der Proteingrößen wurde zudem 4 µl eines Protein-Größenstandards aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V.

2.6.2.3 Western Blot

Der Western Blot dient der Übertragung von zuvor mittels SDS-PAGE (2.6.2.2) aufgetrennten Proteinen aus dem Gel auf eine Membran, um sie anschließend immunochemisch nachzuweisen. Mithilfe von elektrischem Strom und hydrophoben Wechselwirkungen werden die Proteine an eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran gebunden.

In dieser Arbeit kam das halbtrockene (engl. *semi dry*) Verfahren mit einem horizontalen Aufbau zur Anwendung. Zunächst wurde die Membran 1 min in 100 % Methanol eingelegt, um die Hydrophobie der Membran abzuschwächen. Anschließend wurden pro Blot zwei Filterpapiere, die Membran, das Gel (ohne Sammelgel) und zwei weitere Filterpapiere kurz in Transferpuffer äquilibriert und in der eben genannten Reihenfolge auf der sich unten befindenden Anode der Kammer aufgeschichtet. Dabei war darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten befinden. Nach Aufsetzen des Kathoden-Deckels wurde für 1,5 h eine Spannung angelegt, die zu einem Stromfluss von 42 mA pro Gel führte.

2.6.2.4 Immunochemie zur Detektion der Proteine

Zur spezifischen Detektion der Proteine auf einer PVDF-Membranen nach dem Western Blot (2.6.2.3) erfolgte ein immunochemischer Nachweis.

Zunächst inkubierte die Membran 1 h bei RT oder üN bei 4°C in 5 % Milchpulver-Blocklösung auf einem Schüttler. Die primären α -NS3-, α -Core- und α -GAPDH-Antikörper (AK) wurden in Blocklösung verdünnt (2.1.5) und 1 ml pro Gel auf die Membran gegeben. Damit die Membran gleichmäßig mit Flüssigkeit bedeckt war und um ein Austrocknen zu vermeiden, wurde diese in eine Plastikfolie gelegt. Nach 1,5 h Inkubation bei RT musste 3 x 10 min mit PBST gewaschen werden. 25 ml des ebenfalls in Blocklösung verdünnten sekundären Goat-anti-mouse IgG AK, welcher an eine Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HOR) gekoppelt ist, wurden auf die Membran gegeben und 1 h unter Schütteln bei RT inkubiert. Das Waschen mit PBST erfolgte wie nach den ersten AK. Zur Detektion wurde das SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit nach Herstellerangaben verwendet. Nach 5 min Inkubation in einer Plastikfolie konnte das Chemilumineszenz-Signal, das aufgrund der Umsetzung des Luminols aus der Detektionslösung durch die Peroxidase entsteht, durch Auflegen von Röntgenfilmen auf die Membran gemessen werden. Der Film wurde nach unterschiedlichen Belichtungszeiten mit Entwickler- und Fixiererlösung behandelt.

2.7 Komplexe Methoden zur Analyse von RNA

2.7.1 Quantitative-Reverse-Transkriptase-PCR

Die Methode der Quantitativen-Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR) kombiniert eine reverse Transkriptionsreaktion mit einer speziellen PCR zur Detektion von RNA. Hierzu wird zunächst die Ziel-RNA durch eine reverse Transkriptase mit spezifischen oder generellen Primern in cDNA umgeschrieben. Diese wird anschließend durch Messung eines Fluoreszenzfarbstoffes in einer PCR quantifiziert.

2.7.1.1 Lyse der Zellen und Isolation der Gesamt-RNA

Die für die qPCR in 12 Well-Platten ausgesäten Zellen wurden nach dem Waschen mit 500 μ l TRIzol™ LS bedeckt und für 5 min bei RT inkubiert. TRIzol™ LS enthält unter anderem Guanidiniumisothiocyanat sowie saures Phenol, wodurch die Zellen lysieren und sowohl die DNA als auch die Proteine von der wässrigen, RNA-haltigen Lösung abgetrennt werden. Anschließend mussten die lysierten Zellen durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und in ein Reaktionsgefäß überführt werden. Nach der Zugabe von 100 μ l

Chloroform wurden die Proben gevortext, 3 min bei RT inkubiert und 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase konnte daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden und die RNA mit 250 µl Isopropanol und 1 µl GlycoBlue™ bei -20°C präzipitiert werden. Nach einer 20 min Zentrifugation und 2 x Waschen mit 70 %-igem Ethanol wurden die Nukleinsäuren in 32 µl ddH₂O resuspendiert. Die Entfernung der restlichen DNA erfolgte anschließend mit 4 µl RQ1 Puffer und 4 µl RQ1 DNase und einer Inkubation für 30 min bei 37°C. Danach wurden 160 µl ddH₂O hinzugefügt, die RNA mit Phenol/Chloroform gereinigt und mit 20 µl NaOAc, 500 µl 100%igem Ethanol sowie 1 µl GlycoBlue™ präzipitiert. Nach dem Zentrifugieren und Waschen des Pellets wurde dieses in 50 µl ddH₂O gelöst.

2.7.1.2 Reverse Transkription

Um die quantitative PCR durchzuführen, muss die zu analysierende RNA zunächst *in vitro* spezifisch in cDNA umgeschrieben werden. Katalysiert wird die Reaktion von einer Reversen Transkriptase, welche ursprünglich in Retroviren vorkommt. Die eingesetzte Transkriptase weist zusätzlich eine RNase H-Aktivität auf. Dadurch wird gewährleistet, dass bereits umgeschriebene RNA direkt abgebaut wird und nicht für weitere Schritte zur Verfügung steht, was die differentielle Quantifizierung der RNA verbessert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden spezifische gegen die NS3-Region des plus-Stranges von HCV sowie gegen GAPDH gerichtete RT-Primer verwendet. Für die RT wurde das *qScript™ Flex cDNA Kit* von Quantabio verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes des ersten Schrittes der reversen Transkription ist in der Tabelle 2-19 zusammengefasst.

Tabelle 2-19: Zusammensetzung des RT-Ansatzes

Eingesetzte Menge	Komponente
2 µl	RNA-Probe
2,8 µl	ddH ₂ O
0,4 µl	Primer (20 µM)
0,8 µl	GSP Enhancer
6 µl	Gesamtvolumen

Für die Hybridisierung der Primer an die Ziel-RNAs wurden die Reaktionsansätze in einem Thermocycler innerhalb von 5 min von 65°C auf 42°C abgekühlt. Anschließend wurden je 0,4 µl Reverse Transkriptase sowie 1,6 µl Reaktionsmix zu den Ansätzen gegeben. Es folgte die RT bei 42°C für 30 bis 60 min, mit einer anschließenden Inaktivierung

und Auflösung der Hybridisierung bei 85°C für 5 min. Die Proben konnten nun bei -20°C gelagert oder direkt für die qPCR eingesetzt werden.

2.7.1.3 Quantitative PCR

Die qPCR dient der Detektion und Quantifizierung von Nukleinsäuren. Die Methode beruht auf der Standard PCR (2.5.2.1), wobei zusätzlich der Farbstoff SYBR Green eingesetzt wird, welcher in dsDNA interkaliert und dann fluoresziert. Nach jedem Zyklus der PCR wird das Fluoreszenz-Signal gemessen, wodurch auch die jeweils neu amplifizierte DNA detektiert wird. Charakteristisch ist hierbei der detektierte sigmoidale Kurvenverlauf. Der Zyklus, an dem das gemessene Signal die exponentielle Phase erreicht, ist der sogenannte Schwellenwert Ct (engl. *cycle threshold*), an welchem das Hintergrundsignal überschritten wird. Je geringer der ermittelte Ct-Wert ist, desto höher ist dementsprechend die Menge der eingesetzten cDNA. Zur Kontrolle wird zudem eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *PerfeCTa® SYBER® Green FastMix® Kit* von VWR verwendet. Durch spezifische Primer wurde die NS3-codierende Region auf dem +ssRNA HCV Genom sowie als Kontrolle die GAPDH-RNA detektiert. Die Zusammensetzung der Reaktionen ist der Tabelle 2-20 zu entnehmen.

Tabelle 2-20: Zusammensetzung des qPCR Ansatzes

Eingesetzte Menge	Komponente
2 µl	RT-Reaktion
10 µl	PerfeCTa SYBER Green FastMix (2x)
1,5 µl	Primer 1 (20 µM)
1,5 µl	Primer 2 (20 µM)
5 µl	ddH ₂ O
20 µl	Gesamtvolumen

Die Messungen erfolgten in 96 Well-Platten und mit dem Eppendorf Mastercycler ep realplex2 S. Die Proben wurden zunächst für 2 min bei 95°C denaturiert, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus jeweils 15 s bei 95°C und 30 s bei 60°C.

2.7.1.4 Auswertung der qPCR

Um die Konzentration der zu Untersuchenden HCV-RNA berechnen zu können, musste zunächst die Amplifikationseffizienz (E) der Primer bestimmt werden. Dies erfolgte

für die verwendeten Primer durch Lyudmila Shalamova aus der AG Niepmann. Zur Berechnung der RNA-Mengen (*target*) wurden entweder ein Referenzgen oder ein Referenzzeitpunkt (*ref*) verwendet. Das relative Expressionsverhältnis wird dabei mit folgender Formel berechnet:

$$\text{relatives Expressionsverhältnis} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{target}}(\text{Kontrolle-Probe})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{ref}}(\text{Kontrolle-Probe})}}$$

2.7.2 Ribosome Profiling Methode

Die Methode des Ribosome Profiling (RP) ermöglicht eine quantitative und genomweite Momentaufnahme der *in vivo* Genexpression. Sie basiert auf der Sequenzierung von Ribosom-geschützten RNA Fragmenten (engl. *ribosome protected fragments*, "RF") und zusätzlich der gesamten RNA (Transkriptome, "TR"). So können Veränderungen in der Proteinsynthese durch transkriptionelle und/oder translationelle Regulation untersucht werden, unter der Annahme, dass die Anzahl Ribosomen-geschützter RNA-Fragmente durchschnittlich betrachtet ein Maß für die Translations-Aktivität der RNA ist. Zudem ist es möglich, neue offene Leserahmen zu entdecken beziehungsweise die Start- und Stopp-Stellen bereits annotierter Gene zu überarbeiten. Die angewendete Methode basiert auf einem von Ingolia *et al.* publizierten Protokoll. Eine Übersicht über den experimentellen Ablauf ist der Abbildung 2-2 zu entnehmen. Nach dem Aussäen und der Transfektion von Zellen (2.7.2.1) werden diese unter Bedingungen, welche die Ribosomen in ihren *in vivo* Positionen einfrieren, lysiert (2.7.2.3). Ein Teil des Lysates wird mit RNasen behandelt (2.7.2.4) und die von Monosomen gebundenen RNA-Fragmente durch Dichtegradientenzentrifugation angereichert (2.7.2.5). An die RNA-Fragmente können nun Linker ligiert werden, welche als Primer für die reverse Transkription dienen (2.7.2.9, 2.7.2.11). Die so entstandene cDNA wird zirkularisiert, wodurch eine zweite Primersequenz entsteht (2.7.2.13). Nach einem rRNA-Depletionsschritt (2.7.2.14) sowie PCR Amplifikationen können die Proben sequenziert werden (2.7.2.15 – 2.7.2.19). Auf die einzelnen Schritte soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

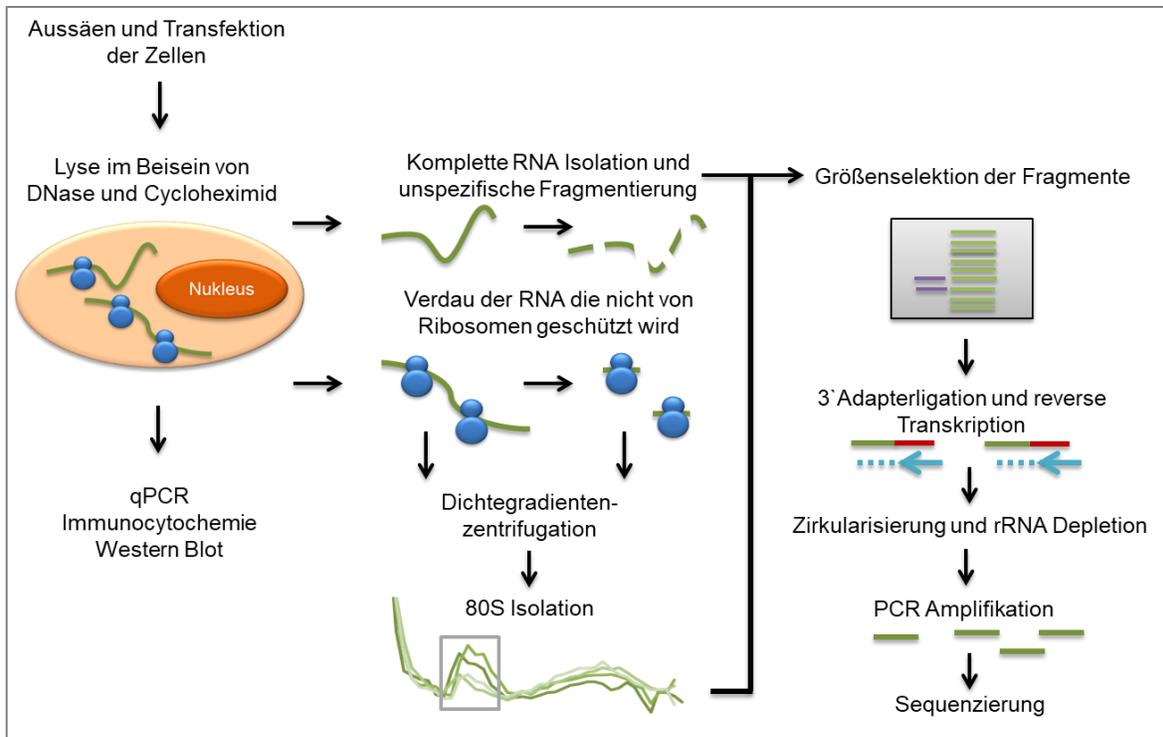


Abbildung 2-2: Übersicht über die angewendete Ribosome Profiling Methode

2.7.2.1 Aussäen und Transfektion der Zellen

Für die erste Runde des Ribosome Profiling wurden 80 – 90 % konfluente Zellkulturflaschen (175 cm²) mit je 5 µg anti-miR-122-LNA oder 0,5 µg miR-122 mit Lipofektamine 2000 transfiziert (2.3.5.1). 24 h später folgte die Elektroporation (2.3.5.2) mit oder ohne 8 µg HCV-RNA, sowie 1,25 µg anti-miR-122-LNA oder 0,125 µg miR-122. Pro Probe wurden die 12 ml in zwei 15 cm Schalen für die Gewinnung der RF, eine 10 cm Schale für die TR, sowie ein 6 Well und ein 12 Well für Western Blot- und RT-qPCR-Kontrollen aufgeteilt. Drei Tage nach der Elektroporation folgte eine weitere Lipofektion mit 9 µg LNA oder 1,5 µg miR-122.

Für die zweite Runde des Ribosome Profiling mussten zunächst je $7,6 \times 10^5$ Huh-7.5-Zellen in 15 cm Zellkulturschalen ausgesät werden, wobei pro Probe drei Schalen verwendet wurden. Zusätzliche Schalen wurden für die Kontrollen verwendet. Einen Tag später erfolgte die Transfektion mit viralen Genomen und miR-122 bzw. anti-miR-122-LNAs. Hierfür wurde Lipofectamine 2000 verwendet (siehe 2.3.5.1). Drei Tage nach der ersten Transfektion erfolgte eine zweite. Die jeweils eingesetzten RNA-Mengen sind in der Tabelle 2-21 zusammengefasst.

Tabelle 2-21: Transfizierte RNA für die Ribosome Profiling Methode

Probe	RNA	Transfektion 1 [µg/15 cm Schale]	Transfektion 2 [µg/15 cm Schale]
HCV	HCV wt	5	0
	miR-122	0,5	1,5
miR-122	miR-122	0,5	1,5
Anti-miR-LNA	LNA	3	9

Sechs Tage nach der ersten Transfektion wurden die Zellen lysiert.

2.7.2.2 Vorbereitung der Sucrosegradienten

Am Tag der Zellyse mussten zunächst die Sucrosegradienten für die Dichtegradientenzentrifugation vorbereitet werden. Hierzu wurden als Erstes die Zentrifugenröhrchen (14 x 89 mm) mit Hilfe von Parafilm in vertikaler Position fest an einem Ständer fixiert und die 60 und 10 %ige Sucroselösung mit 1 mM DTT sowie 100 µg/ml Cycloheximid versetzt. Nun konnten die 5 ml der 60 % Lösung im Röhrchen vorsichtig tropfenweise mit der 10 % Lösung überschichtet werden. Die gefüllten Röhrchen wurden anschließend mit mindestens zwei Schichten Parafilm verschlossen und sehr langsam in eine horizontale Position gebracht. Nach 4 h konnten die Röhrchen vorsichtig wieder aufgerichtet und direkt verwendet werden. Durch die leichten Verwirbelungen und die Diffusion der Sucrose während dieser Prozedur können auf einfache Weise und mit sehr gut reproduzierbarer Qualität kontinuierliche Sucrosegradienten hergestellt werden.

2.7.2.3 Zellyse

Der eigentliche Versuch beginnt mit der Lyse der Zellen. Dies muss unter Bedingungen erfolgen, die dafür sorgen, dass die translatierenden Ribosomen an ihrer momentanen Position auf der RNA fixiert werden. Hierfür wird der Translationshemmer Cycloheximid eingesetzt. Dieser Wirkstoff bindet nahe der E-Stelle der Ribosomen und blockiert das Verlassen der tRNAs aus einer besetzten oder unbesetzten Exit-Stelle, wodurch es zu einer Elongationsinhibition sowohl bei allen Elongationsschritten als auch schon direkt nach der Initiation der Translation kommt.

Die in den 15 cm Schalen ausgesäten Zellen wurden für die Lyse zunächst auf Eis platziert und das Medium entfernt. Anschließend wurden sie mit 10 ml PBS, welches mit 10 µl Cycloheximid-Lösung (100 mg/ml) versetzt war, gewaschen. Nach der Abnahme des PBS erfolgte die Lyse mit 500 µl Polysomen-Lysepuffer, 5 µl TURBO DNase und 0,5 µl

Cycloheximid pro Platte. Mit Hilfe eines Zellschabers konnte das Lysat vollständig in ein Reaktionsgefäß überführt und 10 min auf Eis inkubiert werden. Es folgte ein 10 min Zentrifugationsschritt zur Entfernung der Zelltrümmer bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit. Der Überstand wurde in drei neue Reaktionsgefäße verteilt: 1000 µl für die RNase-Behandlung (RF), 800 µl für die komplette RNA (TR) und der Rest für die Polysomen-Kontrolle. Die Proben für die komplette RNA wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.7.2.4 RNA-Verdau

Der Verdau der ungeschützten RNA dient der gezielten Isolierung der zu dem Zeitpunkt translatierten Fragmente.

Um die einzusetzende Menge an RNase I zu bestimmen, musste zunächst die RNA mit Hilfe eines Fotometers bei 260 nm quantifiziert werden. Als Leerwert diente der Lysepuffer in H₂O. Pro 3,14 OU₂₆₀ wurde 1 µl RNase I (100 U) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 50 min bei RT auf einem Schüttler mit 400 rpm. Zur Inaktivierung der RNase I wurde die doppelte Menge SUPERase Inhibitor zu den Proben gegeben und 3 min bei 4°C inkubiert.

2.7.2.5 Ultrazentrifugation, Fraktionierung und Messung der Gradienten

Um gezielt die Fragmente, welche durch Monosomen (80S) geschützt werden, zu isolieren, wird eine Sucrose-Dichte-Ultrazentrifugation durchgeführt. Dies ist unter anderem wichtig, um zu überprüfen, ob das Cycloheximid und der RNA-Verdau funktioniert haben. Als weitere Kontrolle wurde neben den verdauten Proben auch eine unverdaute Probe eingesetzt.

Zunächst wurden die RFs sowie eine Kontrolle vorsichtig auf die vorbereiteten Gradienten geladen und das Gesamtgewicht gegebenenfalls mit Lysepuffer justiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 4°C, 35000 rpm über 3 h. Nach dem Lauf wurden die Gradienten fraktioniert, wobei immer 300 µl vorsichtig von oben nach unten abgenommen und in eine UV-transparente 96 Well-Platte überführt wurden. Die Messung erfolgte bei 260 nm in einem Mikroplattenlesegerät, und die Werte wurden in einem Graph dargestellt, um den 80S-Peak zu identifizieren. Die vier Fraktionen mit dem höchsten Vorkommen an Monosomen wurden in frische Reaktionsgefäße überführt, wobei je zwei vereinigt werden konnten. Zu den jeweils 600 µl Probe wurde 200 µl ddH₂O gegeben. Es folgte die RNA Extraktion durch Zugabe von 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol. Nach gründlichem Vortexen wurde 3 min bei RT zentrifugiert. Die wässrige Phase konnte in

ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit Hilfe von 80 µl 3 M NaOAc, 1 ml Isopropanol und 1 µl GlycoBlue™ bei -20°C präzipitiert werden.

2.7.2.6 Fragmentierung der Transkriptom-RNA

Damit die TR ebenso behandelt werden kann wie die RFs, muss deren RNA zunächst alkalisch fragmentiert werden, um kleinere Stücke zu generieren. Bevor die eigentliche Fragmentierung durchgeführt wird, wird mit einer Kontrollprobe getestet, welche Inkubationszeit sich am besten eignet.

Die Lysate wurden in 2 x 400 µl aufgeteilt und zu jedem Reaktionsgefäß 1200 µl TRIzol™ LS hinzugefügt und gemischt. Nach einer 5 min Inkubation bei RT wurden die Proben 15 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere Phase konnte übernommen werden, wobei darauf zu achten war, die Interphase nicht in das frische Reaktionsgefäß zu pipettieren. Zu den Proben wurde 1 ml Isopropanol gegeben, gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren 15 min Zentrifugationsschritt bei max. Geschwindigkeit wurde der Überstand verworfen, die Pellets mit 80 % Ethanol gewaschen und in 100 µl ddH₂O resuspendiert. Für die eigentliche Fragmentierung mussten die Proben mit dem gleichen Volumen 2 x alkaline Fragmentierungslösung (AFS) gemischt und 1 h bei 95°C inkubiert werden. Anschließend erfolgte die Präzipitation mit 500 µl Isopropanol und 2 µl GlycoBlue™ bei -20°C.

2.7.2.7 Erste Größenselektion der Fragmente

Damit nur Fragmente der erwarteten und realistischen Größe durch Ribosomen geschützter Bereiche weitergeführt werden, wird eine Größenselektion mittels Gelelektrophorese durchgeführt.

Sowohl die präzipitierten RF- als auch die TR-Proben wurden zunächst bei 4°C für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut für 5 min zentrifugiert und anschließend direkt in FA-Puffer aufgenommen. Dabei wurden die RFs jeweils mit 6 µl FA-Puffer versetzt und die zusammengehörigen Fraktionen vereint. Die Resuspension der TR erfolgte in 5 µl FA-Puffer. Als Marker dienten die NI-NI RNA-Oligonukleotide, NI-NI-20 mit 26 nt und NI-NI-19 mit 34 nt. Sie umspannen den Bereich, welchen ein translatierendes Ribosom auf einer RNA abdeckt. Die Oligonukleotide wurden äquimolar miteinander gemischt und 100 pmol als Marker eingesetzt. Die gegossenen 10 %igen Urea-PAA-Gele (2.5.1.4) wurden vor dem Beladen mit den Proben mindestens 10 min laufen gelassen. Danach konnten die gesamten Proben auf die Gele geladen und 1 bis 2 h bei 120 – 150 V aufgetrennt werden. Um die Proben vor UV-Licht zu schützen, wurden die Gele nach Beendigung der Laufzeit 10 min in 50 ml TBE-Puffer, versetzt mit 3 µl

SYBR™ Gold, auf einem Schüttler im Dunkeln gefärbt. Mithilfe eines Blaulicht-Transilluminators konnten die Banden anschließend detektiert und ausgeschnitten werden. Da darauf zu achten war, möglichst präzise die Fragmentgrößen auszuschneiden, mussten die Markerbanden als interne Kontrolle und Größenmarker mitgeführt werden. Die ausgeschnittenen Fragmente wurden jeweils in frische Reaktionsgefäße überführt, mit einem Skalpell kleingeschnitten und zweimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurden die Gelstücke in 1 ml RNA-Extraktionspuffer bei 1000 rpm üN auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag konnte der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und mit jeweils 1 ml Isopropanol, sowie 2 µl GlycoBlue™ bei -20°C präzipitiert werden. Die Gelfragmente wurden als Absicherung ebenfalls eingefroren.

2.7.2.8 Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung der Fragmente mit der T4 Polynukleotid-Kinase/Phosphatase (T4 PNK) ist nötig für die anschließende Linker-Ligation.

Bevor die Proben jedoch dephosphoryliert werden können, mussten sie zunächst 15 min bei 4°C und max. Geschwindigkeit zentrifugiert, gewaschen und in 15 µl ddH₂O resuspendiert werden. 6 µl der Proben wurden auf 43 µl mit Wasser aufgefüllt, 90 s bei 80°C denaturiert und der Rest als Sicherung eingefroren. Der Ansatz der Reaktionen ist der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 2-22: Zusammensetzung der Dephosphorylierungsreaktion

Eingesetzte Menge	Komponente
43 µl	RNA-Probe
5 µl	T4 PNK-Puffer (10X)
1 µl	SUPERase-Inhibitor (20 U/µl)
1 µl	T4 PNK (10 U/µl)
50 µl	Gesamtvolumen

Die Ansätze wurden gründlich gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reaktion mussten die Proben 10 min bei 70°C inkubieren. Zu den 50 µl Ansätzen wurden 39 µl ddH₂O, 1 µl GlycoBlue™, 10 µl NaOAc sowie 150 µl Isopropanol gegeben und die RNA bei -20°C präzipitiert.

2.7.2.9 Linker-Ligation

Die Ligation des Linkers an die Fragmente sorgt für das Einbringen von Bindestellen für den RT-Primer.

Nach dem Zentrifugieren und Waschen der Pellets wurden diese in 8,5 µl ddH₂O resuspendiert. Zu den Proben wurden jeweils 1,5 µl Linkerlösung (0,5 µg/µl) gegeben, die Ansätze 90 s bei 80°C denaturiert und dann auf RT abgekühlt. Die Ligation setzt sich aus den in der folgenden Tabelle aufgeführten Komponenten zusammen.

Tabelle 2-23: Zusammensetzung der Linker-Ligation

Eingesetzte Menge	Komponente
10 µl	Probe
2 µl	T4 RNA Ligase 2-Puffer (10 x)
6 µl	Polyethylenglycol 8000 (50 %)
1 µl	SUPERase Inhibitor (20 U/µl)
1 µl	T4 RNA Ligase 2 (200 U/µl)
20 µl	Gesamtvolumen

Die Ligationsansätze wurden 2,5 h bei RT inkubiert und anschließend mit 338 µl Wasser, 40 µl 3 M NaOAc, 1,5 µl GlycoBlue™ und 500 µl Isopropanol bei -20°C präzipitiert.

2.7.2.10 Größenselektion 2

Damit bei den folgenden Reaktionen nur Fragmente mit einem ligierten Linker weiterverwendet werden, wird eine zweite Größenselektion mittels PAA-Gelelektrophorese durchgeführt.

Nach dem Pelletieren der Proben wurden diese direkt in 5 µl FA-Puffer resuspendiert und mit Hilfe von 15 %igen Urea-PAA-Gelen aufgetrennt (2.5.1.4). Hierbei war es wichtig, auch die ligierten Markeroligos aufzutragen, anhand derer sich abschätzen lässt, auf welcher Höhe die ligierten Proben im Vergleich zu nicht-ligierten laufen. Die Fragmente sowie die ligierten Markeroligos wurden nach dem Färben erneut ausgeschnitten, schockgefroren und in 1 ml RNA-Extraktionspuffer üN bei 1000 rpm inkubiert.

2.7.2.11 Reverse Transkription der Proben

Zum Umschreiben der RNA-Fragmente in cDNA wird eine reverse Transkription durchgeführt.

Nach einem Präzipitierungsschritt mit 1 ml Isopropanol und 2 µl GlycoBlue™, dem anschließenden Zentrifugieren sowie Waschen wurden die Pellets in 10 µl ddH₂O resuspendiert. Die Primerlösung wurde auf 12,5 µM eingestellt, je 2 µl zu der Probe gegeben und gemeinsam 2 min bei 80°C denaturiert. Der RT-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 2-24: Zusammensetzung der reversen Transkription

Eingesetzte Menge	Komponente
12 µl	Probe mit Primern
4 µl	First-strand-Puffer (5 x)
1 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	DTT (0,1 M)
1 µl	SUPERase Inhibitor (20 U/µl)
1 µl	SuperScript III (200 U/µl)
20 µl	Gesamtvolumen

Im Thermocycler wurden die Ansätze zunächst 30 min bei 48°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch die Zugabe von 2,2 µl 1 M NaOH 30 min bei 98°C hydrolysiert. Das Fällern erfolgte mit 156 µl ddH₂O, 2 µl GlycoBlue™, 20 µl NaOAc und 300 µl Isopropanol bei -20°C.

2.7.2.12 Größenselektion 3

Damit bei den folgenden Reaktionen nur cDNA-Fragmente verwendet werden, wird eine dritte Größenselektion mittels PAA-Gelelektrophorese (2.5.1.4) durchgeführt.

Nach dem Präzipitieren wurden die getrockneten Pellets in 6 µl FA-Puffer resuspendiert und auf ein 6 % Urea-PAA-Gel geladen. Nach dem Auftrennen der Nukleinsäure wurde die cDNA im erwarteten Größenbereich, sowie freie Primer als Negativgrößenkontrolle wie zuvor ausgeschnitten und zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Eluieren aus dem Gel erfolgte in 1 ml DNA-Extraktionspuffer bei RT und 1000 rpm auf einem Schüttler. Am nächsten Tag konnte der Überstand mit 2 µl GlycoBlue™ und 1 ml Isopropanol bei -20°C gefällt werden.

2.7.2.13 Zirkularisierung

Um die zweite Bindestelle für die PCR zu schaffen und somit die Amplifikation der Fragmente zu ermöglichen, werden die Proben zirkularisiert.

Nach der Präzipitation wurden die getrockneten Pellets in 16 µl ddH₂O gelöst und in die PCR-Reaktionsgefäße folgende Ansätze pipettiert:

Tabelle 2-25: Zusammensetzung der Zirkularisierungsreaktion

Eingesetzte Menge	Komponente
16 µl	Probe
2 µl	CircLigase Puffer (10 x)
1 µl	MnCl ₂ (50 mM)
1 µl	CircLigase (200 U/µl)
20 µl	Gesamtvolumen

Im Thermocycler wurden die Proben 2 h bei 60°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein 10 min Inaktivierungsschritt bei 80°C. Gefällt wurden die Proben durch die Zugabe von 80 µl ddH₂O, 1 µl GlycoBlue™, 10 µl NaOAc sowie 150 µl Isopropanol und der Inkubation bei -20°C.

2.7.2.14 rRNA-Depletion

Um einen möglichst großen Teil der rRNA Fragmente aus den Probenansätzen zu entfernen, wird vor der finalen Amplifikation mittels PCR ein rRNA-Depletionsschritt eingefügt.

Hierfür wurden Pools biotinylierter Oligonukleotide verwendet (zur Verfügung gestellt von D. Andreev). Von diesem Pool wurden 2 µl mit 14 µl gelöster cDNA, 2 µl 2 x SSC (Salz-Natriumcitrat-Lösung) und 2 µl ddH₂O gemischt und zunächst 90 s bei 100°C denaturiert. Im anschließenden Schritt mussten die Proben 0,1°C pro Sekunde auf 37°C abgekühlt und weitere 15 min inkubiert werden. In der Inkubationszeit konnten die magnetischen Streptavidin C1 DynaBeads vorbereitet werden. Der Stock wurde zunächst gevortext, und 50 µl zusammen mit je 25 µl pro Probe konnten in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Das Reaktionsgefäß wurde auf einen magnetischen Ständer gestellt, die Beads dreimal mit je 150 µl Binde-/Waschpuffer gewaschen und der Überstand jeweils verworfen. Im Folgenden wurden die Beads in Puffer resuspendiert. Je 20 µl der Lösung wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und zusammen mit den Proben 15 min bei 37°C und 1000 rpm inkubiert. Anschließend konnten die Reaktionsgefäße wieder auf den magnetischen Ständer gestellt und der Überstand in ein neues Gefäß überführt werden. Die gereinigten Proben wurden mit 60 µl ddH₂O aufgefüllt und mit 2 µl GlycoBlue™, 10 µl 5 M NaCl und 150 µl Isopropanol gefällt.

2.7.2.15 Zyklus-Anpassung der PCR

Bevor die Proben mit Hilfe der finalen PCR präparativ amplifiziert werden, wird eine Test-PCR, welche der Anpassung der Zyklenanzahl dient, durchgeführt.

Die resuspendierten und in 20 µl ddH₂O aufgenommenen Proben wurden zusammen mit einer Negativkontrolle und eine Wasserkontrolle angesetzt (Tabelle 2-26). Getestet wurden 20, 16 und 12 PCR-Zyklen.

Tabelle 2-26: Komponenten und Parameter der Ribosome-Profiling PCR

Eingesetzte Menge	Komponente
1 µl	DNA-Template/Wasser
4 µl	5 x Q5 Puffer
0,4 µl	10 mM dNTPs
0,1 µl	100 µM Library Primer
0,1 µl	100 µM Index Primer
0,2 µl	Q5 Polymerase (2 U/µl)
14,2 µl	ddH ₂ O
20 µl	Gesamtvolumen

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98°C	30 s	
Zyklische Denaturierung	98°C	10 s	20, 16, 12 x
Zyklische Primerhybridisierung	65°C	10 s	
Zyklische Elongation	72°C	5 s	
Finale Elongation	72°C	30 s	

Nach der PCR wurden die Proben auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Anhand der Banden kann nun entschieden werden, welche Zyklenanzahl für die finale PCR gewählt wird.

2.7.2.16 Finale PCR-Amplifikation

Die finale PCR dient der Amplifikation der Proben für die Sequenzierung.

Verwendet wurden die gleichen Komponenten wie bei der Test-PCR (2.7.2.15), jedoch pro Probe in der 4 x Menge. Es war darauf zu achten, dass für jede Probe ein anderer

Indexprimer verwendet werden musste, um diese nach der Sequenzierung unterscheiden zu können.

2.7.2.17 Größenselektion 4

Zur Selektion der finalen Produkte wurde eine vierte Gelextraktion durchgeführt.

Für die abschließende Größenselektion wurden die Proben zunächst mit äquivalenter Menge FA-Puffer gemischt und anschließend zusammen mit den Markern sowie der Negativkontrolle auf 6 %igen PAA-Gele aufgetrennt. Die Nukleinsäuren im erwarteten Größenbereich wurden ausgeschnitten und zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Herauslösen aus dem Gel erfolgte in 1 ml DNA-Extraktionspuffer bei RT und 1000 rpm auf einem Schüttler. Am nächsten Tag erfolgte die Fällung des Überstands mit 1 µl GlycoBlue™ und 1 ml Isopropanol bei -20°C.

2.7.2.18 Kontrolle mit Hilfe des Bioanalyzers

Um vor dem Einsenden der Proben zur Sequenzierung sicherzustellen, dass die erzeugten Produkte die richtige Länge aufweisen, werden alle Proben mit Hilfe eines Bioanalyzers kontrolliert.

Dafür wurden die Proben präzipitiert, in 20 µl ddH₂O resuspendiert und der „High Sensitivity DNA Assays“ von Agilent nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.7.2.19 Sequenzierung der Proben

Die Sequenzierung der Proben des Ribosome Profiling erfolgte durch die Firma BGI (Hongkong).

Es wurden nach Herstellerangaben 20 µl pro Probe in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß versendet. Die Konzentration betrug über 5,2 nM.

2.7.2.20 Analyse der Daten

Die bioinformatische Auswertung der Daten erfolgte maßgeblich durch J. Bathke in der AG Goesmann (Giessen) und durch A. Michel in der AG Baranov (Cork). Zudem wurden eigene Analysen mit dem Programm Trips-Viz durchgeführt [258]. Eine Zusammenfassung der Durchführung der bioinformatischen Auswertung ist der Veröffentlichung Gerresheim *et al.* zu entnehmen [259].

3 Ergebnisse

3.1 Produktion des HCV-Jc1 in Zellkultur

Die 2006 von Pietschmann *et al.* entwickelte HCV-Chimäre Jc1 produziert 100- bis 1000-fach höhere virale Titer in der Zellkultur als die ursprünglichen Genotyp 2 Isolate J6 und JFH1 [257]. Da verschiedene Experimente mit vollständigen HCV-Genomen beziehungsweise infektiösen Partikeln durchgeführt werden sollten, musste zunächst die Produktion von Jc1 in der Arbeitsgruppe etabliert werden.

3.1.1 Herstellung des viralen Genoms

Zunächst wurde das Jc1-Plasmid in Bakterien vermehrt und mit Hilfe einer Plasmid-Präparation gereinigt (2.2.3, 2.5.2.6). Zur Kontrolle des Plasmides wurde ein Testverdau mit *EcoRV* und *SbfI* durchgeführt (2.5.2.3), wobei die erwarteten DNA-Fragmente mit einer Größe von 9,3 und 3,7 kbp entstanden (Abbildung 3-1). Vor der *in vitro* Transkription wurde das Plasmid mit *MluI* linearisiert, um ein möglichst präzises Ende des viralen Genoms zu erzeugen und ein Fortlaufen der T7-Polymerase über den Terminator hinaus zu verhindern (Plasmidkarte im Kapitel 6.3).

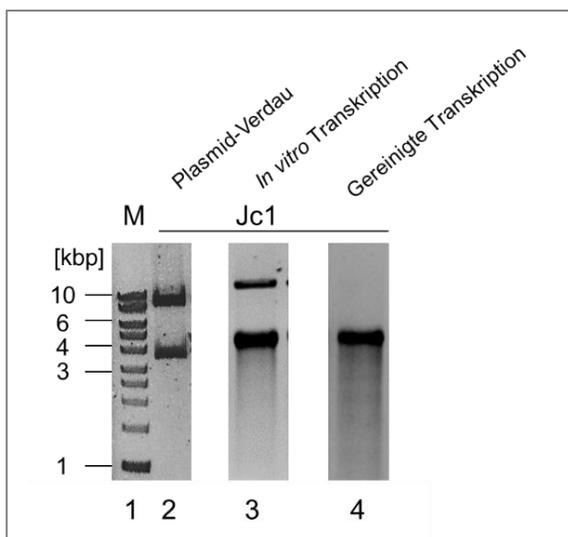


Abbildung 3-1: Schritte bei der Produktion des HCV-Genoms. Die verwendeten Jc1-Plasmide wurden zunächst mit einem Testverdau untersucht (2). Anhand des aufgetragenen Markers (1, M, Hyperladder I) konnten so die erwarteten Banden bei 9,3 und 3,7 Kilobasenpaaren (kbp) detektiert werden. Nach der *in vitro* Transkription (3) und nach dem Template-Verdau mit DNaseI sowie der Reinigung der RNA (4) wurde die Integrität des viralen Genoms mit Kontrollgelen untersucht. Es ist zu beachten, dass ein DNA-Marker verwendet wurde, weshalb die einzelsträngige RNA mit einer Größe von ca. 9,7 kb zwischen 5 und 4 kbp auf dem 0,8 %igen Agarosegel läuft.

Die *in vitro* Transkription kürzerer RNAs war im Labor der AG Niepmann bereits gut etabliert. Die dafür verwendeten und vom Hersteller empfohlene Konzentration von 500 μ M rNTPs und 6 mM $MgCl_2$ sowie eine Inkubationszeit von 2 h ergaben jedoch für das ~9,7 kb große Jc1-Genom nur geringe RNA-Konzentrationen. Dies erforderte eine Überarbeitung

des bestehenden Protokolls für die Transkription der HCV-Genome mit voller Länge. Verschiedene rNTP-Konzentrationen, Template-Mengen, Temperaturen, Inkubationszeiten und MgCl_2 -Konzentrationen (6 – 11 mM) wurden miteinander verglichen. Die besten Ergebnisse konnten schließlich mit Endkonzentrationen von 3,75 mM rNTPs, 11 mM MgCl_2 und 25 $\mu\text{g/ml}$ Template erzielt werden. Die Inkubation erfolgte von da an über 5 h bei 37°C , wobei nach 2 h zusätzlich 0,5 U/ μl T7-Polymerase hinzugefügt wurde (2.5.3.1). Mit Hilfe von Agarose-Kontrollgelen wurde sowohl die RNA aus der Transkriptionsreaktion als auch die mit DNaseI behandelte und gereinigte RNA auf ihre Integrität kontrolliert (Abbildung 3-1). Nach erfolgreicher Reinigung der transkribierten RNA (2.5.3.3) konnte die Konzentration mit dem Qubit® bestimmt und die viralen Genome zur Transfektion verwendet werden (2.5.1.1, 2.3.5).

Fazit: Der Einsatz von größeren Mengen an rNTPs (3,75 mM) und MgCl_2 (11 mM) in den Transkriptionsansätzen im Vergleich zu den Herstellerangaben sowie eine verlängerte Inkubationszeit über fünf Stunden erhöhten die Ausbeute der vollständigen Jc1-RNA um ein Vielfaches, sodass diese für die folgenden Experimente verwendet werden konnte.

3.1.2 Nachweis der HCV-Replikation

Bevor die geplanten Experimente durchgeführt werden konnten, musste zunächst überprüft werden, ob die verwendeten Protokolle für die Transfektion beziehungsweise Infektion zu einer Produktion des HCV führten. Hierfür wurden Western Blot Analysen, Fluoreszenzmikroskopie sowie die RT-qPCR eingesetzt.

Die erste verwendete Methode war der Nachweis von viralen Proteinen mittels Western Blot (2.6.2). Die Zellen wurden hierfür mit Jc1 transfiziert und anschließend zur Probenentnahme zu verschiedenen Zeitpunkten lysiert (2.3.5). Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine NS3, Core, und als Kontrolle die zelluläre Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zunächst mit primären Antikörpern (AK) spezifisch gebunden und anschließend mit sekundären, an eine Meerrettichperoxidase-gekoppelten, AK über Chemilumineszenz detektiert (2.6.2). Bei erfolgreicher Produktion der viralen Proteine konnte NS3 bei 70 kDa und Core bei 21 kDa detektiert werden (Abbildung 3-2). Als Negativkontrolle wurde eine nicht-transfizierte Probe mitgeführt. Für die interne Versuchskontrolle wurde das zelluläre und konstitutiv exprimierte GAPDH (37 kDa) nachgewiesen.

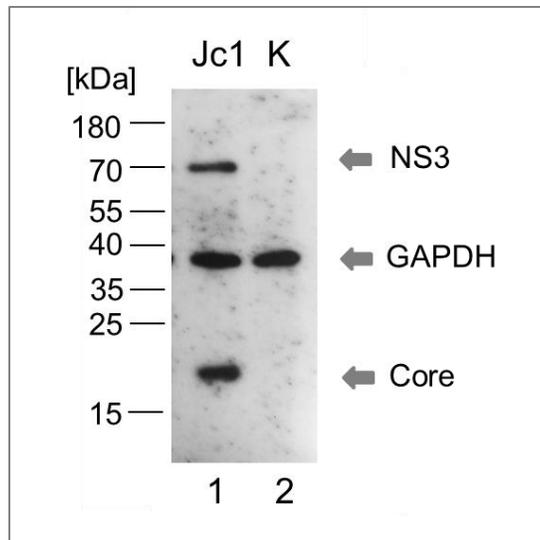


Abbildung 3-2: Western Blot zur Kontrolle der Expression viraler Proteine. Huh-7.5-Zellen wurden mit HCV-Jc1-RNA-Genomen transfiziert, inkubiert und die Proteine NS3, GAPDH und Core immunochemisch detektiert (1). Als Negativkontrolle wurde eine nicht-transfizierte Probe (K) mitgeführt (2).

Da es sich bei HCV um kein lytisches Virus handelt, waren Plaque-Analysen für die Bestimmung des prozentualen Anteils an HCV-infizierten Zellen nicht anwendbar, daher musste die zweite Methode, die Fluoreszenzmikroskopie (2.6.1), für Experimente wie das Ribosome Profiling etabliert werden. Es wurden zunächst die Zellen auf Deckgläschen ausgesät, inkubiert und nach 24 – 144 h mit 4 % PFA fixiert, so dass sichergestellt werden konnte, dass HCV exprimierende Proben nicht mehr infektiös waren. Für eine leichtere Quantifizierung und Begutachtung der Zellen ist die DNA mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt worden, welches im blauen Bereich bei einem Emissionsmaximum von 461 nm fluoresziert.

In der Abbildung 3-3 sind beispielhaft 70 % und 100 % konfluente Huh-7.5-Zellen im Durchlicht und im blauen Fluoreszenzkanal gezeigt. Es konnte außerdem kontrolliert werden, in welchem Zustand sich die Zellen befanden. Einige der Zellen waren im Stadium der Mitose, wodurch sie eine eher abgerundete Morphologie und kondensierte Chromosomen aufwiesen. Zellen der Interphase waren oftmals polygonal ausgestreckt, wie es typisch für Epithelzellen ist. Apoptotische Zellen konnten teils anhand ihres fragmentierten Zellkerns identifiziert werden.

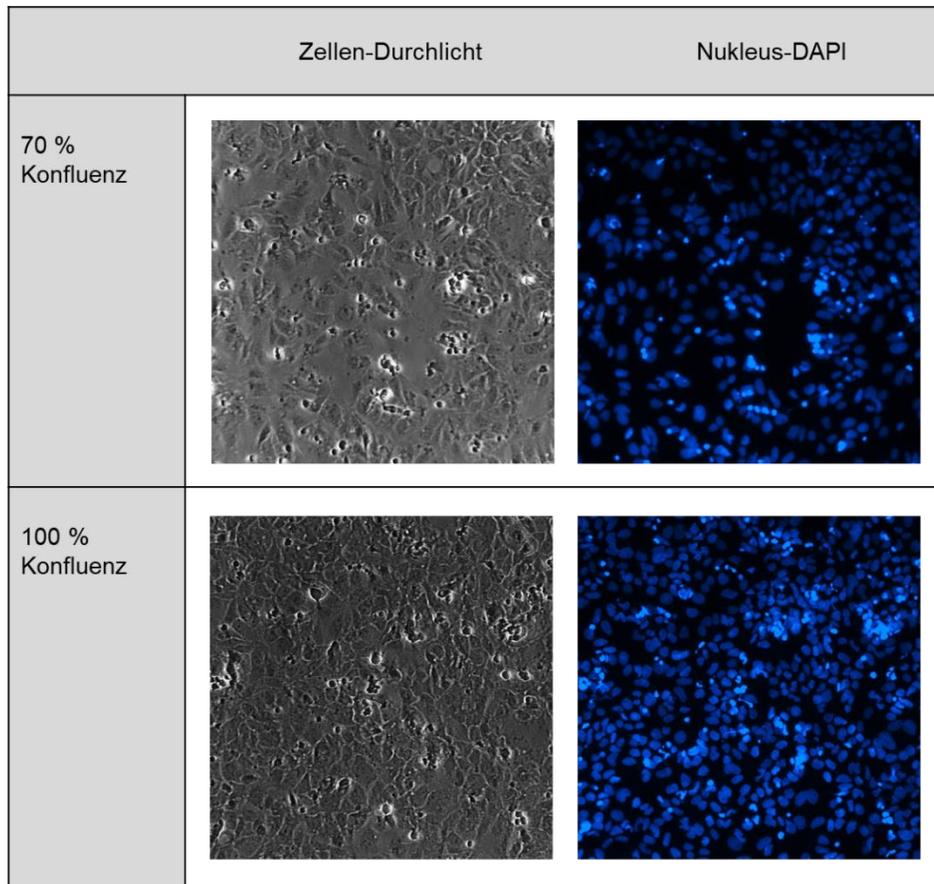


Abbildung 3-3: Kontrolle des Zellwachstums mittels Fluoreszenzmikroskopie. Zur Bestimmung der Konfluenz wurden die Huh-7.5-Zellen zunächst im Durchlicht beobachtet. Die DAPI-Färbung der DNA erleichterte die Quantifizierung der Zellen sowie das Abschätzen des zellulären Gesundheitszustands.

Das virale NS3-Protein wurde spezifisch mit dem primären AK gebunden. Der sekundäre AK ist mit Alexa Fluor® 488 gekoppelt, welcher im grünen Spektrum mit einem Emissionsmaximum von 519 nm fluoresziert. Vor den eigentlichen Experimenten konnte mit Hilfe der Mikroskopie überprüft werden, zu welchem Zeitpunkt nach der Transfektion 80 – 100 % der Zellen mit HCV infiziert waren. Eine nicht-transfizierte Kontrolle wurde stets zur Abschätzung und Überprüfung des Hintergrundes mitgeführt (Abbildung 3-4, obere Zeile). NS3-Signale zeigten im Vergleich zu Hintergrundsignalen eine feine, punktförmige Verteilung über das gesamte Zytoplasma einer infizierten Zelle (Zeile 2 und 3). Einen Tag nach der Transfektion (Elektroporation, 0,133 µg RNA pro Well einer 12 Well) konnten nahezu keine Zellen detektiert werden, welche ausreichend NS3 produzierten, um die Proteine sichtbar vom Hintergrund abzuheben (nicht gezeigt). Nach zwei Tagen zeigten sich

erste deutliche NS3-Signale in den Zellen, und nach sechs Tagen waren nahezu alle Zellen infiziert. Zudem schien es, dass die Zellen auch noch sechs Tage nach Transfektion bei guter Gesundheit waren, was unter anderem anhand ihrer polygonalen Erscheinung und der Anzahl an mitotischen Zellen festgestellt wurde.

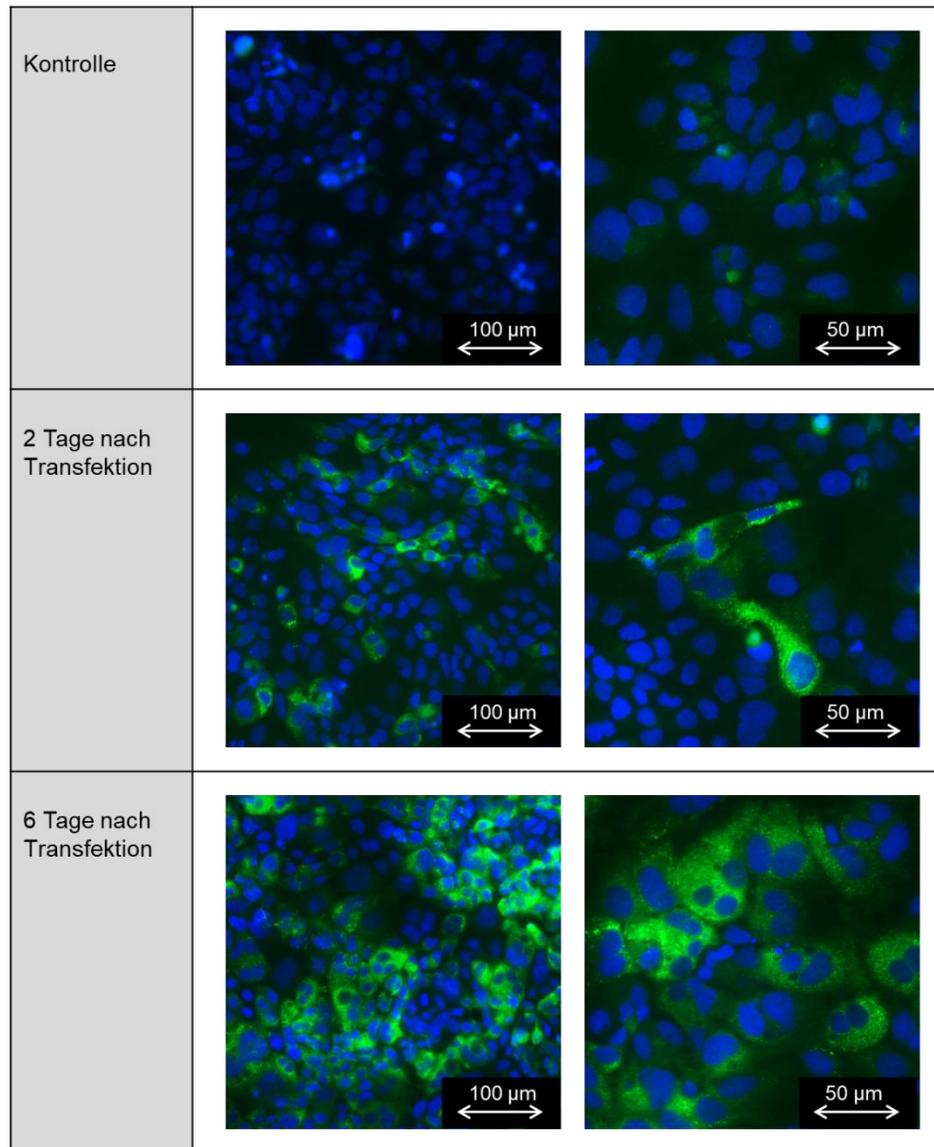


Abbildung 3-4: Nachweis der Infektion mit HCV. Zwei und sechs Tage nach der Transfektion der Huh-7.5-Zellen (Elektroporation, 0,133 µg RNA pro Well einer 12 Well-Platte) wurden diese fixiert und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. NS3 wurde mit Antikörpern markiert (grün). Zur Kontrolle wurde eine nicht-transfizierte Probe mitgeführt (obere Zeile).

Die RT-qPCR, welche als dritte Methode zum Einsatz kam, wurde maßgeblich von Lyudmila Shalamova in der AG Niepmann etabliert und ermöglicht zusätzlich zum Nachweis gebildeter viraler Proteine die Kontrolle der Menge an gebildeter HCV-RNA (2.7.1). Dies war besonders für den quantitativen Vergleich zwischen verschiedenen Proben von besonderer Bedeutung.

Fazit: Die Jc1-HCV-Produktion in der Zellkultur konnte erfolgreich mit Hilfe des Western Blots, der Fluoreszenzmikroskopie und der RT-qPCR nachgewiesen werden. Im Folgenden dienten diese Methoden zur Kontrolle sämtlicher Experimente. Quantitativ zufriedenstellende HCV-Replikation in den Huh-7.5-Zellen wurde erst am Tag 6 nach Transfektion festgestellt.

3.2 Die miR-122-Bindung an das HCV-Genom

In vorangegangenen Studien konnte bereits der große Einfluss der miR-122 auf die Replikation des HCV gezeigt werden (1.3.1.1). Die Bindung des miRNP-Komplexes an die 5'UTR des viralen Genoms sorgt für eine Stabilisierung der RNA und schützt sie vor XRN1-Degradierung. Ebenso führt sie zu einer deutlichen Stimulation der Translation [193,199,33–36]. Die miR-122 bindet zusammen mit Ago2 zudem an konservierte Bindungsstellen in der NS5B-codierenden Region und der 3'UTR von HCV [190,191,195]. Naseri *et al.* postulierten im Jahr 2011 einen inhibitorischen Effekt auf die Replikation und Translation von HCV-Luziferase-Replikons, durch die miR-Bindung an 5B.2 [206]. Im Rahmen der Dissertation von Nadia Dünnes konnte in der AG Niepmann mittels Co-Immunopräzipitation gezeigt werden, dass die Bindung an 5B.2, 5B.3 und S3 abhängig von der Zugänglichkeit der RNA, der Sekundärstruktur und dem HCV-Genotyp ist. Experimente mit Reporter-Konstrukten zeigten, dass es durch die Bindung der miR-122 an die 3'UTR, in Kombination mit der Anlagerung an die 5'UTR, zu einer Reduktion der Translation kommt [194].

Da die Auswirkungen der Interaktion zwischen dem miRNP und den Bindungsstellen in der NS5B-codierenden Region und der 3'UTR im vollständigen HCV-Replikationszyklus bisher nicht bekannt waren, sollte dies im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden.

3.2.1 Mutagenese der miR-122-Bindungsstellen S1, S2, 5B.2, 5B.3 und S3

Die fünf hoch konservierten miR-122-Bindungsstellen im vollständigen HCV-Genom sollten bezüglich ihres Einflusses auf den viralen Replikationszyklus untersucht werden. Je zwei Nukleotide in der *seed*-Sequenz sollten hierfür unterschiedlich mutiert werden. Dadurch wurde zum einen sichergestellt, dass die miR-122 nicht mehr an die Stelle bindet, und zum anderen ergab sich die Möglichkeit, die mutierte Stelle mit der jeweils kompensierend mutierten miR einzeln zu adressieren (Tabelle 3-1).

Die Mutationen in den Bindungsstellen der NS5B-codierenden Region konnten von Nadia Dünnes in die Plasmide pUC18_J6-JFH1_NS5B-3'-UTR_5B.2m und pUC18_J6-JFH1_NS5B-3'-UTR_5B.3m eingefügt werden (6.3), so dass sie durch eine Klonierung in pFK-JFH1-J6 C846_dg (Jc1) 12961 integriert werden konnten. Die Plasmide wurde mit *Ascl* und *SfiI* geschnitten und das 500 bp große Insert mit der jeweiligen Mutation in den Jc1 Vektor ligiert (2.1.8, 2.5.2.3 – 2.5.2.5).

Tabelle 3-1: Die miR-122 Bindungsstellen im HCV-Genom. Aufgelistet sind die fünf hoch konservierten Bindungsstellen mit ihren wildtypischen (Wt, schwarz) und mutierten (M, rot) Sequenzen.

Bindungsstelle	Wt-Sequenz	M-Sequenz
S1	ACACTCC	AGACTAC
S2	CACTCC	CTATCC
5B.2	ACACTCC	ACACAGC
5B.3	CACTCC	GACACC
S3	ACACTCC	ACTCTGC

S1m, S2m und S3m mussten mit Hilfe von Mutagenese-PCRs (*Overlap-Extension-PCR*) generiert werden (siehe 2.5.2.2). Eine Zusammenfassung der durchgeführten PCRs ist der Tabelle 3-2 zu entnehmen. Die Sequenzen der Primer sind im Abschnitt 2.1.9.3 aufgelistet.

Tabelle 3-2: Mutagenese PCRs zur Generierung von S1m, S2m und S3m. Sequenzen der Primer sind im Abschnitt 2.1.9.3 aufgelistet.

Mutation	PCR	Template und Primer	Produkt
S1m	1	pFK-Jc1 + S1S2-for + S1-mut-rev	1453 bp
	2	pFK-Jc1 + S1S2-rev + S1-mut-for	1448 bp
	3 Fusion	PCR1 + PCR2 + S1S2-for + S1S2-rev	2875 bp

S2m	4	pFK-Jc1 + S1S2-for + S2-mut-rev	1467 bp
	5	pFK-Jc1 + S1S2-rev + S2-mut-for	1431 bp
	6 Fusion	PCR4 + PCR5 + S1S2-for + S1S2-rev	2875 bp
S3m	7	pFK-Jc1 + S3-for + S3-mut-rev	564 bp
	8	pFK-Jc1 + S3-rev + S3-mut-for	597 bp
	9 Fusion	PCR7 + PCR8 + Sm3-for + Sm3-rev	1127 bp

Der Restriktionsverdau der Inserts und des Jc1-Vektors erfolgte mit *SbfI* und *BsWI* für S1m/S2m und mit *Ascl* und *MluI* für S3m (2.5.2.3). Ligiert wurden die so gebildeten Fragmente bei 14°C über Nacht (2.5.2.5).

Fazit: Die fünf miR-122-Bindungsstellen S1, S2, 5B.2, 5B.3 und S3 konnten erfolgreich individuell in HCV-Jc1-Plasmiden mutiert und für die im Folgenden beschriebenen Experimente eingesetzt werden.

3.2.2 Analyse der Funktion der miR-122-Bindungsstellen im HCV-Genom

Die neu generierten Plasmide wurden zunächst in HCV-Genome transkribiert (2.5.3.1). Um die Qualität der generierten RNA zu überprüfen wurden Kontrollgele angefertigt (siehe Beispiel in Abbildung 3-5). Mit allen Konstrukten konnte RNA generiert werden, welche anschließend transfiziert wurden.

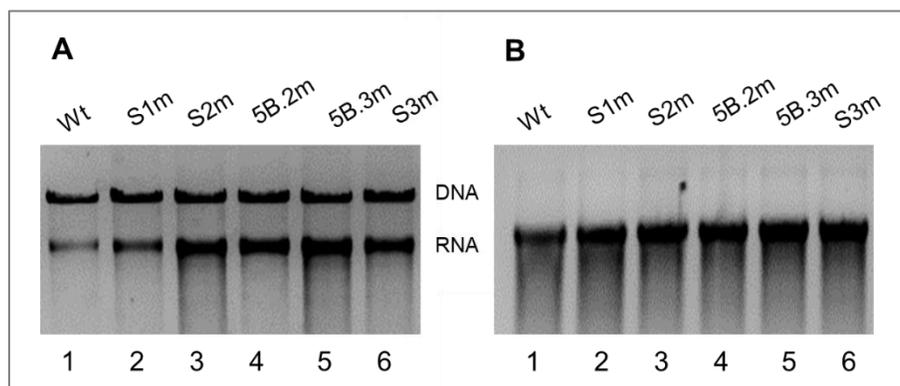


Abbildung 3-5: Transkription der generierten HCV-Genome. Dargestellt sind der Wildtyp (Wt, 1) sowie die miR-122-Bindungsstellen-Mutanten (2 – 6) nach der Transkription (A) und nach der Reinigung der RNA (B) auf einem 0,8 %igen Agarosegel.

Die HCV-RNA wurde mittels Lipofektamine 2000 oder Elektroporation in die Huh-7.5-Zellen eingebracht, wobei eine Elektroporation erfolgte, wenn ein synchrones Einbringen der RNA in die Zellen gewünscht war (2.3.5). Eine nicht-transfizierte Probe wurde stets als Negativkontrolle mitgeführt. Nach 48 und 72 h erfolgte die Lyse der Proben und die Untersuchung mit Western Blot Analysen (2.6.2).

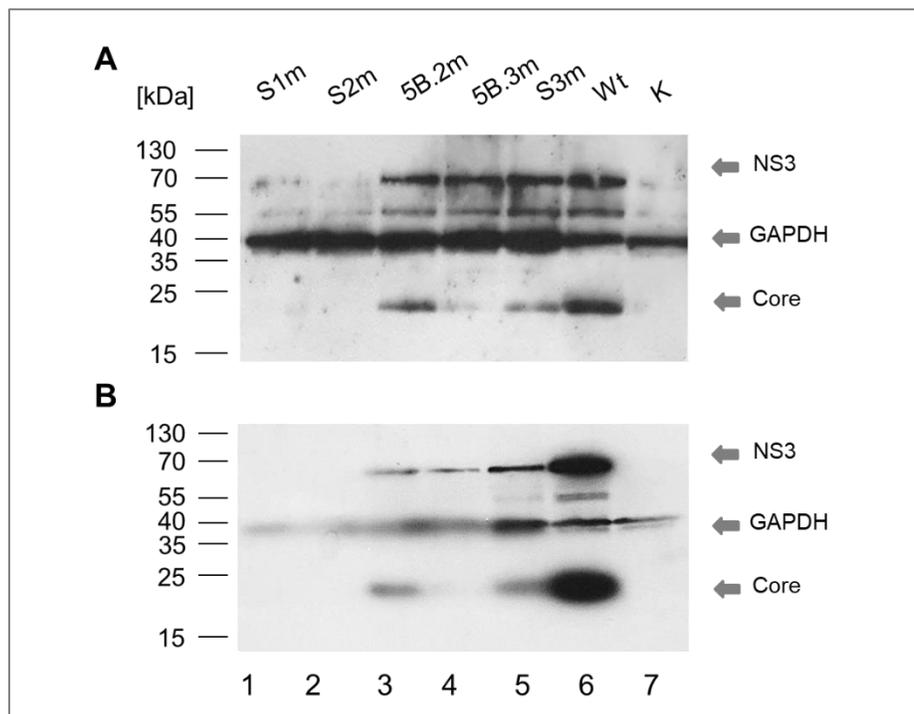


Abbildung 3-6: Western Blot des HCV mit mutierten miR-Bindungsstellen. Huh-7.5-Zellen wurden mit HCV-Genomen der vollen Länge transfiziert und die Proteine NS3, GAPDH und Core biochemisch detektiert (1 – 6). Die Bindungsstellen in der 5'UTR (S1, S2), der NS5B-codierenden Region (5B.2, 5B.3) und der 3'UTR (S3) sind einzeln im HCV-Genom mutiert. Als Positivkontrolle wurde der Wildtyp (Wt) eingesetzt. Es wurde zudem eine nicht-transfizierte Kontrolle (K) mitgeführt (7). Die Inkubation der Zellen erfolgte über (A) 2 und (B) 3 Tage.

In Abbildung 3-6 ist zu erkennen, dass bei den eingesetzten S1- und S2-Mutanten (1 und 2) sowohl nach zwei (A) als auch nach drei (B) Tagen keine detektierbaren Mengen an viralen NS3- und Core-Proteinen nachgewiesen werden konnten. Dies traf auch auf die Kontrollprobe zu (7). Für die Bindungsstellen-Mutanten in der NS5B-codierenden Region sowie der 3'UTR konnten nach zwei Tagen untereinander vergleichbare Mengen an viralen Proteinen detektiert werden (3 – 5). Der Wt (6) zeigte nach 48 h etwas stärkere Banden auf dem Blot und nach 72 h deutlich höhere Konzentrationen an viralen Proteinen als die getesteten Mutanten.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Huh-7.5-Zellen direkt auf Deckgläschen ausgesät und 48 h nach Transfektion mit PFA fixiert. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt und virale NS3-Proteine mit dem primären NS3-AK und dem sekundären Alexa Fluor® 488 (2.6.1).

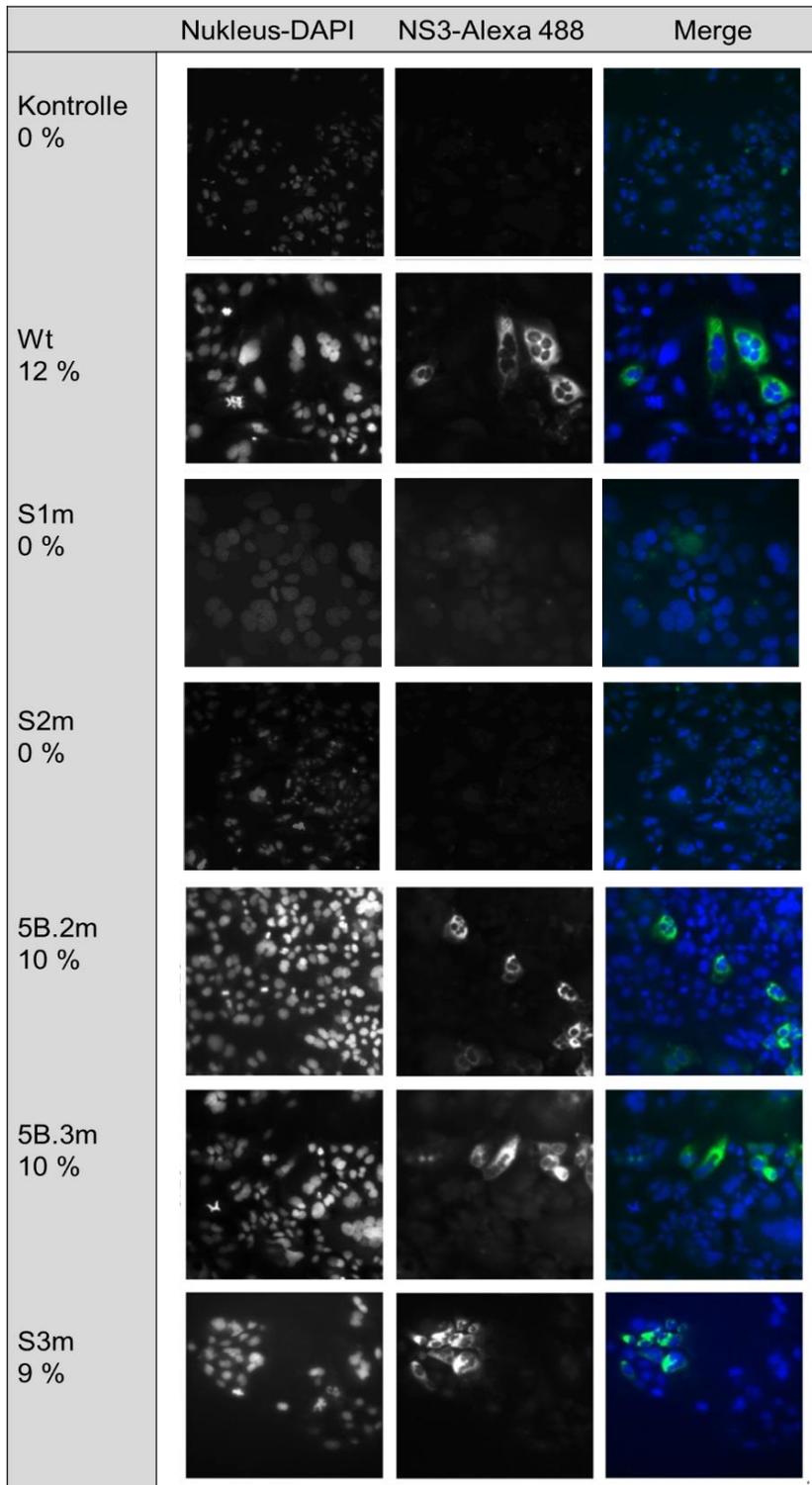


Abbildung 3-7: Fluoreszenzaufnahmen des HCV mit mutierten miR-Bindungsstellen. Dargestellt ist die Fluoreszenzaufnahme zwei Tage nach der Transfektion. Zur Kontrolle wurde eine nicht-transfizierte Probe mitgeführt (obere Zeile), sowie der Wildtyp (Wt). Die Anzahl an infizierten Zellen wurde ausgezählt (mindestens 100 Zellen pro Probe) und die Ergebnisse der Experimente gemittelt (Prozentangabe). Die Fluoreszenzkanäle sind einzeln in Graustufen dargestellt, das Kombinationsbild (Merge) in Farbe (DAPI-Färbung in blau, NS3/sekundärer Alexa Fluor® 488 Antikörpern in grün).

Die Anzahl an infizierten Zellen wurde ausgezählt (mindestens 100 Zellen pro Probe) und die Ergebnisse der Experimente gemittelt. Das Ergebnis der Zählung, sowie Beispiele von Aufnahmen der Proben, sind in der Abbildung 3-7 dargestellt. In den nicht-transfizierten Proben (erste Zeile) konnten ebenso wie bei den mutierten Bindestellen S1 und S2 im HCV-Genom (Zeile 3 und 4) keine infizierten Zellen detektiert werden. 2 Tage nach Transfektion waren 12 % der mit dem Wt transfizierte Zellen NS3 positiv (Zeile 2), welches die größte gezählte Menge an HCV-produzierenden Zellen darstellt. Die beiden miR-Bindungsstellen-Mutanten in der NS5B-codierenden Region (Zeile 5 und 6) erreichten jeweils 10 % infizierter Zellen, knapp gefolgt von der S3-Mutante mit 9 % (Zeile 7).

Um mögliche Effekte zu verstärken und gezielter die kaum charakterisierten Bindungsstellen 5B.2, 5B.3 und S3 zu untersuchen, wurde eine Doppelmutante (5B.2/3m) und eine Dreifachmutante (5B.2/3/S3m) generiert. Als Vektor für die Doppelmutante 5B.2/3m diente pFK-Jc1-5B.2m und als Insert pFK-Jc1-5B.3m, jeweils mit *EcoRV* und *MluI* geschnitten und ligiert. In die so entstandene Doppelmutante wurde durch den Verdau mit *AscI* und *MluI* und anschließender Ligation die mutierte Bindungsstelle S3m eingefügt (2.5.2.3 – 2.5.2.5), wodurch die Dreifachmutante entstand. Mit diesen Mutanten wurden zusätzliche Western Blots und RT-qPCR Experimente durchgeführt.

In der Abbildung 3-8 ist exemplarisch ein Western Blot (2.6.2) der Proben nach drei (A) und fünf (B) Tagen gezeigt. Die Zeitpunkte für die Zelllyse wurden gewählt, um einen größeren Unterschied zwischen den Proben zu detektieren. Neben den miR-Bindungsstellen-Mutanten wurden eine nicht-transfizierte Kontrolle (1) und der Wt (2) mitgeführt. Zusammen mit dem Wt konnte ein anti-miR-122-LNA transfiziert werden, welches die miR-122 sehr stark bindet und somit für HCV unzugänglich macht (3). Wie zu erkennen ist, sorgte dies für eine starke Unterdrückung der Replikation des HCV-Wt, so dass virale Proteine nicht länger detektiert werden konnten. Nach drei Tagen schien der Wt etwas stärker zu replizieren als die Mutanten, wobei 5B.2m und 3m im Vergleich zu den anderen getesteten Jc1-Mutanten die geringsten Mengen an NS3- und Core-Proteinen aufwiesen (4 und 5). Nach 5 Tagen waren die Signale der detektierten viralen Proteine von der Doppelmutante 5B2/3m am stärksten (7), wobei auch alle weiteren Konstrukte deutliche Banden aufwiesen.

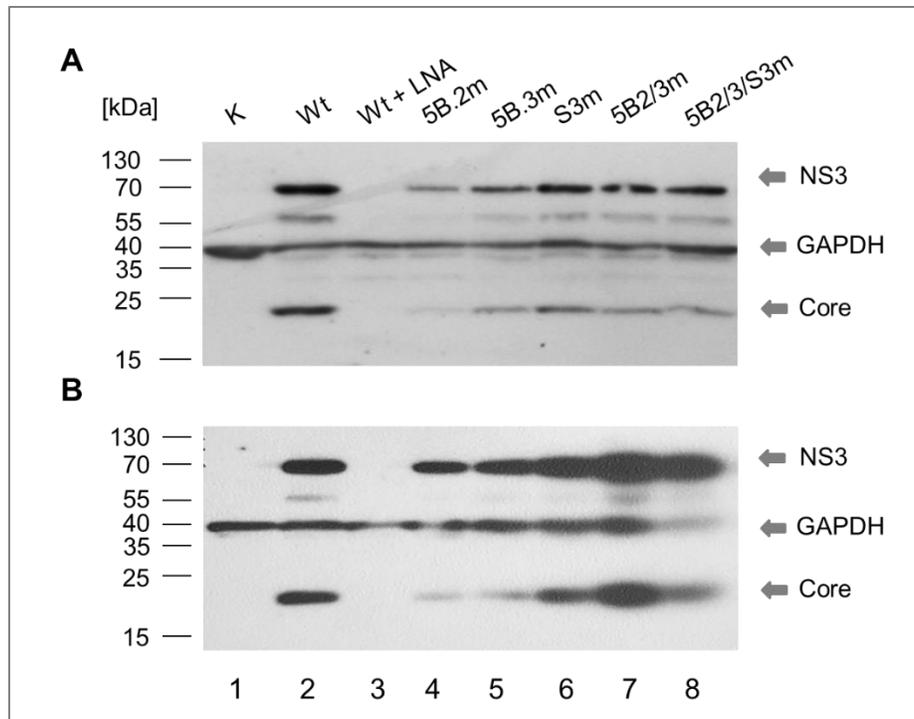


Abbildung 3-8: Western Blot des HCV mit mutierten miR-Bindungsstellen in der NS5B-codierenden Region und der 3'UTR. Huh-7.5-Zellen wurden mit HCV-Genomen transfiziert und die Proteine NS3, GAPDH und Core biochemisch detektiert (2 – 8). Die Bindungsstellen in der NS5B-codierenden Region (5B.2m, 5B.3m) und der 3'UTR (S3m) sind einzeln mutiert, oder liegen als Doppelmutante (5B.2/3m) und Dreifachmutante (5B.2/3/S3m) vor. Als Kontrollen wurden eine nicht-transfizierte Probe (K, 1), der Wildtyp (Wt, 2) und der Wt zusammen mit einem anti-miR-122-LNA (engl. *locked nucleic acid*, 3) eingesetzt. Die Inkubation der Zellen nach der Transfektion erfolgte über (A) drei und (B) fünf Tage.

Drei Tage nach der Transfektion wurden RT-qPCR Experimente durchgeführt, um die Mengen an HCV-Genomen in den Zellen zu bestimmen und miteinander zu vergleichen (2.3.5, 2.7.1). Wie in der Abbildung 3-9 zu sehen ist, entsprachen die relativen Mengen der HCV RNA-Genome im Wesentlichen der Menge der in den Western Blots detektierten HCV-Protein (Abbildung 3-8). Für den Vergleich der relativen Änderung der Anzahl an HCV-Genom wird der Wt auf eins gesetzt und das Verhältnis der anderen RNA-Proben daran gemessen. Bei der Probe, welche zusätzlich zum Wt das anti-miR-122-LNA enthält, konnte nahezu keine virale RNA in den Zellen detektiert werden (Balken 3). Die mitgeführte nicht-transfizierte Kontrolle war HCV-negativ (1, K). Im Vergleich zum Wt konnte bei der 5B.2-Mutante nur ca. die Hälfte an viraler RNA gemessen werden (Balken 4). Auch 5B.3m zeigte eine leicht reduzierte Anzahl an RNA (5). Keine messbaren Veränderungen in der Replikation zeigten S3m und die Dreifachmutante (Balken 6 und 7). Die Doppelmutante

hingegen produzierte durchschnittlich die 1,8-fache Anzahl an HCV-Genomen, wobei hier auch die größte Standardabweichung vorlag (Balken 7).

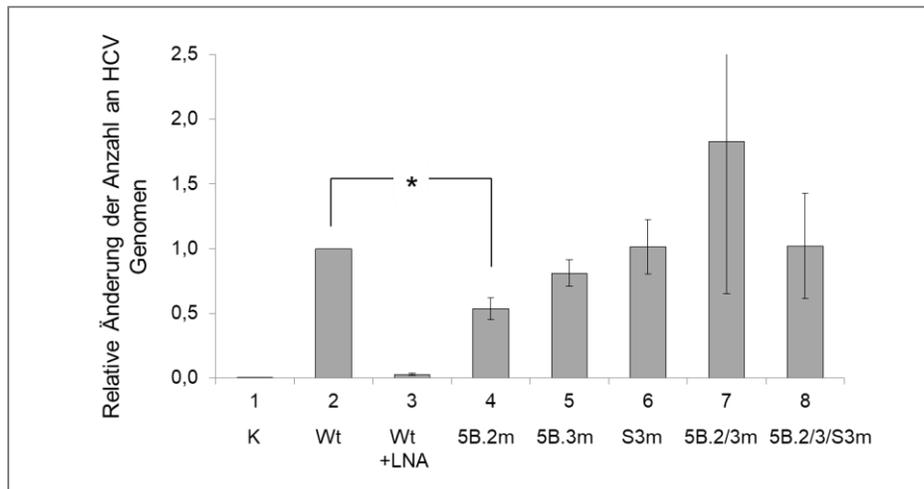


Abbildung 3-9: Vergleich der relativen Änderung der Anzahl an HCV Genomen gemessen mit RT-qPCR. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus min. n=3 unabhängigen, repräsentativen Experimenten. Analysiert wurden Huh-7.5-Zellen 3 Tage nach der Transfektion. Der Wildtyp (Wt) wurde als Positivkontrolle auf 1 gesetzt. Eine nicht-transfizierte Kontrolle (K) wurde mitgeführt. Die miR-122-Bindungsstellen-Mutanten (Balken 4 – 8) wurden im Verhältnis zum Wt dargestellt. Das Sternchen markiert einen signifikanten Unterschied zwischen den Proben.

Signifikant unterschieden sich daher nur der Wt und die 5B.2-Mutante (markiert mit Sternchen).

Fazit: Die fünf miR-122-Bindungsstellen S1, S2, 5B.2, 5B.3 und S3 konnten erfolgreich in HCV-Jc1-Plasmiden mutiert und die Auswirkungen auf die virale Replikation getestet werden. Insgesamt konnten mit Hilfe der durchgeführten Western Blots, RT-qPCRs und Immunofluoreszenz-Studien zumeist nur leichte Unterschiede zwischen dem Wt und den 5B.2-, 5B.3-, S3-, den Doppel- und Dreifach-Mutanten detektiert werden. Im Vergleich zeigte ausschließlich die Mutation der 5B.2 miR-122-Bindungsstelle einen signifikant negativen Effekt auf den Replikationszyklus des HCV. Lag hingegen eine Mutation in S1 oder S2 vor, konnte HCV nicht weiter replizieren.

3.3 Einfluss der HCV-Infektion auf die zelluläre Genexpression

Hauptaugenmerk dieser Arbeit war die Untersuchung der Interaktion des HCV mit der infizierten Leberzelle. Die Wirkung des Virus auf die Regulation der zellulären Genexpression und vor allem auf die translationellen Veränderungen wurde bis zum Zeitpunkt der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht im Detail untersucht. Deshalb sollten mit Hilfe der von Ingolia *et al.* entwickelten Methode des Ribosome Profiling genauere Analysen durchgeführt werden (2.7.2) [260]. Das Profiling ermöglicht eine Momentaufnahme aller *in vivo* translatierenden Ribosomen in der Zelle, durch Sequenzierung der von Ribosomen geschützten RNA-Fragmente (RFs). Neben den möglichen translationellen Veränderungen in den Zellen sollten auch die transkriptionellen erfasst werden, weswegen ebenfalls die gesamte RNA (TR) sequenziert werden sollte. Zwei Sets an Experimenten wurden durchgeführt und sequenziert, wobei der erste Durchlauf zwei Replikate (3.3.1) und der zweite drei Replikate (3.3.2) umfasste. Eine kurze Zusammenfassung ist in der Tabelle 3-3 dargestellt.

Tabelle 3-3: Zusammenfassung der Ribosome Profiling Experimente: Zwei Durchläufe mit jeweils zwei bzw. drei Replikaten wurden durchgeführt um die Bibliotheken der gesamten RNA (TR) und von Ribosomen geschützten RNA-Fragmente (RF) zu erstellen.

Durchlauf/ Set	Replikate/ Experimente	Transfektion	TR und RF Bibliotheken	Zeitliche Abfolge
1	2	Lipofektamine 2000 (miR) und Elektroporation (HCV)	Bibliotheken mit verschiedenen Methoden erstellt	Replikate hintereinander durchgeführt
2	3	Lipofektamine 2000	Gleiche Behandlung beider Bibliotheken	Replikate gleichzeitig durchgeführt

In beiden Fällen wurden Huh-7.5-Zellen mit vollständiger Jc1-HCV-RNA transfiziert und sechs Tage inkubiert. Diese Zeitspanne erlaubt es dem Virus mehrere Replikationszyklen zu durchlaufen und so nicht nur alle Zellen zu infizieren, sondern zudem eine chronische Infektion zu mimikrieren. Auf die Ergebnisse soll im Folgenden näher eingegangen werden.

3.3.1 Der erste Ribosome Profiling Durchlauf

Die ersten zwei sequenzierten Replikate des ersten Durchlaufs vom Ribosome Profiling basierten auf zwei vollständig unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, welche in einem Abstand von drei Monaten angefertigt wurden. Es wurde für jedes Experiment neue HCV-RNA generiert und neue Huh-7.5-Zellen verwendet, die separat weiterbearbeitet wurden. Je vier verschiedene Proben (miR-122, miR-122 + HCV, anti-miR-122-LNA und anti-miR-122-LNA + HCV) wurden bearbeitet. Beide Experimente sollen nachfolgend parallel behandelt werden, wobei zunächst auf die Durchführung und anschließend kurz auf die Auswertung der Daten eingegangen wird.

Die Huh-7.5-Zellen wurden zunächst mittels Lipofektamine 2000 (miR-122/anti-miR-122-LNA) und Elektroporation (HCV) transfiziert (2.7.2.1). Für die Generierung der TR-Proben wurden die Zellen nach sechs Tagen mit TRIzol™ LS lysiert, über RNeasy®-Säulen gereinigt und von Pan Hu in der AG Niepmann weiterbearbeitet. Die Lyse der Zellen für die RFs erfolgte mit Polysomen Lysepuffer und frischem Cycloheximid, welches die Ribosomen durch Blockieren der Translations-Elongation an der RNA fixiert. Der Verdau der nicht von Ribosomen geschützten RNA und die Ultrazentrifugation der Sucrosegradienten zur Anreicherung der 80S-Ribosomen folgten (2.7.2.2 – 2.7.2.5). Die Gradienten wurden anschließend fraktioniert und bei 260 nm im Microplate Reader gemessen. Dadurch konnten die 80S-Ribosomenpeak-beinhaltenen Fraktionen bestimmt und die Fixierung der Ribosomen auf der RNA durch das eingesetzte Cycloheximid überprüft werden.

Die gemessenen Gradientenprofile der ersten zwei sequenzierten Replikate sind in der Abbildung 3-10 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass in den Fraktionen 14 – 17 beider Replikate der 80S-Peak am prominentesten ausgeprägt war. Die Fraktionen mit den höchsten Werten wurden weiterbearbeitet, der Rest verworfen.

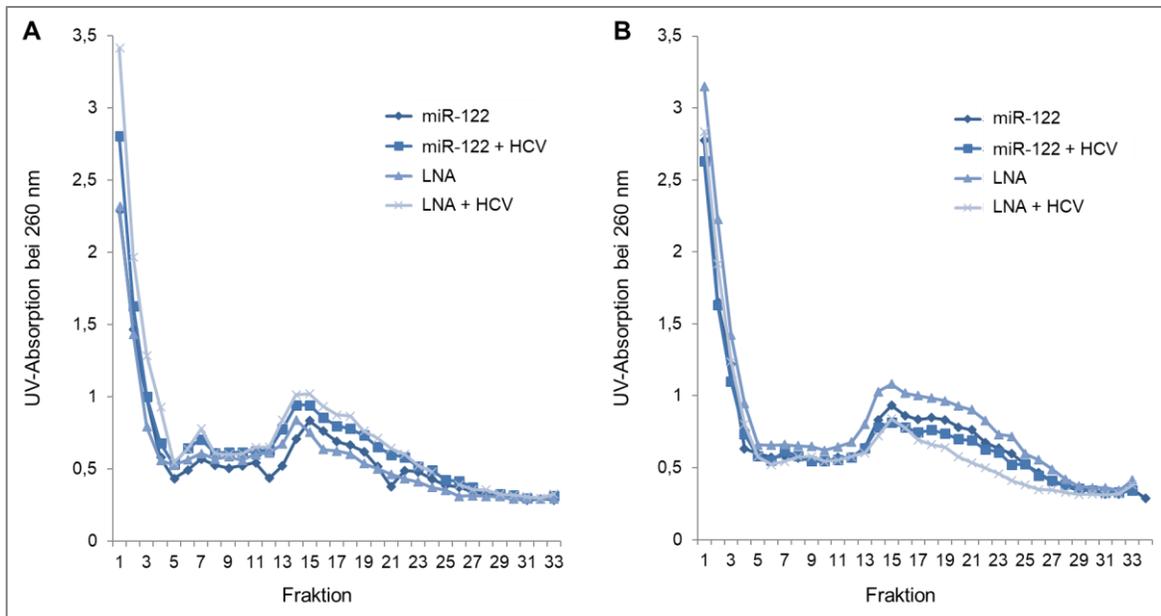


Abbildung 3-10: Gradienten der ersten zwei sequenzierten Ribosome Profiling Replikate. Dargestellt sind die bei 260 nm gemessenen Fraktionen der Sucrosegradienten des ersten (A) und zweiten (B) Experimentes. Die angereicherten 80S-Ribosomen haben ihr Maximum in den Fraktionen 14 – 17. In zwei Proben wurde miR-122 transfiziert und in zwei weiteren das anti-miR-122-LNA. Zusätzlich erfolgte die Elektroporation mit HCV-Genomen in je einer der Proben. 6 Tage nach der Elektroporation wurden die Zellen lysiert und die Gradienten gemessen.

Zur Kontrolle der Replikation des HC-Virus in den Zellen wurden sowohl Western Blots als auch RT-qPCRs durchgeführt. Die Ergebnisse der Überprüfung beider Replikate sind in der Abbildung 3-11 zusammengefasst. Sowohl bei dem ersten (A und C) als auch bei dem zweiten Replikat (B und D) konnte in der miR-122 + HCV Probe (2) das virale Protein NS3 im Western Blot nachgewiesen werden. Die RT-qPCR bestätigte die HCV-Replikation in dieser Probe durch den Nachweis der HCV-RNA in den Zellen. In den Proben, die nur mit miR-122 oder anti-miR-122-LNA transfiziert wurden, konnten erwartungsgemäß keine viralen Proteine und keine HCV-RNA detektiert werden (1 und 3). Auch die anti-miR-122-LNA + HCV Proben zeigte keine nachweisbare Infektion (4). Da beide Replikate einen 80S-Ribosomenpeak und eine HCV-Infektion in der miR-122 + HCV Probe aufwiesen, wurden die Experimente weitergeführt. Im Folgenden soll auf die einzelnen Schritte zur Generierung der cDNA-Bibliothek eingegangen werden, wobei exemplarisch die Gelbilder des zweiten Replikats gezeigt werden.

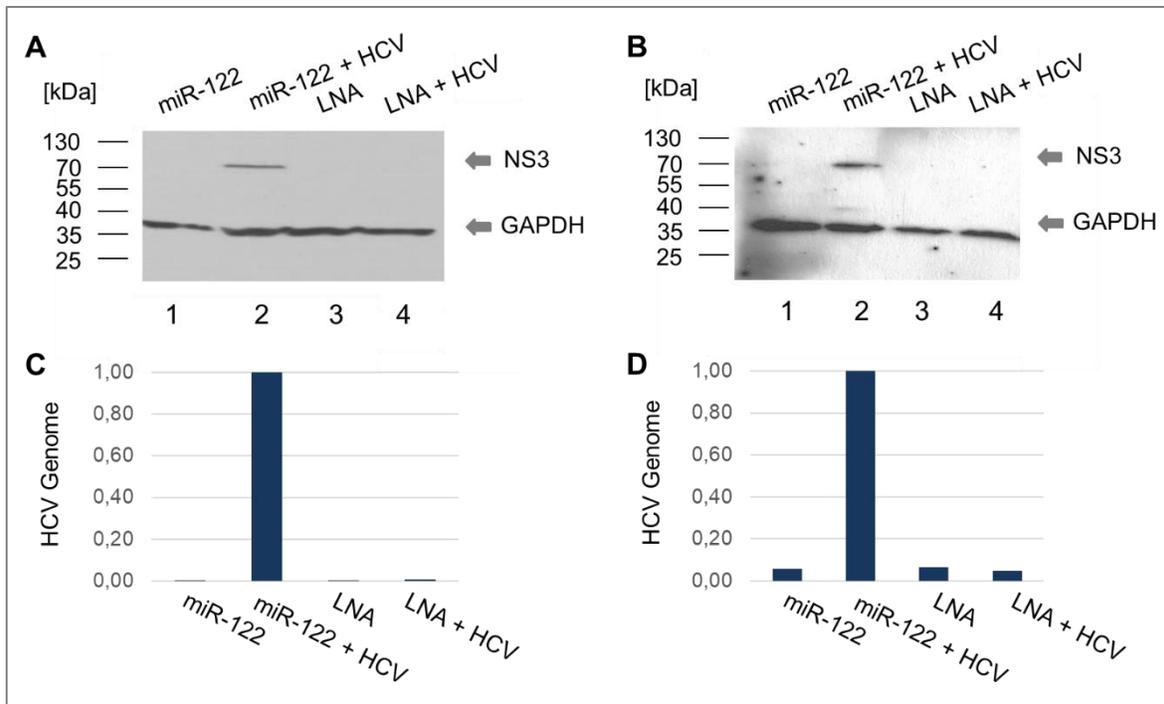


Abbildung 3-11: Überprüfung der HCV-Infektion mittels Western Blot (A und B) und RT-qPCR (C und D). Getestet wurden das erste (A und C) sowie das zweite (B und D) sequenzierte Ribosome Profiling Replikat. Huh-7.5-Zellen wurden mit miR-122 oder anti-miR-122-LNAs sowie HCV transfiziert und 6 Tage nach HCV Zugabe entsprechend des Experimentes lysiert.

Nach der Kontrolle der Proben erfolgte eine erste Größenselektion der RFs (2.7.2.7). Auf einem 15 % Urea-PAA-Gel wurden die gereinigten Fraktionen aufgetrennt. Um möglichst nur mit RNA weiter zu arbeiten, die tatsächlich zum Zeitpunkt der Lyse von einem Ribosom bedeckt und translatiert worden ist, wurden Fragmente mit einer Länge von 26 – 34 nt (durchschnittlich bedeckter Bereich) ausgeschnitten (Abbildung 3-12). RNA-Oligos (Ni-Ni-19 und -20, M) dienten hierbei als Marker und wurden auch im Folgenden wie die Proben weiterbearbeitet. Es ist zu erkennen, dass auch viele größere Nukleinsäure-Fragmente vor der ersten Selektion in den RNA-Proben erhalten waren.

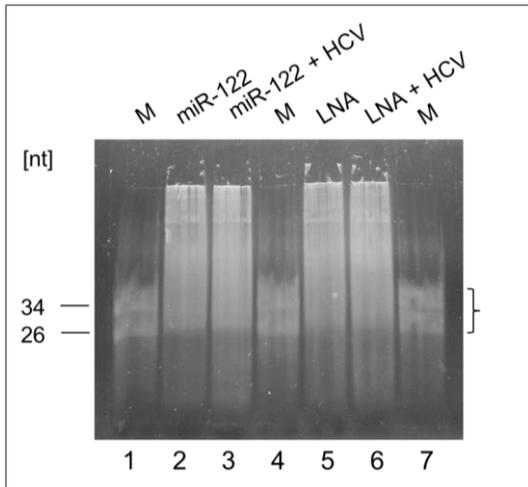


Abbildung 3-12: Erste Größenselektion der Fragmente.

Auf ein 15 % Urea-PAA-Gel wurden die vier Proben aufgetragen (2, 3, 5, 6) und Markeroligos (M) mit einer Größe von 26 und 34 nt (1, 4, 7). Die auszuschneidenden Bereiche sind durch eine Klammer gekennzeichnet.

Nach Reinigung der RNA aus den ausgeschnittenen Gelstücken wurden die Proben zur Vorbereitung auf eine Linkerligation dephosphoryliert (2.7.2.8, 2.7.2.9). Der Linker ist ein DNA-Oligo, welches mit Hilfe der T4-RNA-Ligase über ein Adenosin mit den RFs verbunden wird. Es folgt eine zweite Größenselektion auf einem Gel, um nicht ligierte Fragmente auszuschließen (2.7.2.10). Wie in Abbildung 3-13 zu erkennen ist, wurden auch die Marker-Oligos als Kontrolle sowie zur Selektion ligiert, ausgeschnitten und weiterbearbeitet. Am unteren Ende des Geles sind die nicht-ligierten Linker zu sehen.

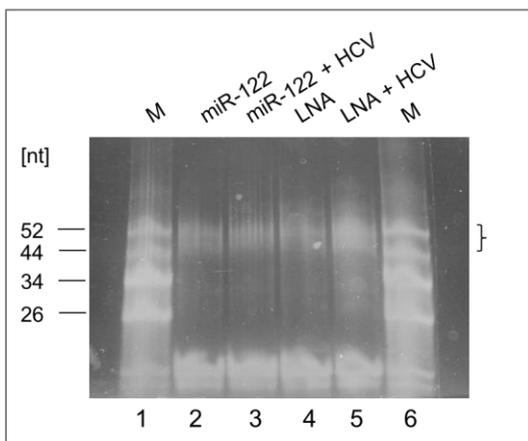


Abbildung 3-13: Zweite Größenselektion der Fragmente.

Auf ein 15 % Urea-PAA-Gel wurden die vier ligierten Proben (2 – 5) und die ligierte Markeroligos (M) mit einer Größe von 44 und 52 nt (1, 6) aufgetragen. Die auszuschneidenden Bereiche sind durch eine Klammer gekennzeichnet.

Nach der Reinigung der Proben konnte mit einer reversen Transkriptase die RNA in cDNA umgeschrieben werden (2.7.2.11). Der verwendete RT-Primer bindet an den Linker, so dass die RFs transkribiert werden können. Die ursprüngliche RNA wurde anschließend mit Natriumhydroxid hydrolysiert. Die dritte Größenselektion der Proben erfolgte auf einem

6 % Urea-PAA-Gel (2.7.2.12). Zusätzlich wurden die revers transkribierten Markeroligos und als Negativkontrolle (K) die RT-Primer aufgetragen (Abbildung 3-14).

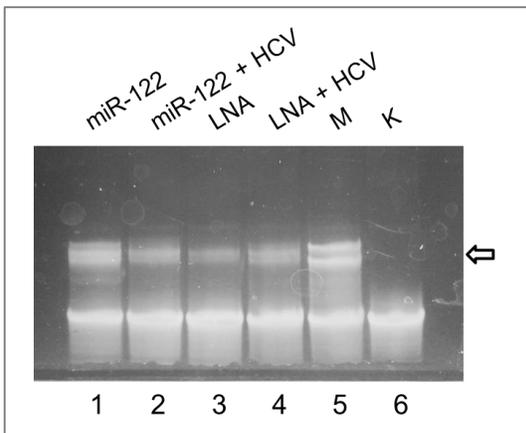


Abbildung 3-14: Dritte Größenselektion der Fragmente. Auf ein 6 % Urea-PAA-Gel wurden die vier revers transkribierten Proben (1 – 4) und Markeroligos (5, M), sowie die RT-Primer als Negativkontrolle (6, K) aufgetragen. Die auszuschneidenden Bereiche sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Damit spezifische Bereiche des RT-Primers als Ansatz für die PCR-Primer genutzt werden konnten, mussten die cDNA-Fragmente zunächst zirkularisiert werden (2.7.2.13). Eine Test-PCR zeigte, ob dies erfolgreich war und Fragmente der richtigen Größe (ca. 170 bp) entstanden (Abbildung 3-15). Unterhalb der erwarteten Fragmentbanden sind Produkte zu erkennen, die kein Insert besitzen, sondern reine zirkularisierte RT-Primer sind. Die größeren DNA Fragmente sind vermutlich über-amplifizierte PCR-Produkte.

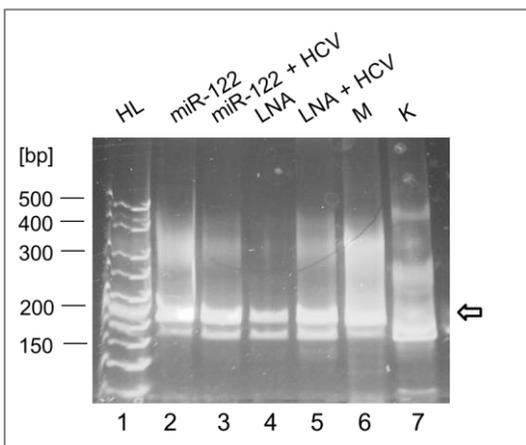


Abbildung 3-15: Test-PCR zur Kontrolle der Zirkularisierung. Auf ein 6 % PAA-Gel wurden die PCR-Reaktionen der vier Proben (2 – 5), Markeroligos (6, M) und die RT-Primer als Kontrolle (7, K) aufgetragen. Die Banden der erwarteten Fragmente sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Zur zusätzlichen Größenkontrolle wurde ein HyperLadder 25 bp Marker (1, HL) hinzugefügt.

Da die rRNA 80 % an der gesamt-RNA-Menge ausmacht, wäre der Großteil der zu sequenzierenden Fragmente rRNA-Ursprungs. Um dies zu verhindern, war ein weiterer unverzichtbarer Schritt die rRNA-Depletion mit spezifischen Oligonukleotiden (2.7.2.14). In diesem Schritt wird das Meiste an vorhandener cDNA aus ribosomaler RNA aus den Proben

entfernt. Bei einer früheren Durchführung wäre auf den Gelen kaum eine genügend starke Bande zum Ausschneiden zu erkennen gewesen, weshalb die Depletion erst nach der Amplifikation am Ende durchgeführt wird.

Bevor die finale Amplifikation der Proben erfolgte, wurde für jede Probe die optimale PCR-Zyklusanzahl bestimmt. In der Abbildung 3-16 ist eine solche PCR exemplarisch für eine der Proben dargestellt. Es ist zu erkennen, dass in diesem Fall bei 20 Zyklen bereits größere Nebenprodukte entstehen, wohingegen bei 12 Zyklen nur die RT-Primer amplifiziert werden. Somit fiel die Wahl für diese Probe entsprechend auf 16 Zyklen. An Ende des Gels sieht man die Primeroligonukleotide.

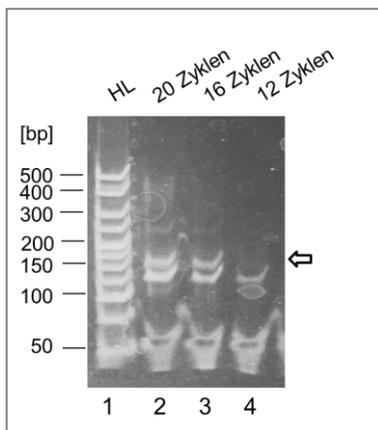


Abbildung 3-16: Beispiel einer PCR zur Bestimmung der Zyklusanzahl für die finale Amplifikation der Probe. Auf ein 6 % PAA-Gel wurden die PCR-Reaktionen einer Probe mit 20, 16 und 12 Zyklen (2 – 4) aufgetragen. Die Banden der richtigen Größe sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Für die zusätzliche Größenkontrolle wurde ein HyperLadder 25 bp Marker (1, HL) hinzugefügt.

Nachdem für jede Probe die optimale Zyklusanzahl bestimmt wurde, konnten in der finalen PCR die Proben amplifiziert werden und eine vierte Größenselektion erfolgen (2.7.2.16, 2.7.2.17). Neben den Proben wurde eine Wasserkontrolle (W) und eine RT-Primer-Negativkontrolle (K) aufgetragen (Abbildung 3-17). In diesem Schritt ist besonders darauf zu achten, dass bei jeder Probe ein anderer Index Primer verwendet wird, um die Fragmente nach dem Sequenzieren zuordnen zu können.

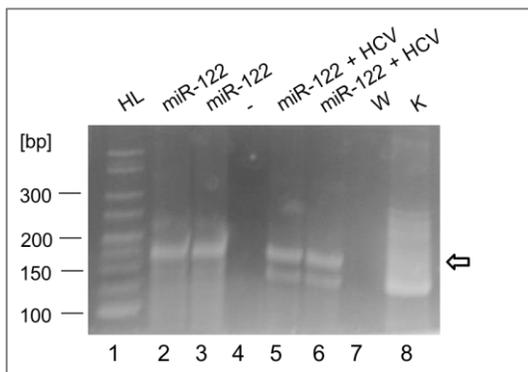


Abbildung 3-17 Finale PCR zur Amplifikation der Proben. Auf ein 6 % PAA-Gel wurden die PCR-Reaktionen der Proben (2, 3, 5, 6) aufgetragen. Die auszuschneidenden Banden der richtigen Größe sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Für die zusätzliche Größenkontrolle wurde ein HyperLadder 25 bp Marker (1, HL), eine Wasserkontrolle (W, 7) und eine Negativkontrolle (K, 8) hinzugefügt, (-) ist leer.

Bevor die Proben zum Sequenzieren verschickt werden konnten, musste zum einen die Konzentration mit Hilfe des Qubit™ gemessen (2.5.1.1) und zum anderen die Integrität der Proben mit dem Bioanalyzer getestet werden (2.7.2.18). In der Abbildung 3-18 ist das Ergebnis des Bioanalyzers für das zweite Experiment gezeigt. Neben zwei Markerpeaks bei 35 und 10380 bp kann die Größe der Proben abgelesen werden. Die RFs (A) liegen bei etwa 175 bp, wobei zum Teil bei ca. 300 bp kleine Mengen an Überamplifikaten detektiert wurden. Die Größe der TR-Bibliotheken (B) liegt zwischen 200 und 500 bp.

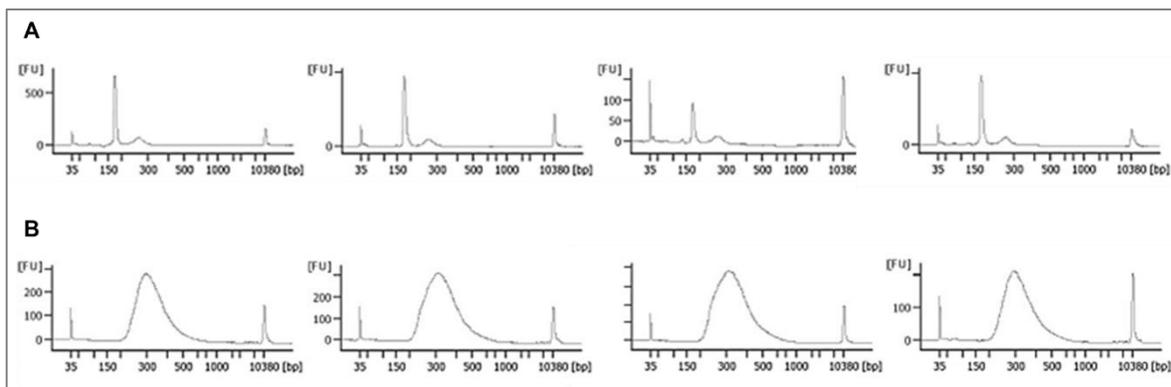


Abbildung 3-18: Überprüfung der Proben des Experimentes mittels Bioanalyzer. Neben den aufgetragenen Markern (35 und 10380 bp), können die Größen der RFs in **A** und der TRs in **B** abgelesen werden. Dargestellt sind jeweils die Fluoreszenz-Units (FU) gegenüber den Basenpaaren (bp).

Nachdem alle 16 generierten Proben überprüft wurden, konnten je 20 µl an BGI versendet werden, wobei die kurzen RFs mit 50 bp von einem Ende (engl. *single end*, SE) und die langen TRs mit 100 bp von beiden Enden der Fragmente (engl. *paired end*, PE) sequenziert wurden, um die Sequenzen vollständig zu erhalten.

Fazit: Der Western Blot und die qPCR zu Beginn zeigten, dass HCV in den mit Jc1-RNA und miR-122 transfizierten Huh-7.5-Zellen replizierte. Mit Hilfe der Gradienten konnte zudem sichergestellt werden, dass nur von Ribosomen geschützte RNA-Fragmente weiterverwendet wurden. Nachdem die Bibliotheken der acht RF- und acht TR-Proben generiert wurden und alle Kontrollen, sowie die Bioanalyzer-Messungen die erwarteten Ergebnisse zeigten, konnten die Proben zum Sequenzieren versendet werden.

3.3.1.1 Auswertung des ersten Ribosome Profiling Durchlaufs

Die bioinformatische Auswertung der zwei Ribosome Profiling Replikate des ersten Durchlaufs erfolgte durch Rolf Hilker und Oliver Schwengers aus der AG Goesmann in Gießen. Die Anzahl an generierten Sequenzen lag zwischen 37 und 84 Millionen pro Probe.

Nachdem verschiedene Analysen durchgeführt wurden, zeigte sich, dass es keine signifikante Korrelation zwischen den durchgeführten Replikaten gab. In der Abbildung 3-19 ist als Beispiel die Hauptkomponentenanalyse (engl. *Principal component analysis*, PCA) zur Clusteruntersuchung der TR-Proben gezeigt. Eine PCA dient der vereinfachten Darstellung komplexer Datensätze, indem verschiedene statistische Variablen den Linearkombinationen (Komponenten) angenähert werden und so wenige neue Variablen die gesamten Daten widerspiegeln. Die erste Hauptkomponente (PC1) spiegelt den größten Anteil an der Varianz wider, PC2 den zweitgrößten. Es ist zu erkennen, dass die einzelnen Proben der Replikate (farbig gleiche Punkte) nicht räumlich zusammenliegen, sondern eine hohe Varianz aufzeigen, wodurch sich keine signifikant differenziell regulierten Gene identifizieren ließen.

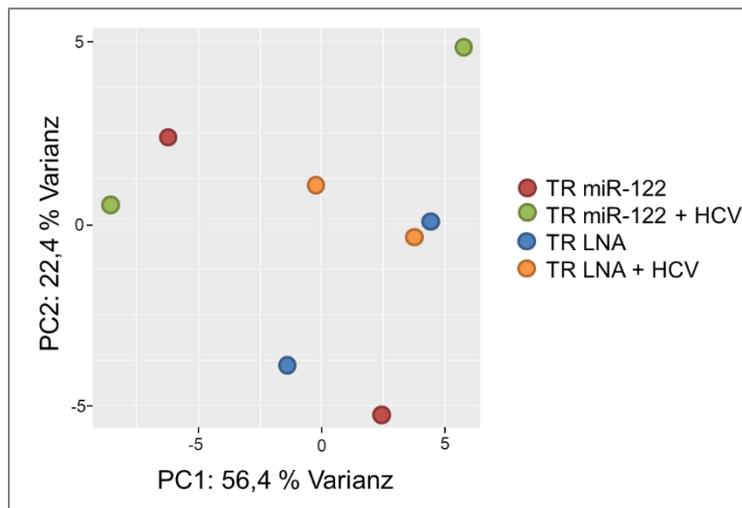


Abbildung 3-19: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Gesamt-RNA (TR). Die erste Komponente (PC1) enthält den größten Anteil an der Gesamtstreuung, die zweite den zweit häufigsten Anteil (PC2).

Wie in der Clusteranalyse (Abbildung 3-20) dargestellt ist, konnte auch zwischen den beiden RF-Replikaten kaum eine Korrelation detektiert werden. Zwar bilden sich die zwei erwarteten Hauptgruppen aus (RF und TR, siehe Dendrogramm), es erfolgte jedoch keine deutliche Gruppierung der Replikate. Die TR-Proben unterscheiden sich im Allgemeinen weniger voneinander als die RFs, wobei blau in der Abbildung einer hohen und rot einer

niedrigen Korrelation entspricht. Es ist zu sehen, dass sich die Proben eines Experimentes (E1 bzw. E2) mehr gleichen als die korrespondierenden Replikate untereinander. Dies spricht bereits für eine geringe Anzahl an signifikant differenziell exprimierten Genen.

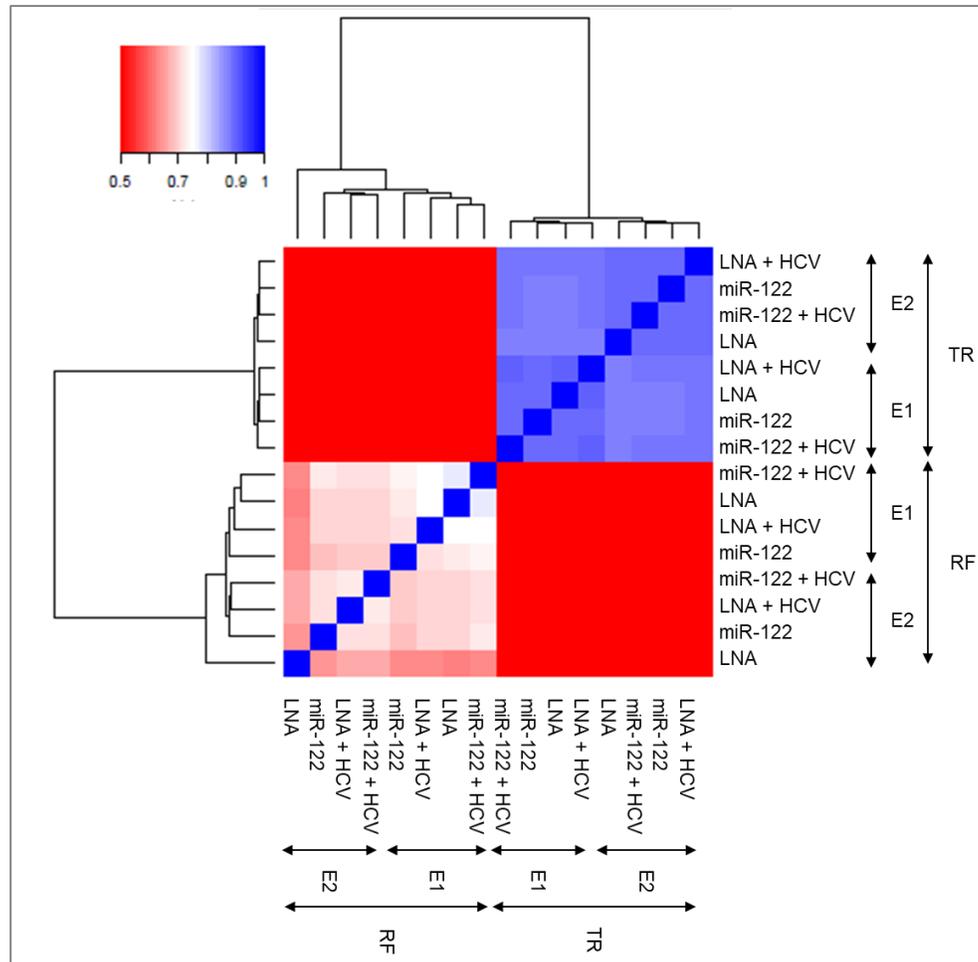


Abbildung 3-20: Korrelationsanalyse der ersten sequenzierten Ribosome Profiling Experimente. Aufgetragen sind die einzelnen Proben und wie diese zueinanderstehen. Die Gesamt-RNA (TR) und die ribosomal geschützten RNA-Fragmente (RF) bilden zwei Hauptgruppen (siehe Dendrogramm). Es ist zu erkennen, dass sich die unterschiedlich behandelten Proben eines Experimentes (E1/E2) untereinander mehr ähneln als die jeweiligen Replikate. Blau steht für eine hohe Korrelation und rot für eine geringe.

Um dennoch zu überprüfen, ob signifikant differenziell regulierte Gene detektiert werden können, wurden MA-Plots generiert (Abbildung 3-21). In dem Graph werden die Unterschiede zwischen zwei Behandlungen visualisiert, indem der Logarithmus der Rate der Expressionsänderung (engl. *log fold change*, logFC) der Expression der Anzahl der an ein Gen gemappten Sequenzen gegenübergestellt ist. Differenziell regulierte Gene werden

als rote Punkte dargestellt. Wie zu erkennen ist, konnte nur ein signifikant differenziell reguliertes Gen (RNU5E-1 (engl. *RNA U5E small nuclear 1*)) zwischen den HCV infizierten und nicht-infizierten Zellen detektiert werden.

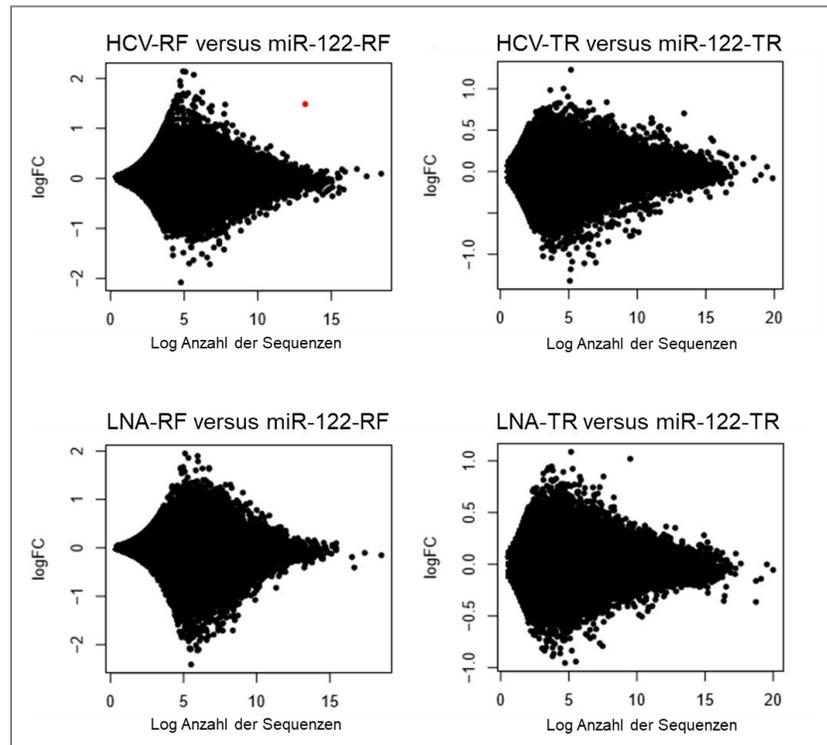


Abbildung 3-21: MA-Plots zur Veranschaulichung der differentiellen Genanalyse. Aufgetragen ist die logarithmische Änderungsrate (engl. *log fold change*, logFC) der Expression gegenüber der Anzahl der an ein Gen gemappten Sequenzen. In der ersten Zeile werden die HCV-Proben mit den miR-122-Proben verglichen und in der zweiten die anti-miR-122-LNA- mit den miR-122-Proben.

Aufgrund der schlechten Korrelation in diesen und weiteren differentiellen Genanalysen (nicht gezeigt), wurde beschlossen, die Durchführung des Experimentes anzupassen und das Experiment zu wiederholen, um auswertbare Daten zu generieren.

Auf diesen zweiten Ribosome Profiling Durchgang, welcher drei Replikate beinhaltete, soll im folgenden Kapitel näher eingegangen werden.

Fazit: Trotz der durchgeführten Kontrollen vor und während der Präparation der Ribosome Profiling Bibliotheken konnten nach dem Auswerten der generierten Daten keine differenziell signifikant exprimierte Gene detektiert werden. Insgesamt ähnelten sich die Proben eines Experimentes untereinander mehr als die korrespondierenden gleichbehandelten Proben. Im Folgenden wurde deshalb die Durchführung des Profiling verändert. Drei Replikate anstelle von zwei wurden parallel in denselben Zellpassagen angefertigt und die RF- und TR-Proben gleichbehandelt.

3.3.2 Der zweite Ribosome Profiling Durchlauf

In dem zweiten sequenzierten Durchlauf des Ribosome Profiling sollte vermieden werden, dass es erneut zu großen Abweichungen zwischen den Replikaten kommt. Aus diesem Grund wurden einige Änderungen an der Durchführung vorgenommen. Es wurden zum einen mehr Zellen verwendet, um eine größere Ausgangsmenge an Material für die weiteren Schritte zu erhalten (2.7.2.1). Zum anderen erfolgte die Transfektion der HCV-RNA mit Lipofektamine 2000, da sich dies im Laufe der Zeit als sicherere Methode erwies, bei der deutlich weniger Zellen sterben als bei der Elektroporation. Außerdem wurden drei Replikate parallel bearbeitet, das heißt mit derselben Zellpassage und zum gleichen Zeitpunkt. Die Zellen wurden demnach im gleichen Medium mit Kälberserum aus demselben Aliquot kultiviert. Die TR-Proben wurden zudem nach einer randomisierten alkalischen Fragmentierung in jedem Schritt genau wie die RFs behandelt und selektiert. Da in den anti-miR-122-LNA-Proben HCV nicht replizieren kann, wurden diese Behandlungen weggelassen und nur die miR-122-, miR-122 + HCV- und LNA-Bibliotheken hergestellt.

Fünf Tage nach der Transfektion der genomischen HCV-RNA erfolgte zunächst ein Western Blot und eine RT-qPCR, welche der Kontrolle der viralen Replikation dienen (2.3.5, 2.6.2, 2.7.1). Wie in der Abbildung 3-22 zu erkennen ist, konnten in allen drei HCV-Proben (1 – 3) die viralen Proteine NS3 und Core detektiert werden. Die ausschließlich mit miR-122 und anti-miR-LNA transfizierten Proben (4 – 9) wiesen erwartungsgemäß keine viralen Proteine auf.

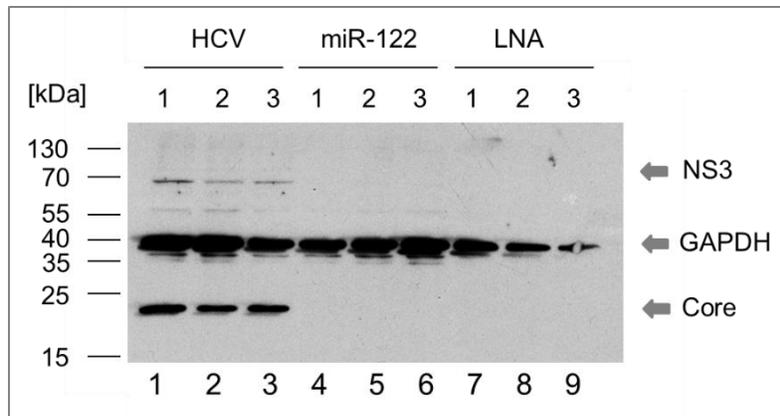


Abbildung 3-22: Kontrolle der HCV-Replikation im zweiten Ribosome Profiling Versuch mittels Western Blot. Fünf Tage nach der Transfektion mit HCV + miR-122, miR-122 oder anti-miR-122-LNAs wurden die Huh-7.5-Zellen für den Western Blot lysiert. Detektiert wurden die viralen Proteine NS3 und Core, sowie das zelluläre Protein GAPDH.

Mit Hilfe der RT-qPCR wurde nicht nur kontrolliert, ob HCV repliziert (Abbildung 3-23, A), sondern auch, ob die LNAs die miR-122 ausreichend sequestrieren (Abbildung 3-23, B), was der Fall war. Die HCV-Genome konnten ausschließlich in den drei jeweiligen Proben (HCV 1 – 3) in vergleichbaren Mengen detektiert werden. Die miR-122 war sowohl in den HCV- als auch in den miR-122-Proben in ähnlicher Menge messbar (B, HCV 1 – 3 und miR-122 1 – 3). In den LNA-Proben hingegen wurde die miR-122 wie geplant sequestriert (B, LNA 1 – 3). Da die Kontrollen die erwarteten Ergebnisse zeigten, wurden die Proben für den zweiten Ribosome Profiling Durchlauf am folgenden Tag lysiert.

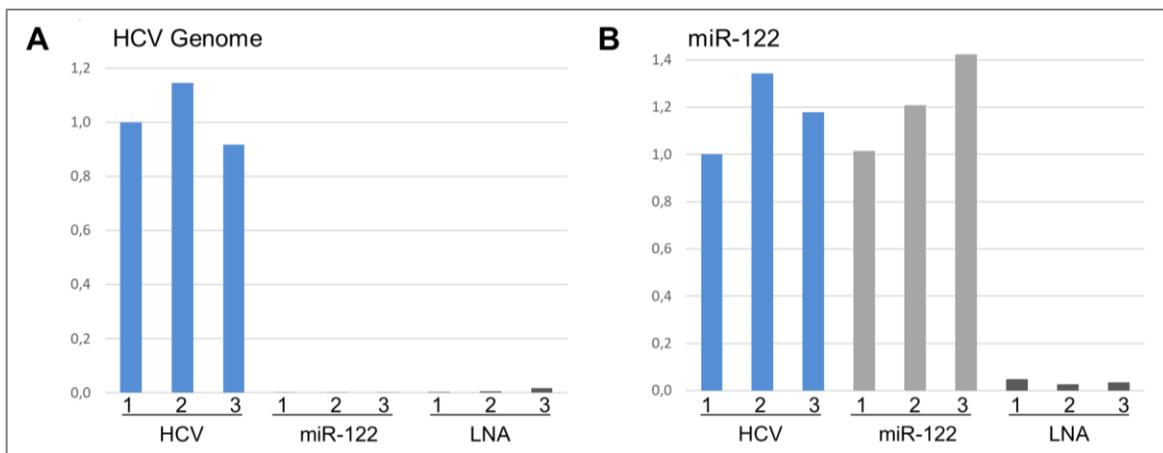


Abbildung 3-23: Kontrolle der HCV-Replikation (A) und der miR-122 Menge (B) im zweiten Ribosome Profiling Durchlauf mittels RT-qPCR. Fünf Tage nach der Transfektion wurden die Huh-7.5-Zellen für die qPCR lysiert. Dargestellt ist die relative Menge an Nukleinsäuren im Verhältnis zu Probe 1 (HCV 1).

Wie beim ersten Durchlauf wurden am Tag der Zellyse die RNAs für die RFs, welche nicht von translatierenden Ribosomen geschützt sind, verdaut und eine Ultrazentrifugation mit Sucrosegradienten durchgeführt (2.7.2.2 – 2.7.2.5). Mit Hilfe der Gradienten konnte die Wirkung des Cycloheximids überprüft und zudem die 80S-Ribosomen angereichert werden. In der Abbildung 3-24 sind die Profile der Gradienten zusammengefasst. Es ist zu sehen, dass der 80S-Peak gut ausgeprägt und je nach Probe am prominentesten in den Fraktionen 12 – 17 ist. Mit den vier Fraktionen pro Probe, welche den höchsten 80S-Anteil zeigten, wurde weitergearbeitet, der Rest wurde verworfen.

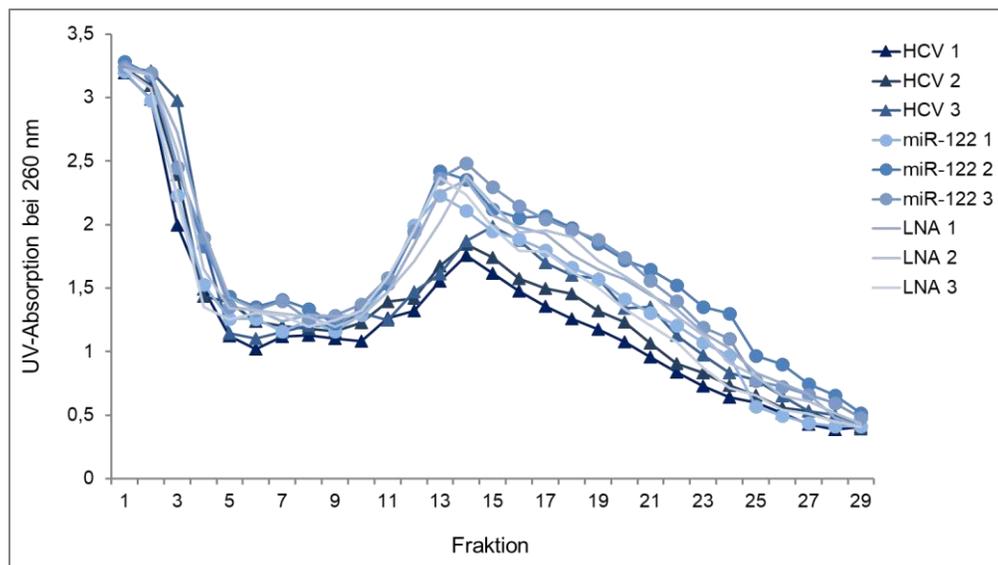


Abbildung 3-24: Gradienten der zweiten Ribosome Profiling Durchlaufs. Dargestellt sind die bei 260 nm gemessenen Fraktionen der Ultrazentrifugation. Die 80S-Ribosomenpeaks haben ihr Maximum je nach Probe in den Fraktionen 12 – 17.

Die TR-Proben sollten in diesen Experimenten genau wie die RFs bearbeitet werden, um Unterschiede aufgrund der Handhabung zu vermeiden. Hierfür musste die RNA zunächst randomisiert fragmentiert werden (2.7.2.6). Die Länge der Inkubation der RNA mit der alkalischen Lösung wurde im Vorfeld getestet, damit die entstehenden Fragmente möglichst in dem Bereich der Größe der RFs liegen. Die Test-Fragmentierung, in der 20, 40, 60 und 80 Minuten Inkubationszeiten miteinander verglichen wurden, ist in Abbildung 3-25 gezeigt. Als Größenkontrolle wurden die für die erste Größenselektion verwendeten Markeroligos mit auf das Gel aufgetragen (Spur 1). Anhand des Bildes, wurden die Proben 60 min fragmentiert, da in dieser Zeit am meisten RNA zwischen 34 und 26 nt entsteht.

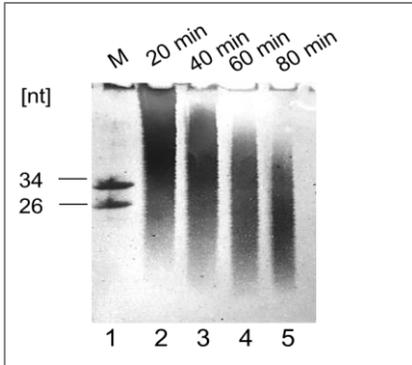


Abbildung 3-25 Test der Inkubationszeit der gesamt RNA mit der alkalischen Fragmentationslösung. Als Größenkontrollen wurden die zwei Markeroligos Ni-NI-19 und -20 eingesetzt (M, 1). 20, 40, 60 und 80 min (2 – 5) Inkubationszeiten wurden verglichen.

Die weiteren Schritte des zweiten Durchlaufes, das heißt die Größenselektionen, Linker-Ligation, reverse Transkription, Zirkularisierung, rRNA-Depletion und die PCRs erfolgten wie im ersten Durchlauf, weshalb an dieser Stelle auf die erneute Darstellung der Gele verzichtet werden soll (2.7.2.7 – 2.7.2.17, 3.3.1). Alle Gele zeigten die erwarteten Banden, so dass die Proben bis zum Ende weiterverarbeitet werden konnten.

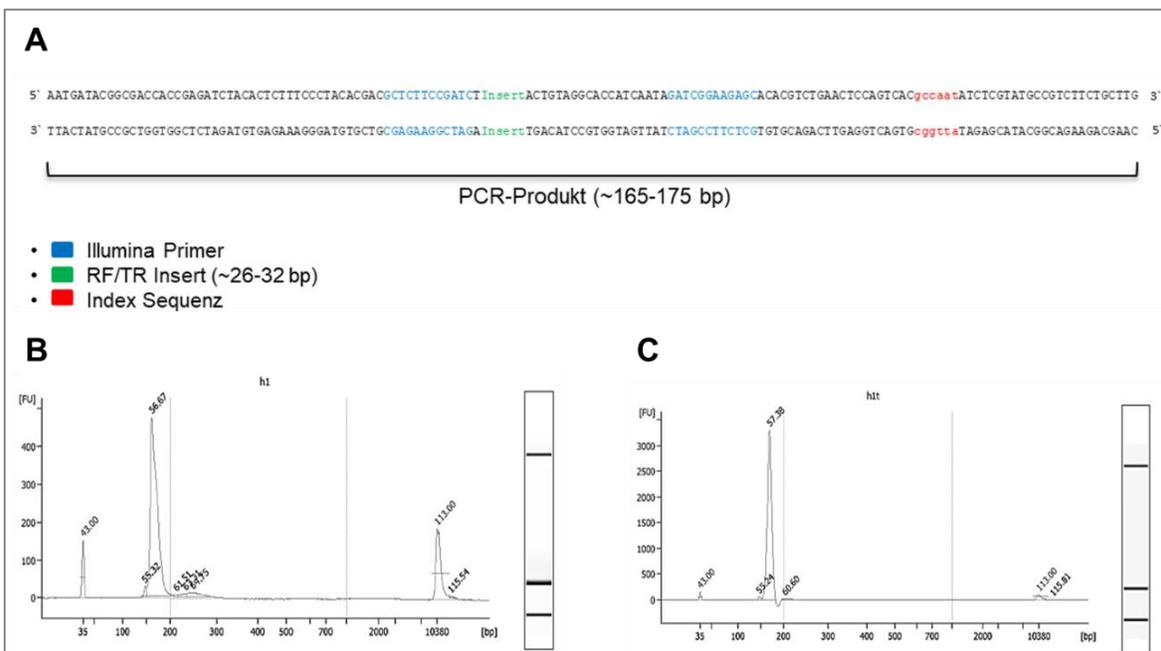


Abbildung 3-26: Kontrolle der generierten cDNA-Bibliotheken im zweiten Profiling Durchlauf. In **A** ist der schematische Aufbau der generierten PCR-Produkte gezeigt. In **B** und **C** ist beispielhaft die Größenverteilung der Proben HCV1-RF (**B**) und TR (**C**) dargestellt. Mit Hilfe des aufgetragenen Markers (35 und 10380 bp), können die Größen der Proben abgelesen werden. Dargestellt sind jeweils die Fluoreszenz-Units (FU) gegenüber den Basenpaaren (bp).

Nach der finalen PCR wurden die 18 generierten cDNA-Bibliotheken mit dem Bioanalyser kontrolliert.

Die Produkte hatten insgesamt Längen von ca. 165 – 175 bp (Abbildung 3-26, A) und setzten sich aus Bereichen zusammen, an denen der Illumina Sequenzierprimer ansetzen kann (blau), aus der Indexsequenz (rot), welche für die Zuordnung der Proben notwendig ist, und dem eigentlichen RF- oder TR-Fragment (grün). Beispielhaft gezeigt ist die gemessene Größenverteilung der Proben HCV1 RF (B) und TF (C). Ein Marker wurde als interne Kontrolle aufgetragen. Insgesamt wurde weniger überamplifiziertes PCR-Produkt detektiert als in dem ersten Durchlauf (Abbildung 3-18). Die gemessenen Konzentrationen der Bibliotheken schwankten zwischen 0,7 und 14,1 ng/µl und konnten durch BGI in Hongkong sequenziert werden (alle einheitlich mit SE50).

Fazit: Der Western Blot und die RT-qPCR zeigten, dass HCV in den transfizierten Huh-7.5-Zellen replizierte. Zudem wurde der miR-122-Gehalt in den Zellen und somit die Sequestrierung durch die LNAs überprüft. Mit Hilfe der Sucrosegradienten konnte zudem sichergestellt werden, dass nur von Ribosomen geschützte RNA-Fragmente weiterverwendet wurden. Nachdem die cDNA-Bibliotheken generiert wurden und alle Kontrollen sowie die Bioanalyser-Messungen die erwarteten Ergebnisse zeigten, konnten die Proben zum Sequenzieren versendet werden.

3.3.2.1 Auswertung des zweiten Ribosome Profiling Durchgangs

Die bioinformatische Auswertung der Ribosome Profiling Daten erfolgte durch Jochen Bathke in der AG Goesmann (Gießen) und durch Audrey Michel in der AG Baranov (Cork).

Zunächst wurde die zelluläre Genexpression mittels einer Hauptkomponentenanalyse untersucht. Es sollte somit überprüft werden, ob sich Cluster bilden lassen und es eine Korrelation zwischen den Proben der verschiedenen Replikate gibt (Abbildung 3-27). Nur Sequenzen mit einer Länge zwischen 25 und 34 nt wurden mit in die Graphik einbezogen. Es ist zu sehen, dass die TR- (grau) und die RF-Proben (blau) jeweils eine Hauptgruppe bilden. Die Hauptkomponente 1 (PC1) stellt den größten Anteil an der Gesamtstreuung dar (89 %). Innerhalb der Gruppen sind die Unterschiede schwächer ausgeprägt. Schaut man sich die neun RFs an, fällt auf, dass sich die HCV-Proben (blaue ▲) von den restlichen Proben deutlich absetzen und eine eigene Untergruppe bilden. Die miR-122- (●) und die anti-miR-122-LNA- (■) Proben liegen nah beieinander. Insgesamt weisen die TR-Proben untereinander eine geringere Varianz auf als die RF-Proben. In diesem Experiment waren also, im Gegensatz zum vorigen Experiment, mehr Unterschiede zwischen den einzelnen

Behandlungen als zwischen den Replikaten einer Behandlung zu erwarten, das Experiment konnte also vorläufig als erfolgreich bewertet und weiter analysiert werden.

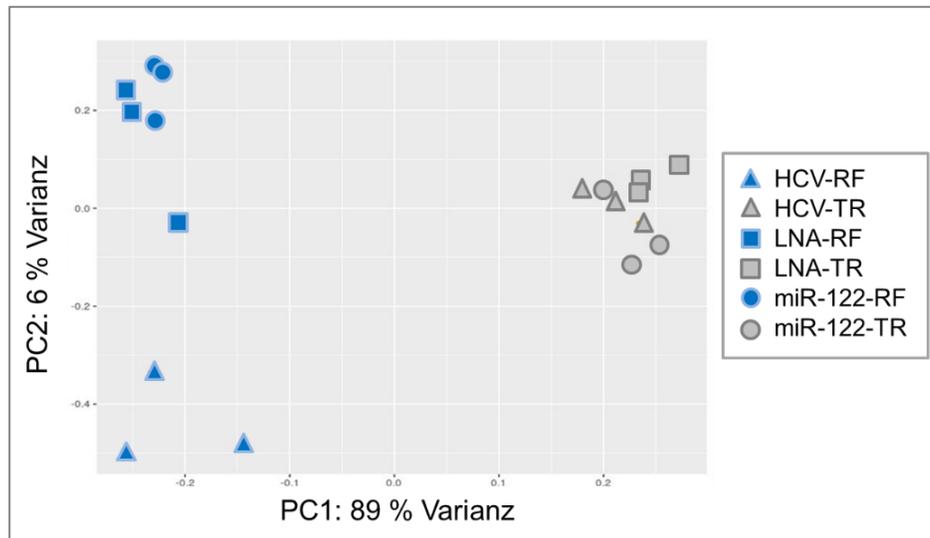


Abbildung 3-27: Hauptkomponentenanalyse (PCA) des zweiten Ribosome Profiling Durchlaufs. Die erste Komponente (PC1) enthält den größten Anteil an der Gesamtstreuung (89 %), die zweite den zweit größten Anteil (PC2). Die von den Ribosomen geschützten RNA-Fragmente (RF) sind in blau dargestellt und die gesamte RNA (TR) in grau.

Um einen genaueren Einblick in die Daten zu erlangen, wurden MA-Plots angefertigt, welche die differenzielle Genanalyse widerspiegeln (Abbildung 3-28). In dem Graph werden die Unterschiede zwischen zwei Proben visualisiert, indem der Logarithmus der Rate der Expressionsänderung der Anzahl der an ein Gen gemappten Sequenzen (25 – 34 nt) gegenübergestellt ist (siehe Experiment 1). Die roten Punkte stellen signifikant veränderte Gene dar (hier adjustierter P-Wert von $< 0,05$). Es ist zu erkennen, dass die Zugabe der anti-miR-122-LNAs nahezu keinen signifikanten Einfluss auf die zelluläre Genexpression hat. Im Gegensatz dazu zeigen sich einige signifikant veränderte Gene bei dem Vergleich von HCV positiven (HCV) und negativen Zellen (miR-122), was für eine veränderte Genexpression spricht.

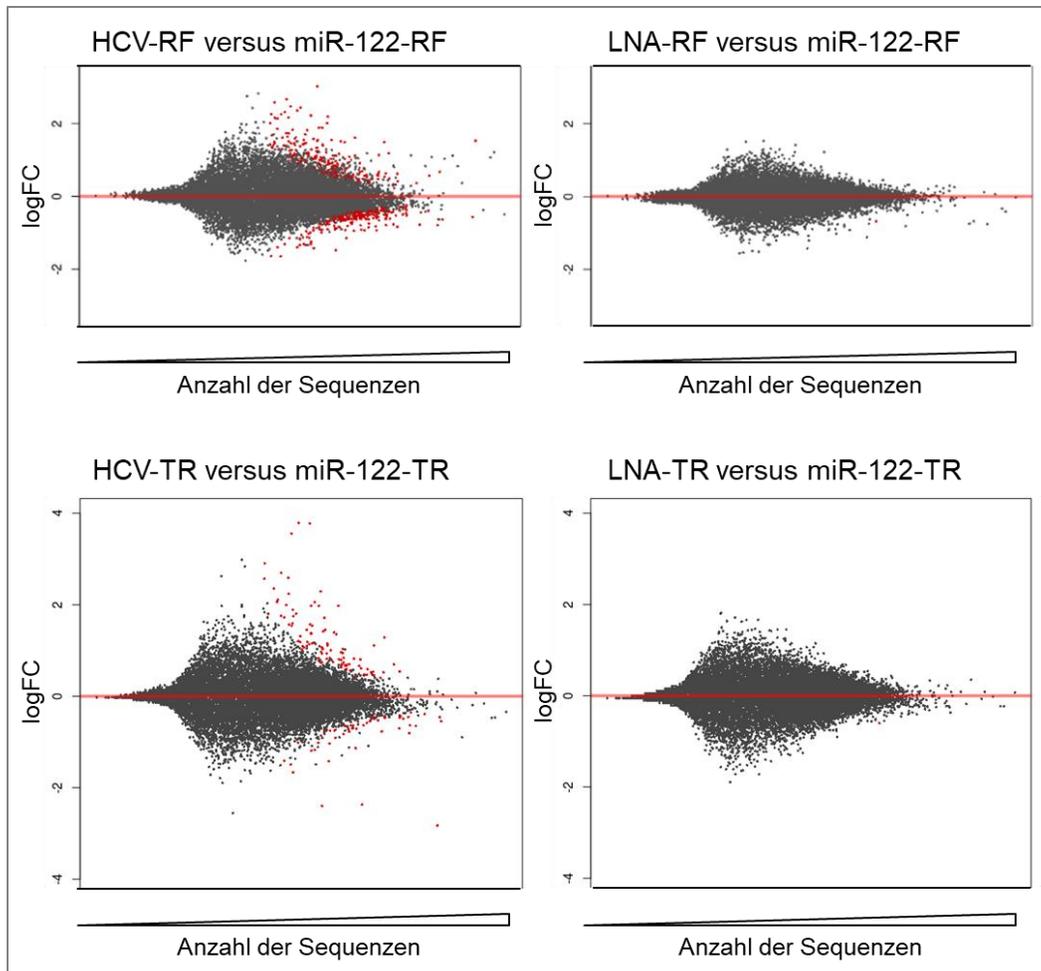


Abbildung 3-28: MA-Plots zur ersten Veranschaulichung der differentiellen Genanalyse. Aufgetragen ist die logarithmische Änderungsrate (engl. *log fold change*, logFC) der Expression gegenüber der Anzahl der an ein Gen gemappten Sequenzen. In der ersten Spalte werden die HCV-Proben mit den miR-122-Proben verglichen und in der zweiten die LNA- mit den miR-122-Proben. Die von den Ribosomen geschützten RNA-Fragmente (RF) sind oben dargestellt und die gesamte RNA (TR) unten. Die roten Punkte stellen signifikant (adjustierter P-Wert von 0,05) veränderte Gene dar.

Da während dieser ersten Beurteilung der differentiellen Genanalyse kaum signifikante Unterschiede zwischen den miR-122-Proben und den LNA-Proben festgestellt wurden, konzentrierte sich die restliche Auswertung auf den Vergleich von HCV positiven und negativen Zellen. Im Folgenden wurden Sequenzen in die Auswertung einbezogen, die mindestens 25 und maximal 40 nt lang waren. Zudem mussten mehr als drei sequenzierte Fragmente an ein Gen gemappt haben, und die Sequenz durfte nur einer spezifischen Stelle im Genom zuzuordnen sein.

Die Hauptkomponentenanalyse wurde erneut mit den angepassten Parametern berechnet und ist graphisch in der Abbildung 3-29 gezeigt. Wie zuvor bilden die blauen RF- und die grauen TR-Proben zwei getrennte Hauptgruppen. Die Proben untereinander (HCV ▲ und miR-122 ●) weisen geringe Varianzen auf, sind jedoch gut als Gruppen identifizierbar. Es ist zu sehen, dass je eine miR-122-RF- und eine HCV-RF-Probe weiter abseits der Menge liegen. In den folgenden Analysen der zellulären Genexpression wurden deshalb alle Replikate in sämtlichen Kombinationen miteinander verglichen. Die Ergebnisse fielen jeweils sehr ähnlich aus, sogar, wenn die vermeintlichen Ausreißer nicht mit einbezogen wurden (nicht gezeigt).

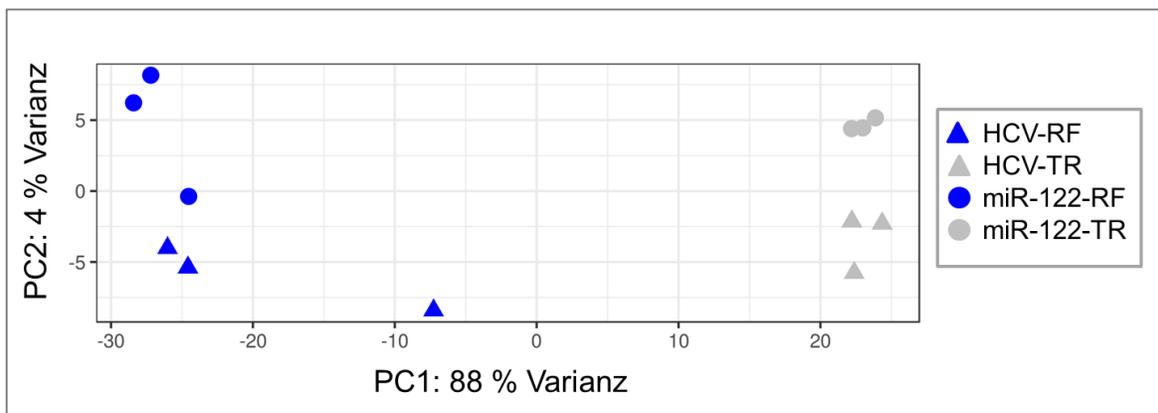


Abbildung 3-29: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der HCV infizierten Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen. Die erste Komponente (PC1) enthält den größten Anteil an der Gesamtstreuung (88 %), die zweite den zweit größten Anteil (PC2). Die von den Ribosomen geschützten RNA-Fragmente (RF) sind in blau dargestellt und die gesamte RNA (TR) in grau. Nur Sequenzen mit einer Länge zwischen 25 und 40 nt wurden einbezogen.

Mit Hilfe von Metagen-Analysen konnte die allgemeine Verteilung der Ribosomen auf den zellulären RNAs kontrolliert werden. Dabei wird der Durchschnitt aller translatierten ORFs in einer Graphik zusammengefasst, wobei die verschiedenen langen ORFs intern abgekürzt werden und so zusammen dargestellt werden können. Wie der Abbildung 3-30 zu entnehmen ist, verändert HCV die Translationsinitiation und -termination in den Zellen nicht. Bei beiden Proben beginnt vor dem Startcodon eine kleine Rampe, welche in einen Ribosomenpeak am Startcodon übergeht (A, C). Nach einem ca. 100 nt langen steilen Anstieg der gemappten Sequenzen sind die Ribosomen gleichmäßig über die codierenden Sequenzen verteilt. Am Stoppcodon (B, D) kommt es zu einem scharfen Abfall der Mengen an von Ribosomen gebundener RNA.

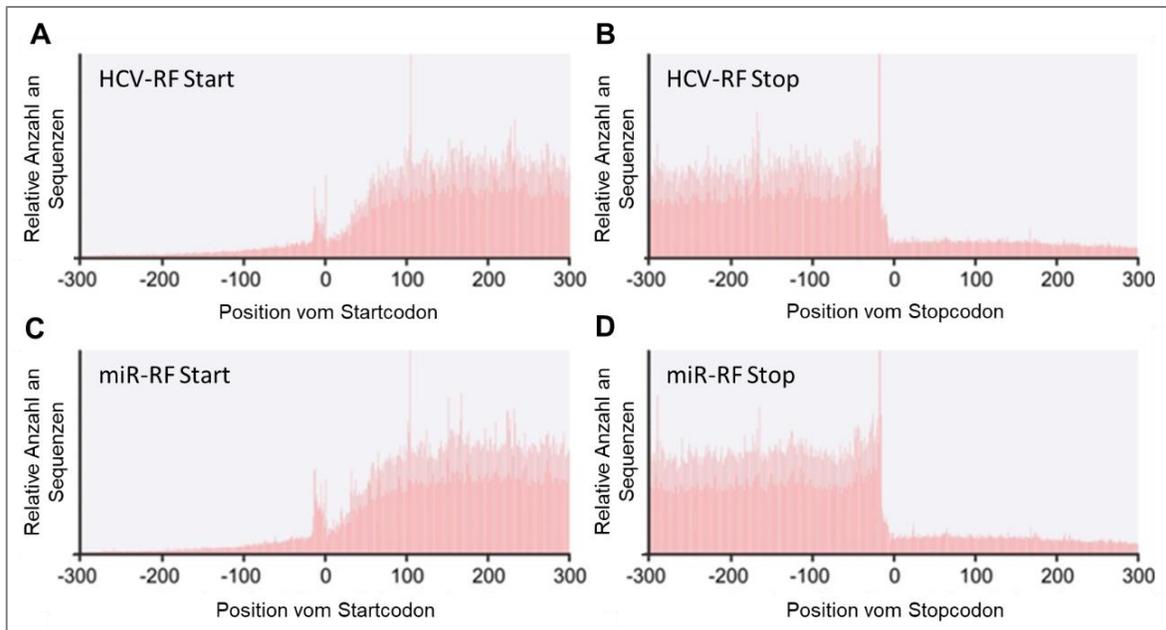


Abbildung 3-30: Metagen-Analyse des Profilings zur Kontrolle der Translationsinitiation und -termination. Aufgetragen ist die relative Anzahl an durchschnittlich gemappten RF-Sequenzen der HCV-Proben (A, B) und miR-122-Proben (C, D) gegenüber der Position von Startcodon (A, C) und Stoppcodon (B, D).

Im Folgenden soll auf die differenziell exprimierten Gene und Signalwege eingegangen werden.

Fazit: Die ersten bioinformatischen Analysen des Ribosome Profilings zeigten, dass die HCV- und miR-122-Proben differenzierbare Cluster bilden. Die anti-miR-122-LNA Proben hingegen bildeten zusammen mit den miR-122-Proben eine gemeinsame Gruppe. Die MA-Plots zur ersten Untersuchung der differenziell exprimierten Gene bestätigten, dass ausschließlich in den HCV-transfizierten Zellen nach sechs Tagen eine veränderte Genexpression detektiert werden konnte, nicht jedoch in den LNA-Proben, weswegen diese in folgenden Analysen nicht weiter berücksichtigt wurden. Die Metagen-Analysen zeigten eine erwartete Verteilung der Ribosomen über die ORFs aller Gene, so dass eine genauere Auswertung der Daten sinnvoll erschien.

3.3.2.2 Differenziell exprimierte Gene und Signalwege

Welche Gene signifikant differenziell in HCV infizierten Zellen, im Vergleich zu nicht-infizierten Proben, exprimiert sind, konnte mit Hilfe des Programms DESeq2 berechnet und durch das Programm Trips-Viz visualisiert werden. Insgesamt wurden nur Sequenzen mit einer Länge von mindestens 25 nt, welche einer spezifischen Stelle im Genom zugeordnet werden konnten, einbezogen. Es wurde eine z-Transformation angewendet, um die statistischen Variablen vergleichbar zu machen. Dies ist wichtig, da in niedrig exprimierten Genen, im Vergleich zu den hoch exprimierten, eine höhere Varianz der Proben zu erwarten ist. Sämtliche Gene wurden dafür zunächst nach ihrem Expressionslevel in 300 Gruppen eingeteilt und einzelne z-Werte berechnet.

In der Abbildung 3-31 A und B ist der Zweierlogarithmus des FC (also der Expressionsänderung) gegenüber dem berechneten geometrischen Mittel der Expressionsstärke aufgetragen. Einige besonders hoch exprimierte Gene sind auf der rechten Seite in hellgrau beschriftet. Die gelbe Linie markiert die Grenze der hoch signifikant differenziell regulierten Gene. Von den transkriptionell regulierten Genen (TR, A) sind in den HCV-infizierten Zellen insgesamt 14 Gene bedeutend hoch (grüne Punkte) und 6 herunter (rote Punkte) reguliert. Bei den translationell regulierten (RF, B) wurden 16 hoch und nur 3 Gene herunter reguliert, wobei einige mit den transkriptionell regulierten Genen überlappen. Auffällig ist, dass von den sechs transkriptionell runterregulierten Genen fünf mitochondrial codiert sind (MT-CO2, ND1, ND3, ND4 und ND4L). Alle regulierten Gene sind in C zusammengefasst.

Neben den in der Abbildung 3-31 gezeigten Genen, welche transkriptionell und/oder translationell messbar veränderte Expression zeigen, wurde weiterhin untersucht, welche Gene spezifisch auf translationeller Ebene reguliert sind. Für diesen Zweck wurde das Verhältnis der veränderten Expression zwischen der Translation und der Transkription gebildet, das heißt die Änderungsrate FC-RF geteilt durch FC-TR.

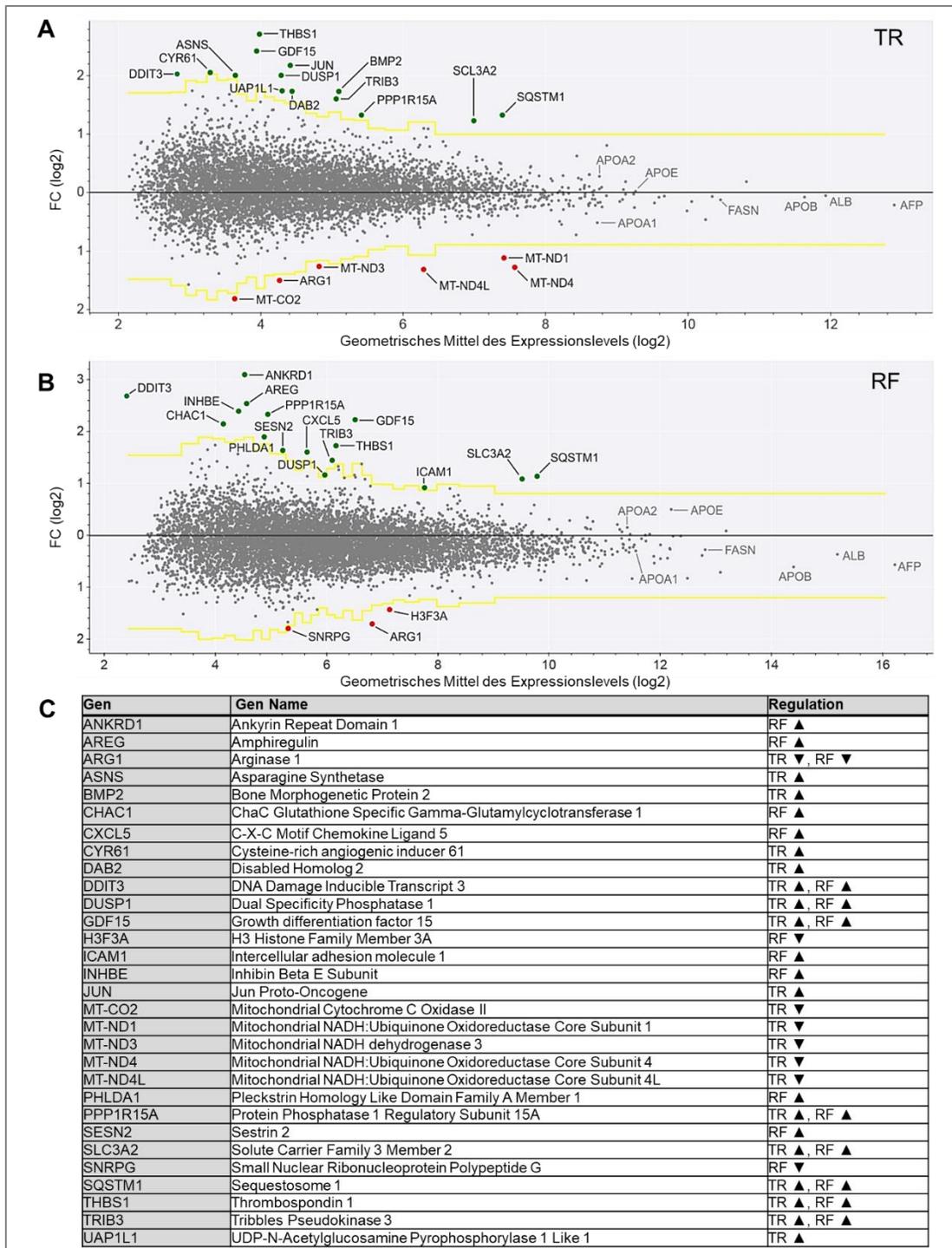


Abbildung 3-31: Differenzielle Genexpression in HCV infizierten Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen. Die Daten wurden nach Expressionsstärke in Gruppen aufgeteilt und individuelle z-Werte berechnet. Die gelben Linien markieren die Signifikanzgrenze. Aufgetragen wurde der Zweierlogarithmus (\log_2) der Änderungsrate (engl. *fold change*, FC) gegenüber dem berechneten geometrischen Mittel der Expressionsstärke. Die transkriptionell regulierten Gene (TR) sind in A, die translationell regulierten Gene (RF) in B zusammengefasst. Grüne Punkte markieren hoch und rote runter regulierte Gene. In C sind alle regulierten Gene genannt (▼ herunter reguliert, ▲ hoch reguliert).

Es konnten 14 Gene identifiziert werden, die eine signifikante Regulation der Translation aufwiesen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-32 zusammengefasst. Nur Gene, die jeweils bei den TR- und den RF-Proben einen angepassten p-Wert (engl. *adjusted p-value*, *padj*) von unter 0,05 aufweisen, wurden in die Berechnung einbezogen. Die translationelle Veränderung der Genexpression im Verhältnis zur transkriptionellen musste mindestens ein Drittel betragen (siehe A). Diese translationell regulierten Gene sind in B als Heatmap zur besseren Visualisierung dargestellt. Es fällt auf, dass die Translation insgesamt herunter reguliert ist, was auch an der Verteilung der Punkte relativ zur Nulllinie zu sehen ist (Abbildung 3-31 B). Nur zwei der Top 14 Kandidaten wurden translationell hoch reguliert (SLC7A1 und PPP1R15A). Auf der anderen Seite ist zu erkennen, dass die Genexpression allgemein bei allen in der Liste aufgeführten Genen während der HCV-Infektion hoch reguliert wurde. Als Beispiel ist zudem in C die Genexpression des translationell in HCV-infizierten Zellen runterregulierte ANKRD1 (Ankyrin Repeat Domain 1) gezeigt. Es ist zu sehen, dass die Proben der drei Replikate zusammenliegende Gruppen bilden und nahezu keine ANKRD1-RNA in den miR-122 Proben detektiert wurde. Bei der Betrachtung der HCV-Proben ist zu erkennen, dass ca. doppelt so viele Sequenzen in den TR im Vergleich zu RF-Proben detektiert wurden. Trotz deutlich gesteigener Transkription des Gens durch die HCV-Infektion ist die Translation also nicht proportional, sondern deutlich geringer angestiegen und das Gen somit zusätzlich auf translationeller Ebene reguliert.

Das ebenfalls in der Liste zu findende Gen PPP1R15A (Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A) ist dafür bekannt, translationell durch zwei 5' vom proteincodierenden Haupt-ORF gelegene kleine ORFs (engl. *upstream ORF*, uORF) reguliert zu werden. Aus diesem Grund wurde die Ribosomenverteilung auf dieser RNA im Folgenden genauer betrachtet.

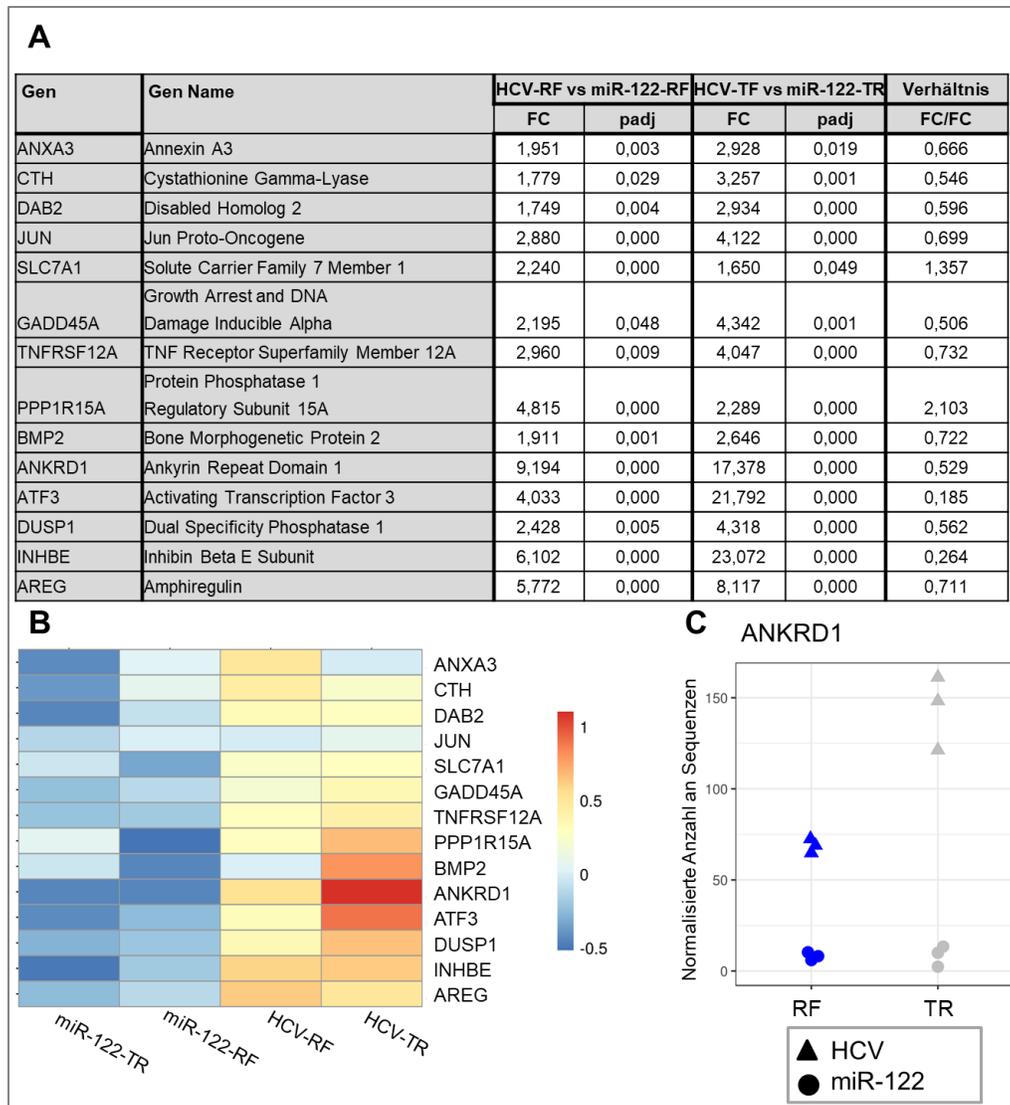


Abbildung 3-32: Translationelle Regulation in HCV-infizierten Zellen. 14 Gene konnten identifiziert werden die ein signifikant verändertes Verhältnis der Expression zwischen der Transkription und der Translation aufwiesen. Nur Gene die jeweils transkriptionell (TR) und translationell (RF) einen angepassten p-Wert (padj) von unter 0,05 aufweisen wurden in die Berechnung einbezogen. Die translationelle Veränderung der Genexpression im Verhältnis zur transkriptionellen musste mindestens ein Drittel betragen. **A:** Zusammenfassung der Gene mit ihren jeweiligen x-fachen Veränderungen (FC), dem p-Wert, sowie dem berechneten Verhältnis. **B:** Heatmap der Gene. **C:** Genexpression des translationell in HCV-infizierten Zellen runterregulierten ANKRD1.

Kurze uORFs inhibieren meist die Translation von mRNAs, bis Stresssituationen in der Zelle eine erhöhte Translation nötig machen. In der Abbildung 3-33 ist die Ribosomen-Verteilung auf der bereits genannten PPP1R15A-mRNA gezeigt. Zwei von Ribosomen besetzte uORFs im Leserahmen 1 (Raster gezählt vom 5'-Ende der mRNA) können auch

hier detektiert werden (weiße Striche markieren jeweils Startcodons und graue Stoppcodons). Der Tabelle in Abbildung 3-32 A ist zu entnehmen, dass die Transkription des Gens in HCV-infizierten Zellen bereits etwas mehr als doppelt so hoch ist. Demnach ist auch insgesamt die Translation durch die Menge an verfügbarer RNA erhöht. Bei der Betrachtung der Ribosomen-Verteilung erkennt man jedoch, dass auf den uORFs in den HCV-Proben (rot) im Verhältnis deutlich weniger Ribosomen sitzen als auf dem eigentlichen ORF (Leserahmen 3). Es kommt also erkennbar zur hochregulierten Translation des Gens.

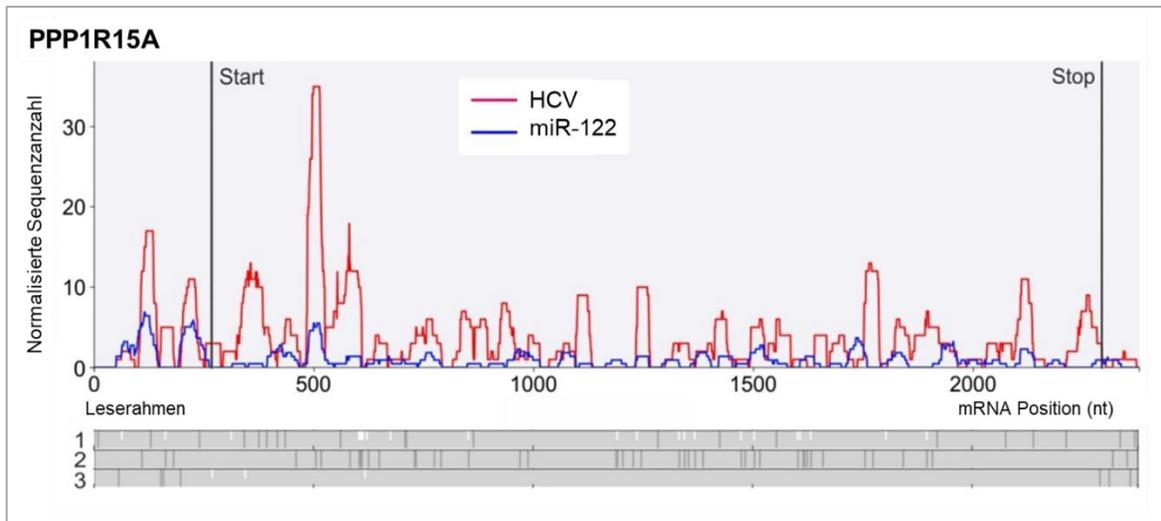


Abbildung 3-33: Detaillierte Analyse der Ribosomen-Verteilung auf dem durch 5'-gelegene ORFs (uORF) regulierten Gen PPP1R5A. Die normalisierte Anzahl an gemapten Sequenzen ist gegenüber der mRNA Position aufgetragen. Die rote Linie repräsentiert die Ribosomen-Verteilung in HCV-infizierten und die blaue Linie in nicht-infizierten Huh-7.5-Zellen. Die drei unter dem Graph abgebildeten Leserahmen zeigen die Position von Startcodons (weißer Strich) und Stoppcodons (grauer Strich), Zählung beginnend mit Nucleotid 1 der mRNA.

KEGG-Analysen (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) ermöglichten die Identifizierung der durch die HCV-Infektion regulierten Signalwege in den Huh-7.5-Zellen. Die am stärksten regulierten Wege ($p \leq 0,05$) umfassen unter anderem die Osteoklasten-Differenzierung (hsa04380), den MAPK-Weg (hsa04010), den TGF- β -Weg (hsa04350), den Retinol-Metabolismus (hsa00830), den p53-Weg (hsa04115) und die ErbB-Aktivierung (hsa04012). In der Abbildung 3-34 ist beispielhaft ein Ausschnitt des Retinol-Metabolismus-Signalweges dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die ionisierte Retinsäure durch verschiedene hochregulierte Cytochrome P450 (CYP, grün) in unterschiedliche Endprodukte abgebaut wird, was die Vermutung nahelegt, dass die Retinsäure-Konzentration in den Zellen dadurch sinkt.

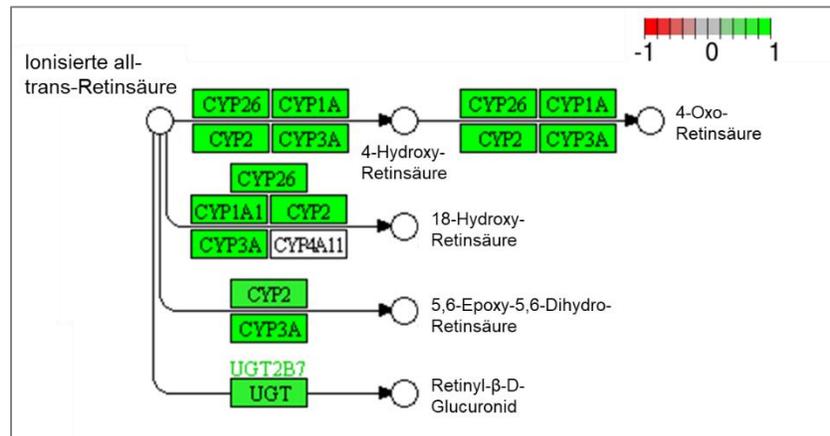


Abbildung 3-34: Ausschnitt des signifikant regulierten Retinol-Metabolismus. Hochregulierte Gene sind grün unterlegt, nicht detektierte weiß. CYP: Cytochrom P450

Auf die Darstellung der anderen Signalwege soll an dieser Stelle verzichtet werden.

Fazit: Insgesamt zeigte sich keine extrem starke Veränderung der Genexpression in HCV-infizierten Huh-7.5-Zellen 6 Tage nach der Transfektion. Einige spezifische Gene wurden hingegen signifikant sowohl auf transkriptioneller als auch translationeller Ebene reguliert. Hochreguliert wurden vor allem ER-Stress-induzierte Gene, welche die mit der HCV-Replikation oder mit der Krebsentstehung in Verbindung stehen, und herunterreguliert wurden solche Gene, die in Mitochondrien codiert sind. Verschiedene Signalwege wurden ebenfalls von der viralen Infektion beeinflusst, wobei auf all dies in der Diskussion näher eingegangen werden soll.

4 Diskussion

Interaktionen zwischen verschiedenen Faktoren bilden das Fundament für sämtliche biologischen Prozesse in der Natur. Nicht nur auf globaler und zellulärer Ebene sind solche Wechselbeziehungen von immenser Bedeutung, sondern auch für virale Replikationsmechanismen. Viele zelluläre Interaktionspartner sind noch nicht bekannt und auch die Hintergründe der Wechselwirkungen und Funktionen häufig kaum näher charakterisiert. In der HCV-Forschung stellt dieses Gebiet einen wichtigen Forschungsbereich dar, zur Entschlüsselung pathogener Mechanismen und zur Entwicklung neuer antiviraler Therapien.

Vorangegangene Studien zeigten die Abhängigkeit des HCV von einigen zellulären Faktoren, wie den Rezeptoren für die Anlagerung des Virus an die Wirtszellen, den Proteinen zur Bildung des MW, verschiedenen Lipoproteinen und vor allem der miR-122. Es ist bekannt, dass die miR-122-Anlagerung an die HCV 5'UTR unter anderem zur Stabilisierung und Translationsförderung führt, aber nicht, welchen Einfluss die anderen Bindungsstellen im viralen Genom haben. Neue Methoden wie NGS und große Proteomik-Analysen ermöglichen es, Informationen über Veränderungen in infizierten Zellen zu erlangen. Wie genau die transkriptionelle und translationelle Anpassung genomweit abläuft und wie es im Detail zur Entstehung von HCV-induziertem HCC kommt, ist bis heute nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, zunächst die Interaktion zwischen der leberspezifischen miR-122 und den bisher nur wenig untersuchten Bindungsstellen in der NS5B-codierenden Region und der 3'UTR des HCV-Genoms näher zu beleuchten. Des Weiteren konnte der Einfluss der HCV-Infektion auf die zelluläre Genexpression mit Hilfe der Ribosome Profiling Methode näher analysiert werden, um mögliche Umprogrammierungen in der Zelle zu detektieren und neue Interaktionspartner zu identifizieren.

4.1 Funktioneller Einfluss der miR-122-Bindung an das HCV-Genom

Zelluläre microRNAs spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation verschiedener Prozesse, da sie unter anderem die Stabilität und Translation von anderen RNAs beeinflussen können. Infizieren Viren eine Zelle, werden sie selbst teils stark von miRNAs reguliert, entweder direkt durch die Bindung dieser an die virale Nukleinsäure oder indirekt durch den Einfluss von miRNAs auf die zellulären Gene. Manche Viren machen sich

bestimmte zelluläre ncRNAs zu Nutze, sind abhängig von ihnen oder codieren sogar selbst für solche [261,262].

Die HCV-Replikation ohne Anwesenheit der leberspezifischen miR-122 ist nur auf sehr basalem Level möglich [207], ihre Wirkung trägt also vermutlich deutlich zum Lebertropismus des Virus bei. Sowohl in Zellkultur als auch in Patienten kann mittels Abfangen der miR-122 die HCV-RNA-Akkumulation signifikant reduziert werden [32,263]. Die miR-122 wirkt nicht nur indirekt durch die Modellierung des Lipidhaushaltes der Hepatozyten [151] auf den Replikationszyklus des Virus, sondern auch direkt aufgrund der Bindung an Zielsequenzen im HCV-Genom [32]. Diese Anlagerung erfolgt in einem Komplex mit Ago2 an mindestens fünf konservierte Bindungsstellen im viralen Genom [190–194].

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass sich die positive Gesamtwirkung der miR-122-Bindung an die HCV 5'UTR aus mehreren Effektorfunktionen zusammen setzt: die virale RNA wird vor Degradierung geschützt, die Formierung der IRES und die Effizienz der Translation maßgeblich erhöht sowie die Replikation gefördert [200,34,205,195,203,33]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden miR-122-Zielsequenzen S1 und S2 in der 5'UTR des HCV-Jc1 einzeln mutiert und die Auswirkungen untersucht (siehe Abbildung 3-6 und Abbildung 3-7). Einige der genannten Erkenntnisse konnten dabei bestätigt werden. Sowohl nach zwei als auch nach drei Tagen wurden mittels Western Blot keine viralen Proteine bei den S1- und S2-Mutanten detektiert (Abbildung 3-6, Spur 1 und 2). Zudem konnten keine infizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop gefunden werden (Abbildung 3-7). In verschiedenen RT-qPCRs zeigte sich, dass keine detektierbaren Mengen an Minussträngen gebildet und die eingebrachten Plusstränge schneller abgebaut wurden (Daten nicht gezeigt, [35] und L. Shalamova - unveröffentlicht). Insgesamt scheinen sehr viele Faktoren zusammen dafür zu sorgen, dass der Replikationszyklus so stark gestört wird, dass nahezu keine viralen Partikel mehr gebildet werden können.

4.1.1 Die miR-122-Bindung an die NS5B-codierende Region und 3'UTR

In den letzten Jahren wurden weitere konservierte miR-122-Zielsequenzen im hinteren Ende des HCV-Genoms identifiziert [191,206,190]. Über die mögliche Funktion der Anlagerung des miRNPs an die hoch konservierten Bindungsstellen in der NS5B-codierenden Region (5B.2 und 3) und an die VR der 3'UTR ist nur wenig bekannt, weshalb sie im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden sollten.

Die Zielsequenzen in der Jc1-RNA wurden zunächst separat mutiert und zusammen mit den bereits genannten S1- und S2-Mutanten untersucht. Zwei Tage nach der

Transfektion der Huh-7.5-Zellen mit der HCV-RNA konnten sowohl im Western Blot (Abbildung 3-6, A) als auch in der Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 3-7) nur leichte Unterschiede in der Signalstärke zwischen 5B.2m, 5B.3m und S3m detektiert werden. Drei Tage nach der Transfektion dagegen zeigte sich im Western Blot ein größerer Unterschied (Abbildung 3-6, B). Der Wt zeigte deutlich stärkere NS3- und Core-Proteinbanden als die eingesetzten Mutanten, was besonders im Vergleich zu 5B.2m und 5B.3m deutlich wurde.

Um genauere Untersuchungen zu ermöglichen, wurden im Folgenden auch eine 5B-Doppelmutante und eine Dreifachmutante 5B.2/3/S3m eingesetzt. Die Western Blot Ergebnisse nach drei Tagen (Abbildung 3-8, A) zeigten die selbe Verteilung an Proteinmengen für die Einzelmutanten 5B.2 und 5B.3 wie zuvor (Abbildung 3-6, B). Bei der Doppel- und Dreifachmutante konnten, wie bei S3m, vergleichbar starke Banden detektiert werden. Fünf Tage nach der Transfektion wurden dagegen stärkere Unterschiede sichtbar (Abbildung 3-8, B). Die geringsten Mengen an viralem Protein konnte bei 5B.2m, gefolgt von 5B.3m, detektiert werden. Zwischen Wt, S3m sowie der Dreifachmutante zeigten sich keine auffälligen Unterschiede. Die Doppelmutante hingegen wies deutlich stärkere Banden auf. Die Menge an detektierten Proteinen spiegelte sich ebenfalls in der gemessenen Anzahl an HCV-Genomen wider (Abbildung 3-9). Demnach ist die Replikation des Genoms möglicherweise ein Grund für die detektierten Proteinmengen, da bereits unterschiedliche Mengen an viraler RNA für die Translation zur Verfügung standen. Für die Doppelmutante wurden am meisten Genome detektiert. Die Dreifachmutante und S3m wiesen annähernd keine Unterschiede zum Wt auf, 5B.3m zeigte leicht verringerte Mengen an RNA.

Den stärksten Unterschied im Vergleich zum Wt wies die 5B.2-Mutante mit halb so vielen HCV-Genomen auf und zeigte somit den am stärksten signifikanten negativen Einfluss der Mutation der miR-122-Bindungsstelle auf den Replikationszyklus. Dies widerspricht den von Naseri *et al.* publizierten Ergebnissen, in denen die Autoren zwar ebenfalls einen deutlichen Effekt für die mutierte 5B.2m-Bindestelle zeigten, jedoch in der RT-qPCR eine Steigerung des RNA-Levels sowohl nach 72 h als auch nach 120 h detektierten und zusätzlich eine erhöhte Translation maßen [206]. Eingesetzt wurden dort jedoch Luziferase-Reporterkonstrukte mit einer Genotyp 1 (Con1) NS3 – 3'UTR-Sequenz. Dies ist eine mögliche Erklärung für die detektierten Unterschiede, da bereits gezeigt werden konnte, dass sowohl der Genotyp als auch viele RNA-RNA-Interaktionen über längere Strecken des Genoms Einfluss auf die miR-Bindung und den damit zusammenhängenden Effekt haben [194]. Außerdem können weitere Proteine, die sich an den miRNP-Komplex oder die virale RNA anlagern, zu Veränderungen der Replikation führen, oder auch der untersuchte Zeitpunkt nach der Infektion und somit das Stadium des

Replikationszyklus. Eine im Jahr 2019 von Bernier und Sagan veröffentlichte Studie bestätigt wiederum die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse [196]. So wurden bei einer Mutation der 5B.2-Sequenz weniger virale Proteine, weniger akkumulierte HCV-RNA und zudem weniger Virionen detektiert. Es zeigte sich, dass durch Einsatz komplementär mutierter miR-122 die ursprüngliche Fitness des Virus nicht wiederhergestellt werden konnte, was darauf schließen lässt, dass möglicherweise auch die Sequenz an sich, beispielsweise für andere Interaktionen, von Bedeutung ist.

Weitere Experimente zur genaueren Analyse der Funktion der einzelnen Bindungsstellen wären an dieser Stelle wünschenswert. Der Einsatz von kompensierenden miR-122-5B.2m sollte in dem hier eingesetzten vollständigen System getestet werden, um zu überprüfen, ob so die Infektiosität und Replikation des Virus wiederhergestellt werden kann. Zudem könnten RT-qPCRs zur Detektion von produzierten Minussträngen zu verschiedenen Zeitpunkten eingesetzt werden, um die Replikationsabhängigkeit genauer zu analysieren, und auch der Einsatz von Polymerase-defizienten Konstrukten zur Überprüfung der Translation und RNA-Stabilität wäre denkbar.

Insgesamt scheint die Interaktion von miR-122/Ago2-Komplexen mit den Bindungsstellen im HCV-Genom sehr komplex zu sein. Es ist gut vorstellbar, dass je nach Stadium im Replikationszyklus die Bindung an die verschiedenen Zielsequenzen im HCV-Genom von unterschiedlich starker Bedeutung ist. Aufgrund der Anlagerung des miRNP-Komplexes an die virale RNA kann es zur Veränderung der Sekundärstruktur der RNA kommen und somit zu Verschiebungen der Wechselwirkungen mit anderen RNA-Bereichen sowie Proteinen. Da die miR-Anlagerung von der Zugänglichkeit der RNA anhängig ist, kann es so zu einem dynamischen Wechsel zwischen verschiedenen Strukturen und Ereignissen kommen [194].

4.2 Ribosome Profiling mit HCV-infizierten Zellen

Der Körper eines erwachsenen Menschen besteht aus ~20 Billionen Zellen und lässt sich in verschiedene Organe und mehrere hundert Zelltypen einteilen [264]. Die Zelltypen unterscheiden sich in ihren Aufgaben zum Teil immens voneinander und basieren doch alle auf einer einzelnen Zygote. Die DNA-Sequenz der differenzierten Zellen ist größtenteils gleich, wohingegen die akkumulierten RNA- und Protein-Moleküle sehr stark variieren [157]. Dies zeigt, von welcher enormen Bedeutung die Regulation der Genexpression in der Entwicklung ist. Kommt es zu externen Stimuli wie Hormonausschüttungen, Temperatur- oder Sauerstoffveränderungen, Infektionen oder malignen Transformationen, müssen die Zellen spezifisch reagieren können, um Krankheiten des Organismus abzuwenden.

Bei einer HCV-Infektion kommt es zu einer komplexen Interaktion zwischen dem Wirt und dem Virus, welche sowohl zu einer Eliminierung als auch zu einer Persistenz des Virus und somit zu einer chronischen Infektion führen kann [265]. Welche Veränderungen der Genexpression in den Hepatozyten genau ablaufen und somit zu Folgeerkrankungen führen können, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Aus diesem Grund wurden Ribosome Profiling Experimente durchgeführt, um detailliertere Erkenntnisse über die transkriptionelle und translationelle Regulation in HCV-infizierten Zellen zu erlangen.

4.2.1 Durchführung der Ribosome Profiling Experimente

Die Methode des Hochdurchsatz NGS bildet die Basis für verschiedenste Analysen wie der Genom- und Transkriptom-Sequenzierung. Sie stellt allerdings auch neue Anforderungen an die experimentelle Durchführung und Auswertung der generierten Daten. Zwei Ribosome Profiling Durchläufe mit zwei bzw. drei Replikaten wurden während der experimentellen Arbeiten für diese Dissertation sequenziert und analysiert.

In mehreren vorangegangenen Testläufen (nicht gezeigt) wurden einige Details am Versuchsaufbau angepasst und im Vergleich zu dem ursprünglichen Ingolia-Protokoll verändert [260]. Eine der wichtigsten Anpassung war die Isolierung der auf der RNA mit Cycloheximid arretierten 80S-Ribosomen durch Ultrazentrifugation und Gradienten-Fraktionierung. So konnte nicht nur die Wirkung des Cycloheximids überprüft werden, sondern auch solche RNAs von späteren Analysen ausgeschlossen werden, an welche andere Proteine als Ribosomen gebunden hatten [266]. Aufgrund der zusätzlichen Selektionsschritte musste jedoch auch mehr Ausgangsmaterial verwendet werden.

Obwohl alle Schritte des ersten Durchlaufs genau kontrolliert wurden, machte die Auswertung deutlich, dass es hohe Varianzen zwischen den zwei angefertigten Replikaten gab (siehe 3.3.1). Die Ähnlichkeit der einzelnen Proben eines Replikates waren größer als die der gleich behandelten Proben untereinander (Abbildung 3-20). Mehrere Gründe sind hierfür vorstellbar, die vermutlich in unterschiedlichem Maße zu diesem Ergebnis beigetragen haben. Die Transfektion der Zellen könnte bereits unterschiedlich effizient gewesen sein, wodurch von Anfang an ungleiche Bedingungen geherrscht haben. Bei der Elektroporation sterben 30 – 60 % der eingesetzten Zellen abhängig vom pH-Wert, der Temperatur und weiteren Faktoren [267], so dass es zu verschiedenen Konzentrationen an Ausgangsmaterial gekommen sein kann. Zudem wurden unterschiedliche Zellpassagen für die zwei Replikate des ersten Experiments verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass sich je nach Alter und Zellstatus die Morphologie der Zellen verändern kann, sie unterschiedlich auf externe Stimuli reagieren, verschieden stark wachsen und eine andere Proteinexpression aufweisen [268,269]. Ebenso wurde jeweils frisch angesetztes 10 %iges

DMEM in den Experimenten verwendet. Seren wie FBS sind von Charge zu Charge unterschiedlich und können mit ihren über 1000 Komponenten eine sehr hohe Variabilität in den Zellen hervorrufen. Es ist bekannt, dass bereits im picomolaren Bereich veränderte Hormonkonzentrationen starke Auswirkungen auf den Stoffwechsel von einigen Zellen haben [270,271]. Auch die Erstellung der Bibliotheken kann zu Differenzen geführt haben. Abweichungen in den Inkubationszeiten, leicht veränderte Lösung der Nukleinsäuren aus den Gelen, etwas unterschiedliches Ausschneiden der Banden, unterschiedliche Chargen der verwendeten Enzyme und Variationen bei der PCR-Amplifikation können dazu beigetragen haben. Die Sequenzierung selbst erfolgte zu unterschiedlichen Zeiten, hat eine Fehlerrate von bis zu 0,1 % und kann durch die Anzahl an Sequenzen nur einen Teil der Fragmente darstellen [272]. Zudem sind zwei Replikate sehr wenig, um signifikante Ergebnisse zu generieren. Einer Studie zufolge werden selbst bei drei Replikaten nur 20 – 40 % der signifikant differenziell exprimierten Gene gefunden, und es wird empfohlen, mindestens sechs Replikate anzufertigen [273]. Insgesamt sorgten also vermutlich mehrere Faktoren für die hohe Varianz der Proben zwischen den ersten zwei Replikaten, die zu keinem auswertbaren Ergebnis führten.

Im zweiten Durchlauf wurde deswegen alles parallel durchgeführt und immer jeweils mit genau den gleichen Zellen und Lösungen gearbeitet, um möglichst geringe experimentelle Varianz einzubringen. Sieht man sich den PCA-Plot an, ist zu erkennen, dass die gleich behandelten Proben in jenem Durchlauf Gruppen bildeten, sich aber dennoch untereinander leicht unterschieden (Abbildung 3-27 und Abbildung 3-29).

Zusammenfassend sollten dementsprechend viele Faktoren beim Durchführen solcher NGS-Experimente bedacht und mindestens drei Replikate angefertigt werden.

4.2.2 Einfluss der miR-122 auf die Genexpression in Huh-7.5-Zellen

Die miR-122 ist die abundanteste miRNA in adulten Hepatozyten. Sie reguliert unter anderem den Fettsäuremetabolismus und INF-Signalwege und ist als Tumorsuppressor aktiv, in dem sie zur Differenzierung der Hepatozyten beiträgt. Durch miR-122-*knock-out* Versuche in Mäusen und Sequestrierungen zeigte sich eine Absenkung des Cholesterolllevels und die Entstehung von Erkrankungen der Leber, wie Fibrose und Krebs [274]. HCV bindet die miR-122 und macht sie so in der Zellkultur für zelluläre Ziel-mRNA unzugänglich, was das onkogene Potenzial des Virus zu verstärken scheint [190]. In Studien mit Patienten-Biopsien zeigte sich jedoch, dass in HCV-induziertem HCC die miR-122-Menge im Vergleich zu gesunden Leberzellproben sogar erhöht sein kann [275,276]. In welchem Umfang die Hepatozyten das Abfangen der miRNA durch die virale RNA ausgleichen

können und wie sich letztlich dabei die zelluläre Genexpression ändert, ist nicht genau erforscht.

Die von Jochen Bathke durchgeführten PCA, MA-Plots und differenziellen Genanalysen zeigten wider Erwarten keine signifikanten Unterschiede zwischen der miR-122- und der anti-miR-122-LNA-Probe (Abbildung 3-27 und Abbildung 3-28). Ein Grund dafür könnte sein, dass insgesamt noch genug an freier miR-122 in den LNA behandelten Zellen zur Verfügung stand, um die Genregulation weitestgehend aufrecht zu erhalten. Je nach Replikat konnten im Vergleich zur nicht behandelten Probe noch 3 – 5 % der miR-122 mit Hilfe der RT-qPCR detektiert werden (Abbildung 3-23). Außerdem handelt es sich bei den Huh-7.5-Zellen um HCC-Zellen, welche zum einen aufgrund ihrer hohen miR-122- und CD81-Expression, zum anderen wegen einer Mutation im RIG-I-Gen und dem damit einhergehenden Defekt der Interferon-Antwort, speziell für die HCV-Replikation in Zellkultur entwickelt wurde. Da die miR-122 auch zur Krebsentstehung beitragen kann und die Interferonbildung unterstützt, wäre es möglich, dass der Einfluss in den verwendeten Huh-7.5-Zellen deutlich geringer ausfällt oder zum Teil gar keinen Einfluss auf die Genexpression zeigt, als es bei anderen Hepatozyten-Zelllinien der Fall wäre.

Weitere RT-qPCR Experimente wären hier angebracht, um spezielle miR-122-Zielgene nach Behandlung mit LNAs in Huh-7.5-Zellen und einer anderen Leberzelllinie als Vergleich zu messen, um genauere Aussagen treffen zu können.

4.2.3 Einfluss der HCV-Infektion auf die Genexpression in Huh-7.5-Zellen

Mehrere veröffentlichte Studien zeigten, dass die virale Infektion mit dem HC-Virus Folgen für verschiedene zelluläre Abläufe hat und somit die Homöostase stören und Erkrankungen wie Zirrhosen und HCC auslösen kann [218]. Die Details, wie sich der HCV-Replikationszyklus auf die transkriptionelle und translationelle zelluläre Antwort auswirkt, sind aber bis jetzt nicht vollständig geklärt. Ein Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit lag deshalb auf der Analyse des Einflusses einer HCV-Infektion auf die zelluläre Genexpression [259,277].

Durchgeführte Metagen-Analysen zeigten zunächst die durchschnittliche Verteilung der Ribosomen auf den zellulären, translatierten ORFs (Abbildung 3-30). Dabei wurde deutlich, dass eine Infektion mit HCV die globale Translationsinitiation und -termination in den Huh-7.5-Zellen nicht maßgeblich beeinflusst. Nach dem Startcodon ist in allen Proben zunächst eine ca. 100 nt lange Rampe detektiert worden, bevor es zur gleichmäßigen Verteilung der Ribosomen über die ORFs kommt. Dies liegt vermutlich daran, dass die ersten 30 – 50 Codons eines ORFs nur sehr ineffizient translatiert werden und somit eine

Aufstauung von Ribosomen verhindert wird [278]. Hinter den Stoppcodons konnten erwartungsgemäß nahezu keine Ribosomen in den UTRs detektiert werden.

Unabhängig von einer HCV-Infektion wurden einige Gene besonders hoch in den Huh-7.5-Zellen exprimiert (Abbildung 3-31, A und B in grau). Am stärksten exprimiert wurde AFP (Alpha Fetoprotein), welches vor allem in der fötalen und neonatalen Leber exprimiert wird, jedoch auch bei Leberschäden und HCC. Es wird deswegen auch als diagnostischer Tumormarker und als möglicher Ansatz für Immuntherapie verwendet [279]. Da es sich bei den hier eingesetzten Zellen um eine Tumorzelllinie handelt, kann AFP ebenfalls als Tumormarker angesehen werden. Das stark exprimierte Albumin (ALB), sowie die Fettsäuresynthetase (FASN) und verschiedene Apolipoproteine sind charakteristisch für Leberzellen und zeigen, dass die Huh-7.5-Zellen nach wie vor hepatozytische Expressionsmuster aufweisen [259].

Im Folgenden soll auf die differenziell regulierten Gene und Signalwege näher eingegangen werden.

4.2.3.1 Differenziell regulierte Gene

Insgesamt zeigte sich, dass eine chronische HCV-Infektion nur einen recht geringen Einfluss auf die Genexpression der Huh-7.5-Zellen hatte, denn sechs Tage nach der Transfektion mit der Jc1-RNA wurden nur wenige signifikant differenziell regulierte Gene detektiert (siehe Abbildung 3-31). Als chronisches Virus vermeidet HCV möglicherweise eine allumfassende Umprogrammierung der Zelle, um zu verhindern, dass eine starke Immunantwort gebildet wird und die Wirtszellen in Apoptose gehen. Dies ermöglicht es dem Virus höchstwahrscheinlich, sich teils unbemerkt in der Leber zu vermehren.

Signifikant auf transkriptioneller beziehungsweise translationeller Ebene herunter reguliert waren nur acht Gene (siehe Abbildung 3-31). Eines dieser Gene ist die Arginase ARG1, welche den finalen Schritt des Harnstoffzyklus katalysiert und Arginin zu Ornithin und Harnstoff abbaut. Diese Reaktion spielt zudem eine Rolle in der Suppression der Immunantwort durch Verminderung des bioverfügbaren Stickstoffgehaltes (in Form von Arginin) im Extrazellularraum [280]. Man könnte also spekulieren, dass durch die Reduzierung der Expression von ARG1 mehr intrazelluläre AS für die HCV-Replikation und das Zellwachstum zur Verfügung stehen. Ebenfalls herunter reguliert ist H3F3A, eine Isoform von Histon H3, welches eine Rolle für die Struktur der Nukleosomen spielt. Ein Zusammenhang zwischen HCV/HCC und H3F3A ist bisher nicht bekannt, jedoch stehen Mutationen im H3F3A-Gen mit verschiedenen Krebsarten in Verbindung [281]. Das translationell negativ regulierte SNRPG spielt eine wichtige Rolle bei dem Zusammenbau

des Spleißosoms. Ungleichgewichte in der Expression von Spleißingfaktoren können zu einer Heterogenität in den Hepatozyten führen und so ebenfalls die Krebsentstehung fördern [282].

Interessanter Weise codieren die anderen auf transkriptionellem Level signifikant herunter regulierten Gene für Untereinheiten des Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, NADH-Dehydrogenase, MT-ND) und des Komplex IV (Cytochrom c/O₂-Oxidoreduktase, Cytochrom-C-Oxidase, MT-CO) der mitochondrialen Atmungskette. MT-ND1, MT-ND3, MT-ND4, MT-ND4L und MT-CO2 sind allesamt Bestandteile des enzymatischen Kerns der Komplexe und in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert [283–285]. Diese stark hydrophoben Membranproteine sind essentiell für den Redoxmetabolismus und werden neben acht weiteren Proteinen direkt von den Mitochondrien codiert, was eine schnelle und effektive Regulation der Genexpression ermöglicht [286]. Diese frühe Beeinflussung des zellulären Metabolismus könnte in HCV-infizierten Zellen zum oftmals in Tumorzellen observierten Warburg-Effekt beitragen und die Krebsentstehung fördern (siehe 4.2.3.4, Abbildung 4-1) [277]. Das Virus hätte durch die Umprogrammierung der Zellen möglicherweise mehr anabole Metabolite wie Ribosen, AS und Lipide zur Verfügung und könnte besser replizieren.

Die bei der HCV-Infektion signifikant hoch regulierten Gene stehen vor allem in Verbindung mit dem ER-Stress, der Beeinflussung von verschiedenen Signalwegen, der HCV-Replikation und der Karzinogenese.

ANKRD1 wird durch Stress, NS5A und Calciumausschüttung höher exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme der HCV-Partikel in die Hepatozyten, was vermutlich am Einfluss auf den Lipidmetabolismus der Zelle liegt [287]. ASNS bildet ATP-abhängig Asparagin aus Aspartat und wird bei Stress, Hypoxie und Aminosäuremangel vermehrt gebildet [288]. HCV könnte (wie bei ARG1) so zusätzlich mit AS versorgt werden. BMP2 ist in die Osteoblasten-Differenzierung involviert und aktiviert zudem Kinasen, welche für die eIF2-Phosphorylierung und damit einhergehend die Inhibierung der zellulären Translation zuständig sind [289]. An der Regulation der oxidativen Homöostase der Zelle ist CHAC1 durch Degradierung von Glutathion beteiligt. Der erhöhte Verbrauch von Glutathion spielt eine Rolle bei der Einleitung der Apoptose, wodurch CHAC1 zu den pro-apoptotischen Faktoren der Antwort auf ungefaltete Proteine der ATF/DDIT3-Kaskade gehört [290]. DAB2 ist ein Adapterprotein der LDL-Rezeptoren und nimmt so Einfluss auf die Clathrin-vermittelte Endozytose [291]. DDIT3 reguliert die Autophagie und Apoptose und hat einen positiven Effekt auf die Genexpression von spezifischen Genen wie PPP1R15 (siehe unten) [292].

Das ebenfalls hoch regulierte DUSP1 ist an der Dephosphorylierung der MAPK beteiligt und wirkt somit auf Stressoren wie HCV, indem es unter anderem die INF-Antwort unterdrückt [293]. INHBE gehört ebenfalls zur TGF-Familie, wird vor allem in der Leber exprimiert und inhibiert die Proliferation, die DNA-Synthese und die Insulinresistenzbildung [294]. Es könnte dementsprechend das HCV-induzierte Zellwachstum hemmen und es so dem Virus ermöglichen, sich länger versteckt zu vermehren. PHLDA1 wird durch ER-Stress induziert und hat gewebespezifische Rollen bei der Förderung oder Verminderung des Wachstums und der Metastasierung von Krebszellen [295]. PPP1R15A ist eine Untereinheit der eIF2-Phosphatase, welche die eIF2-Kinase antagonisiert [296]. Während einer HCV-Infektion sorgt die oszillierende Expression der beiden Enzyme für eine Regulation der globalen zellulären Translation durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Initiationsfaktors [297]. Besonders für die Erholungsphasen der Zellen nach und während der Stressinduktion spielt das Protein eine wichtige Rolle. SESN2 reguliert verschiedene metabolische Prozesse und spielt eine Rolle beim Schutz gegen oxidativen und genotoxischen Stress. Es kann vermutlich sowohl die Translation als Antwort auf den ER-Stress herunter regulieren als auch die Transkription für antioxidative Enzyme durch Nrf2-abhängige metabolische Umprogrammierung steigern [298]. TRIB3 kontrolliert die Stressantwort, Überlebensmechanismen der Zelle und metabolische Prozesse [299]. Bei zunehmendem ER-Stress ruft TRIB3 die Apoptose der Zelle durch negative Regulation des Akt-Signalwegs hervor. In HCV-infizierten Hepatozyten steigt zwar die Genexpression von TRIB3, sowohl auf mRNA- als auch Protein-Ebene an, jedoch stört NS3 den TRIB3-Akt-Weg, sodass das Virus die Apoptose der Zelle inhibiert und weiter replizieren kann [300].

Einige der in den infizierten Huh-7.5-Zellen hoch regulierten Gene sind dafür bekannt, in direktem Zusammenhang mit der Kanzerogenese zu stehen und teils sogar speziell die HCC-Entstehung zu fördern. CXCL5 gehört zur Gruppe der Chemokine und fördert die Proliferation sowie die Migration von Krebszellen [301]. In den Lipidmetabolismus ist CYR61 involviert und unterstützt zudem die Bildung eines metastatischen Phenotyps von Krebszellen [302]. Das Protoonkogen JUN reguliert eine Vielzahl an zellulären Aktivitäten wie Proliferation, Apoptose, Tumorgenese und Morphogenese. Es ist der am frühesten beschriebene onkogene Transkriptionsfaktor [303]. SLC3A2 spielt bei der metabolischen Umprogrammierung der Zellen eine Rolle und wird durch ER-Stress induziert. Es handelt sich um einen AS-Transporter, welcher direkt von dem Onkogen MYC reguliert wird und durch verstärkten Transport von Aminosäuren für das Zellwachstum ebenfalls in engem Zusammenhang mit der Kanzerogenese steht. Neben der Bereitstellung von AS für die

Proteinsynthese wird zudem der mTOR-Signalweg (engl. *mechanistic/mammalian Target of Rapamycin*) aktiviert [304]. THBS1 trägt zur Adhäsion von Tumorzellen sowie zu deren Invasion, Migration und Proliferation bei [305].

Vier detektierte Gene wurden bereits direkt in den Zusammenhang der HCV-induzierten HCC-Entstehung gebracht. AREG wird während der akuten und chronischen Leberschädigung induziert und schützt die Hepatozyten vor der Einleitung der Apoptose. Es ist bekannt, dass AREG in HCV-infizierten Zellen durch NS3 hoch reguliert wird und somit das Zellwachstum stimuliert, was wiederum zur Bildung von Zirrhosen und Krebs beiträgt. AREG ist außerdem essentiell für den Zusammenbau der Virionen und deren Freisetzung aus den Zellen [306]. GDF15 gehört zur TGF- β -Familie und wird als Biomarker bei der Diagnose von Lebererkrankungen verwendet. HCV induziert seine Expression, wodurch es zu einer erhöhten DNA-Synthese, Zell Proliferation und Invasion der Zellen kommt [307]. SQSTM1 ist ebenfalls in HCC-Patienten hoch reguliert und involviert in die Autophagie. Eine Krebsentstehung wird durch die Nrf2-abhängige metabolische Umprogrammierung gefördert [308]. Hierbei werden Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges hoch reguliert und die Konzentrationen von Metaboliten wie Glutathion erhöht. Andererseits sinkt die Menge an Metaboliten der Glykolyse und des Citratzyklus. UAP1L1 ist ein entscheidender Faktor für die Zellproliferation in Hepatozyten durch die Regulation der Expression der Acetylglucosaminyltransferase. Die Menge der UAP1L1-Expression korreliert mit einer schlechten Prognose für HCC-Patienten [309].

Insgesamt kann das kanzerogene Potential von HCV also auch in den bereits immortalen Huh-7.5-Krebszellen erkannt werden. Nicht nur spezifische krebsfördernde Gene, sondern auch Faktoren, welche an der metabolischen Umprogrammierung und Umstrukturierung der Zelle beteiligt sind und somit zur HCC-Entstehung beitragen könnten, wurden als differentiell reguliert detektiert.

4.2.3.2 Translationelle Regulation von Genen

Bei genauerer Betrachtung der Translation fiel auf, dass durchschnittlich die gesamte Translationsmenge in den infizierten Huh-7.5-Zellen herunter reguliert war (Abbildung 3-31 B). Dies liegt vermutlich an dem durch HCV-induziertem ER-Stress, welcher wiederum zu einer Phosphorylierung von eIF2 α führt [297]. In Folge dessen wird der Präinitiationskomplex abgebaut und es kommt zu einer globalen Hemmung der zellulären Translation [310].

Neben den in der Abbildung 3-31 gezeigten Genen, welche transkriptionell und/oder translationell eine veränderte Expression zeigten, konnten durch die Bildung des Verhältnisses von FC-RF zu FC-TR Gene identifiziert werden, welche eine spezifische Veränderung auf translationeller Ebene aufwiesen. Es ist auffällig, dass nur zwei der auf translationeller Ebene regulierten Gene (PPP1R15A und SLC7A) hoch und alle anderen herunter reguliert sind. Neben den oben bereits beschriebenen Genen ANKRD1, AREG, BMP2, DAB2, DUSP1, INHBE, JUN und PPP1R15A zeigten sechs weitere Gene eine signifikante Regulation auf translationeller Ebene (Abbildung 3-32).

ANXA3 bindet calciumabhängig azide Phospholipide und hat unter anderem Einfluss auf die Differenzierung und Migration von Zellen [311,312]. Für HCV ist ANXA3 ein co-Faktor bei der Bildung der viralen Partikel [313]. ATF3 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher durch verschiedene Promotoren und Isoformen die Transkription von Genen sowohl an-, als auch abschalten kann. Aktiviert wird er unter anderem durch Cytokine und ER-Stress und spielt zudem eine Rolle in der Abwehr von Pathogenen [314]. CTH katalysiert den finalen Schritt bei der Synthese von Cystein aus Methionin. Durch die Bildung von H₂S wird zudem indirekt das Zellwachstum reguliert [315]. GADD45A ist vor allem in der DNA-Reparatur und Genom-Stabilisierung involviert. Durch die enge Assoziation mit dem MAPK-Weg bildet das Protein einen Stresssensor und wirkt als Tumorsuppressor [316]. SLC7A1 ist ebenso wie SLC3A2 (siehe oben) ein Aminosäuretransporter [317]. TNFRSF12A gehört zur Cytokin-Rezeptorfamilie und spielt somit eine Rolle in verschiedensten physiologischen Prozessen wie der Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Entzündungsreaktionen [318].

Detaillierter untersucht wurde die verstärkte Translation des PPP1R15A, da dieses Gen für seine uORF regulierte Expression bekannt ist. Unerwarteter Weise wiesen andere durch denselben Mechanismus regulierte Gene wie beispielsweise ATF4 keine signifikant höhere Expression auf. Im Maus PPP1R15A-Gen wurde gezeigt, dass unter normalen Bedingungen die Ribosomen am zweiten der zwei sich überlappenden uORFs reinitiiieren und somit die Translation des Haupt-ORFs herunter regulieren [319]. Bei zellulärem Stress hingegen passieren die Ribosomen die uORFs und starten die Translation am eigentlichen ORF [320]. Im Gegensatz dazu sind die beiden uORFs beim Menschen getrennt voneinander. Der zweite uORF ist hier vermutlich wichtiger als der erste, wobei beide nötig sind, um die Translation der Haupt-ORFs herunter zu regulieren [321]. Die hier gezeigten Ergebnisse (Abbildung 3-33) weisen darauf hin, dass beide uORFs sowohl unter normalen Bedingungen als auch bei einer HCV-Infektion von Ribosomen besetzt sind. Unter HCV-replizierenden Bedingungen ist jedoch die Belagerung von Ribosomen am Ende des

zweiten ORFs, welcher die Initiation der Haupt-ORFs stört, schwächer, so dass dieser verstärkt translatiert wird. Im Verhältnis zu normalen Konditionen wird der eigentliche ORF mehr als doppelt so stark von Ribosomen abgelesen wie der entsprechende uORF.

Insgesamt zeigte sich eine schwächere translationelle Regulation spezifischer Gene durch uORFs als ursprünglich erwartet. Möglicherweise wäre diese Regulation zu früheren Zeitpunkten nach Beginn der HCV-Replikation besser zu erkennen gewesen, wenn sich die Zelle noch nicht auf die neue Situation einstellen konnte.

4.2.3.3 Differenziell regulierte Signalwege

In der durchgeführten KEGG-Analyse zeigte sich ebenfalls, dass die HCV-Replikation Einfluss auf die infizierten Zellen genommen hatte.

Am stärksten signifikant beeinflusst war der Weg der Osteoklasten-Differenzierung. Wie genau eine HCV-Infektion mit der verstärkten Bildung von Knochengewebe resorbierenden Osteoklasten zusammenhängt, ist nicht bekannt. Vermutet wird, dass die Infektion neben möglichen direkten Mechanismen auch indirekt durch die Induktion von Fibrose und Entzündungsreaktionen dazu beitragen könnte [322]. Mehrere Studien zeigten bereits, dass HCV-infizierte Patienten ein bis zu 65 % erhöhtes Risiko tragen, an Osteoporose zu erkranken, und oftmals eine verringerte Knochendichte aufwiesen, auch wenn noch keine nachweisbare Leberfibrose vorlag [322–324].

Ein weiterer hochregulierter Signalweg ist der MAPK-Weg, welcher an der Steuerung der Zellproliferation, des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt ist. In HCV-infizierten Patienten und Zellen wurde eine Aktivierung der MAPK sowie von c-JUN gezeigt und eine damit einhergehende Proliferation und HCC-Entwicklung. Besonders die E2- und Core-Proteine scheinen direkt an dieser Aktivierung beteiligt zu sein [325,247].

Auch der veränderte TGF- β -Signalweg ist dafür bekannt, eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Lebererkrankungen wie Fibrosen, Zirrhosen und Krebs zu spielen [326]. Erhöhte Werte an TGF- β stehen im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose für Erkrankte, wobei in frühen Krebsstadien TGF- β die Zellproliferation hemmt und die Apoptose steigert und erst in späteren Stadien die Tumorgenese und Metastase fördert [327]. HCV-infizierte Hepatozyten geben zudem TGF- β 1 und andere profibrotische Faktoren an ihre Umgebung ab und beeinflussen dadurch unter anderem die HSC-Genexpression, wodurch es verstärkt zur Fibrosierung kommt [328].

Überraschenderweise zählte auch der eng mit den HSCs zusammenhängende Retinol-Metabolismus zu den am ausgeprägtesten regulierten Signalwegen. Besonders der Abbau von ionisierter Retinsäure (RA) durch verschiedene hochregulierte CYPs fällt hierbei ins Auge (Abbildung 3-34). Eine Vitamin A- und RA-Defizienz können zu einer Statose und

HCC-Entstehung führen, indem vermehrt freie LDs in den Hepatozyten vorliegen, es zur Aktivierung der Vitamin A- und RA-speichernden HSCs und somit zur gesteigerten Bildung von Fibronectin, Laminin und Collagen kommt [329,330]. Hingegen konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von RA Fibrose vermindern kann und gleichzeitig den oxidativen Stress in den Zellen reduziert [331]. Bei dem oxidativen Metabolismus von RA spielen vor allem die auch im Rahmen der hier beschriebenen Experimente hochregulierten Cyp26-Enzyme eine entscheidende Rolle. Sie sind unter anderem wichtig für die Regulation der Stammzell-Differenzierung, und eine Dysregulation könnte dazu beitragen, dass Zellen in einem weniger differenzierten Zustand verbleiben oder in diesen zurück versetzt werden [332].

Ein weiterer detektierter hoch regulierter Signalweg ist der B-Zell-Rezeptorweg, welcher ebenfalls in HCV-Patienten dysreguliert ist [333]. In B-Zell-Defizienten-Mäusen konnte eine geringere Kollagenbildung und eine geringere fibrogene Antwort auf Verletzungen der Leber gemessen werden, wodurch es vermutlich zu einer reduzierten Karzinogenese kommt [334,335].

Eine wie hier gemessene Dysregulation des p53-Weges steht im Zusammenhang mit mehreren Erkrankungen der Leber [336]. Die Aktivierung von p53 in Folge von DNA-Schädigungen und damit eingeleiteter Apoptose wird direkt durch NS5A inhibiert, wodurch eine HCC-Entstehung gefördert werden kann [337].

Auch die detektierte ErbB-Aktivierung konnte bereits in einen Zusammenhang mit Krebserkrankungen gebracht werden. ErbB ist ein Mitglied der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren und spielt zudem eine Rolle für die Endozytose und Replikation des HC-Virus [338,339].

Insgesamt zeigte sich wie zuvor in den beeinflussten Signalwegen ein Zusammenhang zwischen einer HCV-Infektion und einer Fibrosierung sowie Kanzerogenese.

4.2.3.4 Der Warburg-Effekt und HCV

Der in Tumorzellen beobachtete Warburg-Effekt beschreibt die Steigerung der Glykolyse, des Pentose-Phosphatwegs (PPW) und der Lactat-Bildung bei gleichzeitiger Reduzierung der Aktivität des Citratzyklus sowie der oxidativen Phosphorylierung, auch wenn eine ausreichende Sauerstoffversorgung gegeben ist [340–344]. Krebszellen benötigen eine große Menge an anabolischen Metaboliten und müssen zum Teil unter geringeren Sauerstoffkonzentrationen wachsen, worauf sie ihren Stoffwechsel anpassen können [345,346]. Durch die erhöhte Glykolyse und herunter regulierte Atmungskette

können mehr Intermediate, wie AS, Ribose, Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) und Lipide für das Zellwachstum genutzt werden [347].

Eine Schlüsselrolle spielt zudem die Weiterverarbeitung des entstehenden Pyruvats (Pyr). Betrachtet man die Michaeliskonstante K_M der beteiligten Enzyme, fällt auf, dass die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) mit einem Wert von $\sim 0,01$ mM eine sehr hohe Affinität zu Pyr aufweist, gefolgt von der Alanin-Aminotransferase mit $\sim 0,2$ mM und Lactat-Dehydrogenase A (LDHA) mit $\sim 0,3$ mM [348–350]. Lactat wird eventuell hauptsächlich gebildet, um die überschüssigen Elektroden von NADH aufzunehmen und somit die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Reaktion am Laufen zu halten.

Es ist bekannt, dass aus einer HCV-Infektion oftmals eine Fibrose und dann Zirrhose und Krebs entsteht. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die HCV-Replikation bereits sechs Tage nach der beginnenden Infektion zu einer Veränderung des zellulären Metabolismus führt [259]. Schlüsselenzyme der mitochondrialen Atmungskette, namentlich MT-ND (Komplex I) und MT-CO2 (Komplex IV), wurden signifikant herunter reguliert (Abbildung 4-1). In einer voran gegangenen Studie mit HCV-infizierten Zellen konnte zusätzlich eine geringere Expression der ATP-Synthase zu späteren Zeitpunkten gemessen werden [351]. Es kann also vermutet werden, dass die HCV-Infektion die Aktivität der oxidativen Phosphorylierung limitiert.

Dafür spricht zusätzlich die Drosselung der PDH-Reaktion durch die PDH-Kinase (PDK). Die PDK wird durch den Hypoxie-induzierten Faktor 1α (HIF- 1α) aktiviert, welcher wiederum durch HCV hoch reguliert wird. Nicht nur HIF- 1α , sondern auch das Protoonkogen MYC wird in HCV-Patienten signifikant höher exprimiert und in Folge dessen mehrere Schlüsselenzyme der Glykolyse [352–354]. Daraus resultieren insgesamt erhöhte Metabolit-Konzentrationen von Lactat, Pyr und AS [355].

Zusätzlich sorgt HCV indirekt durch die Bindung von miRNAs für die Steigerung der Glykolyse. Die HCV-RNA kann die wenig abundante miR-199a wegfangen, so dass sie nicht mehr an die 3'UTR der HIF- 1α -RNA binden kann und der Transkriptionsfaktor somit stärker exprimiert wird [356,357]. Zudem beschlagnahmt das Virus einen Teil der freien miR-122 in den Hepatozyten, welche unter normalen Umständen unter anderem die Expression der Pyruvat-Kinase M2 (PKM2) unterdrückt [358,190].

Ein weiterer Punkt ist die HCV-induzierte Steigerung des PPW [359,360]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HCV das Protein SQSTM1/p62 hoch reguliert. SQSTM1 steht im Zusammenhang mit der HCC-Entwicklung und der Regulation des PPW und spielt

dadurch möglicherweise eine Schlüsselrolle bei der metabolischen Umprogrammierung der Zelle [308].

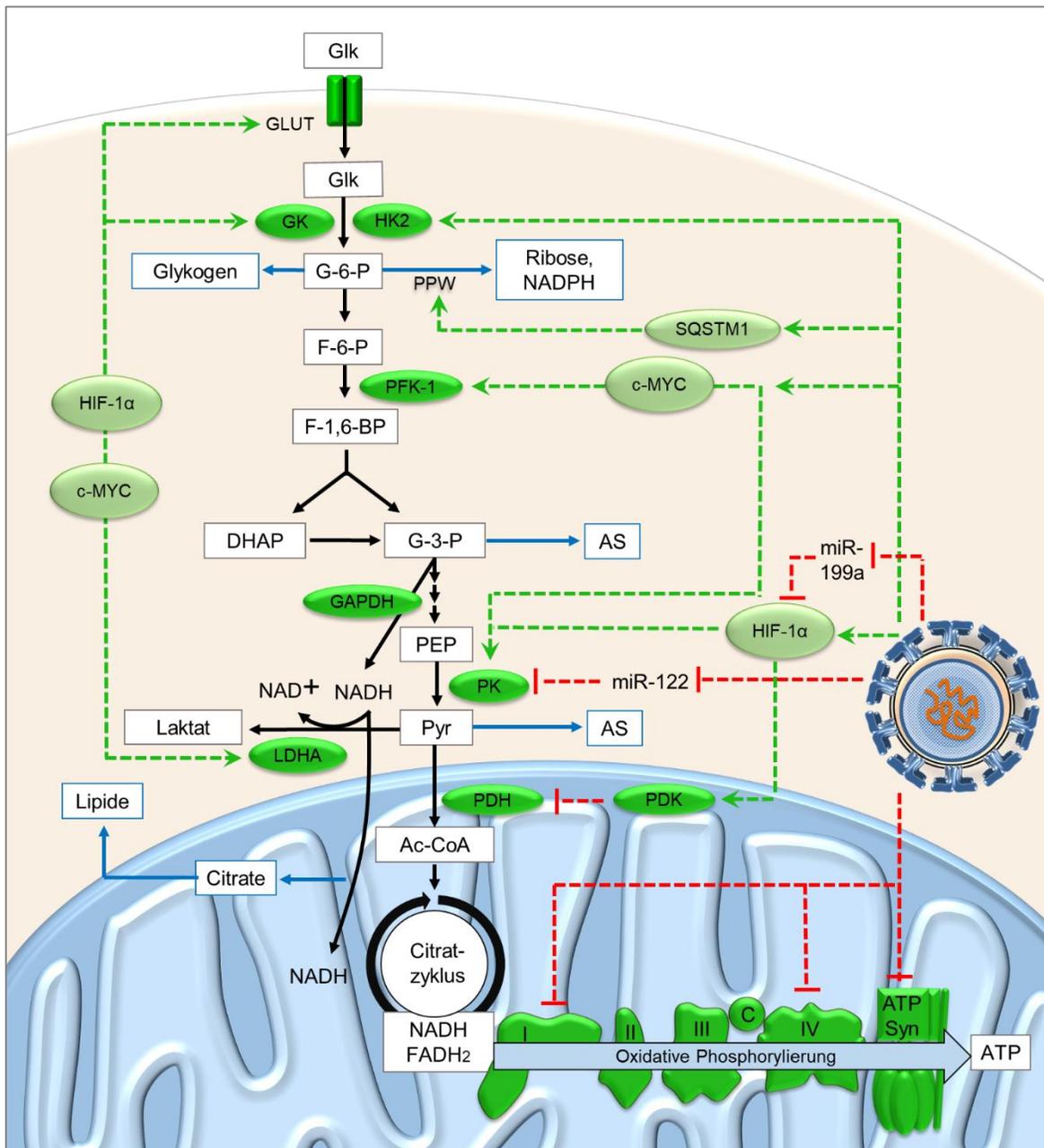


Abbildung 4-1: Einfluss der HCV-Infektion auf die Glykolyse und die oxidative Phosphorylierung. Mehr Informationen sind dem Text und [277] zu entnehmen. Glk: Glukose; G-6-P: Glukose-6-Phosphat; F-6-P: Fruktose-6-Phosphat; F-1,6-BP: Fruktose-1,6-Bisphosphat; DHAP: Dihydroxyacetone-Phosphat; G-3-P: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; PEP: Phosphoenolpyruvat; Pyr: Pyruvat; Ac-CoA: Acetyl-Coenzym A; GLUT: Glukotransporter; GK: Glukokinase; HK2: Hexokinase 2; PFK-1: Phosphofruktokinase-1; PK: Pyruvatkinase; LDHA: Laktat-Dehydrogenase A; SQSTM1: Sequestosome 1; PDH: Pyruvat-Dehydrogenase; PDK: PDH-Kinase; c: Cytochrom c; ATP Syn: ATP Synthase

Zusammenfassend trägt eine HCV-Infektion durch die Regulation der oxidativen Phosphorylierung, der Glykolyse und des PPW zu dem oftmals in Tumorzellen observierten Warburg-Effekt bei, möglicherweise um mehr anabole Metaboliten zur Replikation zu generieren. Eine detailliertere Betrachtung des Themas ist [277] zu entnehmen.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die HCV-Wirts-Interaktion bildet ein komplexes Netzwerk, das ständigen Veränderungen unterliegt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten einige neue Erkenntnisse über die Wechselwirkung zwischen viralen und zellulären Faktoren gewonnen werden.

Die kaum untersuchten miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-codierenden Region und der 3'-UTR des RNA-Genoms wurden näher untersucht. Es zeigte sich, dass die Anlagerung der miR-122 an die 5B.2-Bindungsstelle einen positiven Effekt auf die globale Replikation des HCV hat. Die Bindung an 5B.3 hatte einen schwächeren und die an S3 keinen signifikanten Effekt. Möglicherweise hängt der Einfluss der miR-Bindung an die einzelnen Stellen im Genom auch vom Stadium des Replikationszyklus ab. Die Anlagerung des miR/Ago2-Komplexes kann die Sekundärstruktur der HCV-RNA ändern und somit die Wechselwirkung mit anderen RNA-Bereichen und zellulären Faktoren beeinflussen. Weiterführende Experimente, wie der Einsatz von kompensierenden miR-122-5B.2m, RT-qPCRs zur Detektion von produzierten Minussträngen und die Verwendung von Polymerase-Defizienten-Konstrukte zu verschiedenen Zeitpunkten des viralen Zyklus wären wünschenswert, um detailliertere Aussagen über die Funktion der Bindung treffen zu können.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag in der Analyse der veränderten Genexpression in HCV-infizierten Zellen. Sechs Tage nach der Jc1-RNA-Transfektion in Huh-7.5-Zellen wurden zu diesem Zweck Ribosome Profiling Experimente durchgeführt. Es zeigte sich, dass es zu keinen allumfassenden Veränderungen des Transkriptoms und Translatoms in den Zellen kommt. Nur wenige spezifische Gene, welche im Zusammenhang mit ER-Stress, der Beeinflussung von verschiedenen Signalwegen, der HCV-Replikation und der Karzinogenese stehen, wurden stärker exprimiert. Herunter reguliert wurden interessanterweise Gene, die für zentrale Komponenten der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette codieren. Diese metabolische Umprogrammierung könnte zu dem oftmals in Tumorzellen und bei Patienten beobachteten Warburg Effekt beitragen. In Zukunft sollte dieses Experiment in anderen, wie primären, Zellen und zu früheren Zeitpunkten wiederholt

werden, um genauere Aussagen über die bestehenden Wechselwirkungen treffen zu können. Zudem sollte die Ribosomenverteilung auf dem HCV-Genom eingehender betrachtet werden. Wünschenswert wäre zusätzlich die genauere Analyse einiger differenziell exprimierter Gene mit Hilfe von Interaktionsstudien und RT-qPCR, um die mögliche Funktion der Proteine für den Replikationsmechanismus oder die zelluläre Immunantwort zu untersuchen.

Vieles ist noch nicht im Detail über HCV bekannt, und durch die noch heute bestehende globale Prävalenz des Virus, sowie die auch nach einer erfolgreichen Behandlung auftretenden Leberschädigungen, ist es nach wie vor entscheidend, die HCV-Wirts-Interaktion weiter zu erforschen.

5 Literatur

1. Abdelnour Z, Whittaker WA (2012) *Economic warfare. Secrets of wealth creation in the age of welfare politics*. Hoboken, N.J: Wiley. 212 p.
2. Rodrigues RAL, Mougari S, Colson P, La Scola B, Abrahão JS (2019) "Tupanvirus", a new genus in the family Mimiviridae. *Arch Virol* 164 (1): 325–331.
3. Duden | Virus | Rechtschreibung, Bedeutung, Definition, Herkunft. Available: <https://www.duden.de/rechtschreibung/Virus>. Accessed 29 June 2019.
4. World Health Organization (2017) Hepatitis C. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Accessed 19 May 2017.
5. RKI RKI-Ratgeber für Ärzte - Hepatitis C. Available: http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HepatitisC.html. Accessed 19 May 2017.
6. Bruggmann P, Berg T, Ovrehus ALH, Moreno C, Brandao Mello CE et al. (2014) Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. *J Viral Hepat* 21 Suppl 1: 5–33.
7. Kondo Y, Shimosegawa T (2013) Direct effects of hepatitis C virus on the lymphoid cells. *World J Gastroenterol* 19 (44): 7889–7895.
8. Thein H-H, Yi Q, Dore GJ, Krahn MD (2008) Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology* 48 (2): 418–431.
9. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM et al. (1998) Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339 (21): 1485–1492.
10. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M et al. (2001) Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358 (9286): 958–965.
11. Alazard-Dany N, Denolly S, Boson B, Cosset F-L (2019) Overview of HCV Life Cycle with a Special Focus on Current and Possible Future Antiviral Targets. *Viruses* 11 (1).
12. Perales C, Quer J, Gregori J, Esteban JI, Domingo E (2015) Resistance of Hepatitis C Virus to Inhibitors. Complexity and Clinical Implications. *Viruses* 7 (11): 5746–5766.
13. Grassi G, Di Caprio G, Fimia GM, Ippolito G, Tripodi M et al. (2016) Hepatitis C virus relies on lipoproteins for its life cycle. *World J Gastroenterol* 22 (6): 1953–1965.

14. ICTV ICTV Online (10th) Report (2017). Available: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/. Accessed 19 May 2017.
15. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G et al. (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile. Flaviviridae. *J Gen Virol* 98 (1): 2–3.
16. Walter S, Rasche A, Moreira-Soto A, Pfaender S, Bletsas M et al. (2017) Differential Infection Patterns and Recent Evolutionary Origins of Equine Hepaciviruses in Donkeys. *J Virol* 91 (1).
17. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS et al. (1995) Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1 (6): 564–569.
18. Sibley SD, Lauck M, Bailey AL, Hyeroba D, Tumukunde A et al. (2014) Discovery and characterization of distinct simian pegiviruses in three wild African Old World monkey species. *PLoS One* 9 (2): e98569.
19. Kapoor A, Simmonds P, Scheel TKH, Hjelle B, Cullen JM et al. (2013) Identification of rodent homologs of hepatitis C virus and pegiviruses. *MBio* 4 (2): e00216-13.
20. Corman VM, Grundhoff A, Baechlein C, Fischer N, Gmyl A et al. (2015) Highly divergent hepaciviruses from African cattle. *J Virol* 89 (11): 5876–5882.
21. Quan P-L, Firth C, Conte JM, Williams SH, Zambrana-Torrel CM et al. (2013) Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (20): 8194–8199.
22. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM et al. (2014) Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes. Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 59 (1): 318–327.
23. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Available: https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/56/hcv-classification. Accessed 26 March 2019.
24. Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C (2016) Global epidemiology of hepatitis C virus infection. An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol* 22 (34): 7824–7840.
25. Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L et al. (2013) Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (23): 9505–9510.
26. Lindenbach BD, Rice CM (2013) The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat Rev Microbiol* 11 (10): 688–700.
27. Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, Andre P (2011) Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 19 (2): 95–103.

28. Lindenbach BD (2013) Virion assembly and release. *Curr Top Microbiol Immunol* 369: 199–218.
29. Flaviviridae - Flaviviridae - Positive-sense RNA Viruses - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Available: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae. Accessed 31 July 2019.
30. Niepmann M, Shalamova LA, Gerresheim GK, Rossbach O (2018) Signals Involved in Regulation of Hepatitis C Virus RNA Genome Translation and Replication. *Front Microbiol* 9: 395.
31. Fricke M, Dünnes N, Zayas M, Bartenschlager R, Niepmann M et al. (2016) Corrigendum. Conserved RNA secondary structures and long-range interactions in hepatitis C viruses. *RNA* 22 (10): 1640.1.
32. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309 (5740): 1577–1581.
33. Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG et al. (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 27 (24): 3300–3310.
34. Shimakami T, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C et al. (2012) Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (3): 941–946.
35. Nieder-Rohrmann A, Dunnes N, Gerresheim GK, Shalamova LA, Herchenrother A et al. (2017) Cooperative enhancement of translation by two adjacent microRNA-122/Argonaute 2 complexes binding to the 5' untranslated region of hepatitis C virus RNA. *J Gen Virol* 98 (2): 212–224.
36. Goergen D, Niepmann M (2012) Stimulation of Hepatitis C Virus RNA translation by microRNA-122 occurs under different conditions in vivo and in vitro. *Virus Res* 167 (2): 343–352.
37. Conrad KD, Niepmann M (2014) The role of microRNAs in hepatitis C virus RNA replication. *Arch Virol* 159 (5): 849–862.
38. Niepmann M (2013) Hepatitis C virus RNA translation. *Curr Top Microbiol Immunol* 369: 143–166.
39. Friebe P, 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): 5326–5338.

40. Ito T, Tahara SM, Lai MM (1998) The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J Virol* 72 (11): 8789–8796.
41. Shi G, Ando T, Suzuki R, Matsuda M, Nakashima K et al. (2016) Involvement of the 3' Untranslated Region in Encapsidation of the Hepatitis C Virus. *PLoS Pathog* 12 (2): e1005441.
42. Friebe P, Boudet J, Simorre J-P, Bartenschlager R (2005) Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol* 79 (1): 380–392.
43. Romero-López C, Barroso-delJesus A, Berzal-Herranz A (2017) The chaperone-like activity of the hepatitis C virus IRES and CRE elements regulates genome dimerization. *Sci Rep* 7: 43415.
44. Ríos-Marco P, Romero-López C, Berzal-Herranz A (2016) The cis-acting replication element of the Hepatitis C virus genome recruits host factors that influence viral replication and translation. *Sci Rep* 6: 25729.
45. Cristofari G, Ivanyi-Nagy R, Gabus C, Boulant S, Lavergne J-P et al. (2004) The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro. *Nucleic Acids Res* 32 (8): 2623–2631.
46. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T et al. (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9 (9): 1089–1097.
47. Herzer K, Falk CS, Encke J, Eichhorst ST, Ulsenheimer A et al. (2003) Upregulation of major histocompatibility complex class I on liver cells by hepatitis C virus core protein via p53 and TAP1 impairs natural killer cell cytotoxicity. *J Virol* 77 (15): 8299–8309.
48. Liu J, Ding X, Tang J, Cao Y, Hu P et al. (2011) Enhancement of canonical Wnt/beta-catenin signaling activity by HCV core protein promotes cell growth of hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One* 6 (11): e27496.
49. Umer M, Qureshi SA, Hashmi ZY, Raza A, Ahmad J et al. (2014) Promoter hypermethylation of Wnt pathway inhibitors in hepatitis C virus - induced multistep hepatocarcinogenesis. *Virol J* 11: 117.
50. Wang W, Pan Q, Fuhler GM, Smits R, Peppelenbosch MP (2017) Action and function of Wnt/beta-catenin signaling in the progression from chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 52 (4): 419–431.
51. Lavillette D, Pecheur E-I, Donot P, Fresquet J, Molle J et al. (2007) Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and

- E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J Virol* 81 (16): 8752–8765.
52. Khan AG, Miller MT, Marcotrigiano J (2015) HCV glycoprotein structures. What to expect from the unexpected. *Curr Opin Virol* 12: 53–58.
 53. Scull MA, Schneider WM, Flatley BR, Hayden R, Fung C et al. (2015) The N-terminal Helical Region of the Hepatitis C Virus p7 Ion Channel Protein Is Critical for Infectious Virus Production. *PLoS Pathog* 11 (11): e1005297.
 54. Walter S, Bollenbach A, Doerrbecker J, Pfaender S, Brown RJP et al. (2016) Ion Channel Function and Cross-Species Determinants in Viral Assembly of Nonprimate Hepacivirus p7. *J Virol* 90 (10): 5075–5089.
 55. Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM (2007) Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* 81 (16): 8374–8383.
 56. Schregel V, Jacobi S, Penin F, Tautz N (2009) Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (13): 5342–5347.
 57. Raney KD, Sharma SD, Moustafa IM, Cameron CE (2010) Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3). A multifunctional antiviral target. *J Biol Chem* 285 (30): 22725–22731.
 58. Tanji Y, Hijikata M, Satoh S, Kaneko T, Shimotohno K (1995) Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. *J Virol* 69 (3): 1575–1581.
 59. Beran RKF, Lindenbach BD, Pyle AM (2009) The NS4A protein of hepatitis C virus promotes RNA-coupled ATP hydrolysis by the NS3 helicase. *J Virol* 83 (7): 3268–3275.
 60. Horner SM, Liu HM, Park HS, Briley J, Gale M (2011) Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (35): 14590–14595.
 61. Paul D, Romero-Brey I, Gouttenoire J, Stoitsova S, Krijnse-Locker J et al. (2011) NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* 85 (14): 6963–6976.
 62. Blight KJ (2011) Charged residues in hepatitis C virus NS4B are critical for multiple NS4B functions in RNA replication. *J Virol* 85 (16): 8158–8171.

63. Zayas M, Long G, Madan V, Bartenschlager R (2016) Coordination of Hepatitis C Virus Assembly by Distinct Regulatory Regions in Nonstructural Protein 5A. *PLoS Pathog* 12 (1): e1005376.
64. Kaul A, Stauffer S, Berger C, Pertel T, Schmitt J et al. (2009) Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog* 5 (8): e1000546.
65. Behrens SE, Tomei L, Francesco R de (1996) Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 15 (1): 12–22.
66. Kazakov T, Yang F, Ramanathan HN, Kohlway A, Diamond MS et al. (2015) Hepatitis C virus RNA replication depends on specific cis- and trans-acting activities of viral nonstructural proteins. *PLoS Pathog* 11 (4): e1004817.
67. Tang H, Grise H (2009) Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci (Lond)* 117 (2): 49–65.
68. Gouklani H, Bull RA, Beyer C, Coulibaly F, Gowans EJ et al. (2012) Hepatitis C virus nonstructural protein 5B is involved in virus morphogenesis. *J Virol* 86 (9): 5080–5088.
69. Scheel TKH, Rice CM (2013) Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med* 19 (7): 837–849.
70. Shi Q, Jiang J, Luo G (2013) Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. *J Virol* 87 (12): 6866–6875.
71. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S et al. (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21 (19): 5017–5025.
72. Germi R, Crance J-M, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H et al. (2002) Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J Med Virol* 68 (2): 206–215.
73. Dao Thi VL, Granier C, Zeisel MB, Guerin M, Mancip J et al. (2012) Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *J Biol Chem* 287 (37): 31242–31257.
74. Sharma NR, Mateu G, Dreux M, Grakoui A, Cosset F-L et al. (2011) Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. *J Biol Chem* 286 (35): 30361–30376.
75. Brazzoli M, Bianchi A, Filippini S, Weiner A, Zhu Q et al. (2008) CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J Virol* 82 (17): 8316–8329.

76. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F et al. (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282 (5390): 938–941.
77. Evans MJ, Hahn T von, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M et al. (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446 (7137): 801–805.
78. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H et al. (2009) Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457 (7231): 882–886.
79. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J et al. (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80 (14): 6964–6972.
80. Haid S, Pietschmann T, Pécheur E-I (2009) Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. *J Biol Chem* 284 (26): 17657–17667.
81. Pelletier J, Sonenberg N (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334 (6180): 320–325.
82. Jang SK, Kräusslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC et al. (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): 2636–2643.
83. Kühn R, Luz N, Beck E (1990) Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 64 (10): 4625–4631.
84. Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66 (3): 1476–1483.
85. Wilson JE, Pestova TV, Hellen CU, Sarnow P (2000) Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell* 102 (4): 511–520.
86. Lozano G, Francisco-Velilla R, Martinez-Salas E (2018) Deconstructing internal ribosome entry site elements: an update of structural motifs and functional divergences. *Open Biol* 8 (11).
87. Wang C, Sarnow P, Siddiqui A (1993) Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* 67 (6): 3338–3344.
88. Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CU (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.

89. Wang C, Le SY, Ali N, 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): 526–537.
90. Berry KE, Waghray S, Doudna JA (2010) The HCV IRES pseudoknot positions the initiation codon on the 40S ribosomal subunit. *RNA* 16 (8): 1559–1569.
91. Spahn CM, Kieft JS, Grassucci RA, Penczek PA, Zhou K et al. (2001) Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 291 (5510): 1959–1962.
92. Filbin ME, Vollmar BS, Shi D, Gonen T, Kieft JS (2013) HCV IRES manipulates the ribosome to promote the switch from translation initiation to elongation. *Nat Struct Mol Biol* 20 (2): 150–158.
93. Lukavsky PJ, Kim I, Otto GA, Puglisi JD (2003) Structure of HCV IRES domain II determined by NMR. *Nat Struct Biol* 10 (12): 1033–1038.
94. Sizova DV, Kolupaeva VG, Pestova TV, Shatsky IN, Hellen CU (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): 4775–4782.
95. Collier AJ, Gallego J, Klinck R, Cole PT, Harris SJ et al. (2002) A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site. *Nat Struct Biol* 9 (5): 375–380.
96. Ji H, Fraser CS, Yu Y, Leary J, Doudna JA (2004) Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (49): 16990–16995.
97. Otto GA, Puglisi JD (2004) The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* 119 (3): 369–380.
98. Lukavsky PJ, Otto GA, Lancaster AM, Sarnow P, Puglisi JD (2000) Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nat Struct Biol* 7 (12): 1105–1110.
99. Klinck R, Westhof E, Walker S, Afshar M, Collier A et al. (2000) A potential RNA drug target in the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *RNA* 6 (10): 1423–1431.
100. Kieft JS (2008) Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends Biochem Sci* 33 (6): 274–283.
101. Malygin AA, Kossinova OA, Shatsky IN, Karpova GG (2013) HCV IRES interacts with the 18S rRNA to activate the 40S ribosome for subsequent steps of translation initiation. *Nucleic Acids Res* 41 (18): 8706–8714.

102. Locker N, Easton LE, Lukavsky PJ (2007) HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly. *EMBO J* 26 (3): 795–805.
103. Weinlich S, Hüttelmaier S, Schierhorn A, Behrens S-E, Ostareck-Lederer A et al. (2009) IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *RNA* 15 (8): 1528–1542.
104. Holcik M, Sonenberg N (2005) Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (4): 318–327.
105. Ryoo HD, Vasudevan D (2017) Two distinct nodes of translational inhibition in the Integrated Stress Response 50 (11): 539–545.
106. Vagner S, Gensac MC, Maret A, Bayard F, Amalric F et al. (1995) Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol Cell Biol* 15 (1): 35–44.
107. Nanbru C, Lafon I, Audigier S, Gensac MC, Vagner S et al. (1997) Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J Biol Chem* 272 (51): 32061–32066.
108. Cornelis S, Bruynooghe Y, Denecker G, van Huffel S, Tinton S et al. (2000) Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5 (4): 597–605.
109. Carter MS, Sarnow P (2000) Distinct mRNAs that encode La autoantigen are differentially expressed and contain internal ribosome entry sites. *J Biol Chem* 275 (36): 28301–28307.
110. Garaigorta U, Chisari FV (2009) Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host Microbe* 6 (6): 513–522.
111. Terenin IM, Dmitriev SE, Andreev DE, Shatsky IN (2008) Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat Struct Mol Biol* 15 (8): 836–841.
112. Dmitriev SE, Terenin IM, Andreev DE, Ivanov PA, Dunaevsky JE et al. (2010) GTP-independent tRNA delivery to the ribosomal P-site by a novel eukaryotic translation factor. *J Biol Chem* 285 (35): 26779–26787.
113. Kim JH, Park SM, Park JH, Keum SJ, Jang SK (2011) eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions. *EMBO J* 30 (12): 2454–2464.
114. González-Almela E, Williams H, Sanz MA, Carrasco L (2018) The Initiation Factors eIF2, eIF2A, eIF2D, eIF4A, and eIF4G Are Not Involved in Translation Driven by Hepatitis C Virus IRES in Human Cells. *Front Microbiol* 9: 207.

115. Khawaja A, Vopalensky V, Pospisek M (2015) Understanding the potential of hepatitis C virus internal ribosome entry site domains to modulate translation initiation via their structure and function. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6 (2): 211–224.
116. Niepmann M (2009) Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochim Biophys Acta* 1789 (9-10): 529–541.
117. Bung C, Bochkayeva Z, Terenin I, Zinovkin R, Shatsky IN et al. (2010) Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation. *FEBS Lett* 584 (4): 837–842.
118. Ito T, Tahara SM, Lai MMC (1998) The 3'-Untranslated Region of Hepatitis C Virus RNA Enhances Translation from an Internal Ribosomal Entry Site. *J Virol* 72 (11): 8789–8796.
119. Song Y, Friebe P, Tzima E, Jünemann C, Bartenschlager R et al. (2006) The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol* 80 (23): 11579–11588.
120. Romero-López C, Berzal-Herranz A (2012) The functional RNA domain 5BSL3.2 within the NS5B coding sequence influences hepatitis C virus IRES-mediated translation. *Cell Mol Life Sci* 69 (1): 103–113.
121. Tuplin A, Struthers M, Cook J, Bentley K, Evans DJ (2015) Inhibition of HCV translation by disrupting the structure and interactions of the viral CRE and 3' X-tail. *Nucleic Acids Res* 43 (5): 2914–2926.
122. Odreman-Macchioli F, Baralle FE, Buratti E (2001) Mutational analysis of the different bulge regions of hepatitis C virus domain II and their influence on internal ribosome entry site translational ability. *J Biol Chem* 276 (45): 41648–41655.
123. Vassilaki N, Friebe P, Meuleman P, Kallis S, Kaul A et al. (2008) Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *J Virol* 82 (23): 11503–11515.
124. Lohmann V (2013) Hepatitis C virus RNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 369: 167–198.
125. Masaki T, Arend KC, Li Y, Yamane D, McGivern DR et al. (2015) miR-122 stimulates hepatitis C virus RNA synthesis by altering the balance of viral RNAs engaged in replication versus translation. *Cell Host Microbe* 17 (2): 217–228.
126. Paul D, Madan V, Bartenschlager R (2014) Hepatitis C virus RNA replication and assembly: living on the fat of the land. *Cell Host Microbe* 16 (5): 569–579.

127. Ray U, Das S (2011) Interplay between NS3 protease and human La protein regulates translation-replication switch of Hepatitis C virus. *Sci Rep* 1: 1.
128. Shimoike T, Koyama C, Murakami K, Suzuki R, Matsuura Y et al. (2006) Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop III_d domain of IRES and the viral core protein. *Virology* 345 (2): 434–445.
129. Paul D, Hoppe S, Saher G, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R (2013) Morphological and biochemical characterization of the membranous hepatitis C virus replication compartment. *J Virol* 87 (19): 10612–10627.
130. Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee J-Y, Chlanda P et al. (2012) Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* 8 (12): e1003056.
131. Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE et al. (2003) Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77 (9): 5487–5492.
132. Neufeldt CJ, Joyce MA, van Buuren N, Levin A, Kirkegaard K et al. (2016) The Hepatitis C Virus-Induced Membranous Web and Associated Nuclear Transport Machinery Limit Access of Pattern Recognition Receptors to Viral Replication Sites. *PLoS Pathog* 12 (2): e1005428.
133. Chatel-Chaix L, Bartenschlager R (2014) Dengue virus- and hepatitis C virus-induced replication and assembly compartments. The enemy inside--caught in the web. *J Virol* 88 (11): 5907–5911.
134. Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE et al. (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76 (12): 5974–5984.
135. Madan V, Paul D, Lohmann V, Bartenschlager R (2014) Inhibition of HCV replication by cyclophilin antagonists is linked to replication fitness and occurs by inhibition of membranous web formation. *Gastroenterology* 146 (5): 1361-72.e1-9.
136. Chao T-C, Su W-C, Huang J-Y, Chen Y-C, Jeng K-S et al. (2012) Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2 (PSTPIP2), a host membrane-deforming protein, is critical for membranous web formation in hepatitis C virus replication. *J Virol* 86 (3): 1739–1749.

137. Berger KL, Cooper JD, Heaton NS, Yoon R, Oakland TE et al. (2009) Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (18): 7577–7582.
138. Blanchard E, Roingard P (2018) The Hepatitis C Virus-Induced Membranous Web in Liver Tissue. *Cells* 7 (11).
139. Simister P, Schmitt M, Geitmann M, Wicht O, Danielson UH et al. (2009) Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase. *J Virol* 83 (22): 11926–11939.
140. Harrus D, Ahmed-El-Sayed N, Simister PC, Miller S, Triconnet M et al. (2010) Further insights into the roles of GTP and the C terminus of the hepatitis C virus polymerase in the initiation of RNA synthesis. *J Biol Chem* 285 (43): 32906–32918.
141. Sesmero E, Thorpe IF (2015) Using the Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase as a Model to Understand Viral Polymerase Structure, Function and Dynamics. *Viruses* 7 (7): 3974–3994.
142. Aizaki H, Lee K-J, Sung VM-H, Ishiko H, Lai MMC (2004) Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* 324 (2): 450–461.
143. Klepper A, Eng FJ, Doyle EH, El-Shamy A, Rahman AH et al. (2017) Hepatitis C virus double-stranded RNA is the predominant form in human liver and in interferon-treated cells. *Hepatology* 66 (2): 357–370.
144. Popescu C-I, Riva L, Vlaicu O, Farhat R, Rouillé Y et al. (2014) Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. *Biology (Basel)* 3 (4): 892–921.
145. Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratinier M, Targett-Adams P et al. (2006) Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* 281 (31): 22236–22247.
146. Camus G, Herker E, Modi AA, Haas JT, Ramage HR et al. (2013) Diacylglycerol acyltransferase-1 localizes hepatitis C virus NS5A protein to lipid droplets and enhances NS5A interaction with the viral capsid core. *J Biol Chem* 288 (14): 9915–9923.
147. Menzel N, Fischl W, Hueging K, Bankwitz D, Frentzen A et al. (2012) MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog* 8 (7): e1002829.

148. Kohlway A, Pirakitikulr N, Ding SC, Yang F, Luo D et al. (2014) The linker region of NS3 plays a critical role in the replication and infectivity of hepatitis C virus. *J Virol* 88 (18): 10970–10974.
149. Stapleford KA, Lindenbach BD (2011) Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *J Virol* 85 (4): 1706–1717.
150. Lee J-Y, Acosta EG, Stoeck IK, Long G, Hiet M-S et al. (2014) Apolipoprotein E likely contributes to a maturation step of infectious hepatitis C virus particles and interacts with viral envelope glycoproteins. *J Virol* 88 (21): 12422–12437.
151. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK et al. (2006) miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 3 (2): 87–98.
152. Vieyres G, Dubuisson J, Pietschmann T (2014) Incorporation of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins: the keystones on a peculiar virion. *Viruses* 6 (3): 1149–1187.
153. Collier KE, Heaton NS, Berger KL, Cooper JD, Saunders JL et al. (2012) Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathog* 8 (1): e1002466.
154. Palazzo AF, Lee ES (2015) Non-coding RNA: what is functional and what is junk. *Front Genet* 6: 2.
155. Mattick JS (2001) Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep* 2 (11): 986–991.
156. Watson CN, Belli A, Di Pietro V (2019) Small Non-coding RNAs: New Class of Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Neurodegenerative Disease. *Front Genet* 10: 364.
157. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J et al. (2012) *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*: Wiley.
158. Nordheim A, Knippers R, Dröge P, Meister G, Schiebel E (2018) *Molekulare Genetik*: Thieme.
159. Wong C-M, Tsang FH-C, Ng IO-L (2018) Non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma: molecular functions and pathological implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15 (3): 137–151.
160. Puvvula PK (2019) LncRNAs Regulatory Networks in Cellular Senescence. *Int J Mol Sci* 20 (11).
161. Hadjicharalambous MR, Lindsay MA (2019) Long Non-Coding RNAs and the Innate Immune Response. *Noncoding RNA* 5 (2).

162. Hu P, Wilhelm J, Gerresheim GK, Shalamova LA, Niepmann M (2019) Lnc-ITM2C-1 and GPR55 Are Proviral Host Factors for Hepatitis C Virus. *Viruses* 11 (6).
163. Carnero E, Barriocanal M, Prior C, Pablo Unfried J, Segura V et al. (2016) Long noncoding RNA EGOT negatively affects the antiviral response and favors HCV replication. *EMBO Rep* 17 (7): 1013–1028.
164. Liu X, Duan X, Holmes JA, Li W, Lee SH et al. (2019) A Long Noncoding RNA Regulates Hepatitis C Virus Infection Through Interferon Alpha-Inducible Protein 6. *Hepatology* 69 (3): 1004–1019.
165. Qian X, Xu C, Zhao P, Qi Z (2016) Long non-coding RNA GAS5 inhibited hepatitis C virus replication by binding viral NS3 protein. *Virology* 492: 155–165.
166. Barriocanal M, Carnero E, Segura V, Fortes P (2014) Long Non-Coding RNA BST2/BISPR is Induced by IFN and Regulates the Expression of the Antiviral Factor Tetherin. *Front Immunol* 5: 655.
167. Xie Q, Chen S, Tian R, Huang X, Deng R et al. (2018) Long Noncoding RNA ITPRIP-1 Positively Regulates the Innate Immune Response through Promotion of Oligomerization and Activation of MDA5. *J Virol* 92 (17).
168. Sur S, Sasaki R, Devhare P, Steele R, Ray R et al. (2018) Association between MicroRNA-373 and Long Noncoding RNA NORAD in Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes Impairs Wee1 Expression for Growth Promotion. *J Virol* 92 (20).
169. Peng Y, Croce CM The role of MicroRNAs in human cancer 1: 15004. Available: <https://www.nature.com/articles/sigtrans20154.pdf>.
170. He L, Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5 (7): 522–531.
171. Brümmer A, Hausser J (2014) MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation. *Bioessays* 36 (6): 617–626.
172. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19 (1): 92–105.
173. Jiang M, Broering R, Trippler M, Wu J, Zhang E et al. (2014) MicroRNA-155 controls Toll-like receptor 3- and hepatitis C virus-induced immune responses in the liver. *J Viral Hepat* 21 (2): 99–110.
174. Bhanja Chowdhury J, Shrivastava S, Steele R, Di Bisceglie AM, Ray R et al. (2012) Hepatitis C virus infection modulates expression of interferon stimulatory gene IFITM1 by upregulating miR-130A. *J Virol* 86 (18): 10221–10225.

175. Marquez RT, Bandyopadhyay S, Wendlandt EB, Keck K, Hoffer BA et al. (2010) Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans. *Lab Invest* 90 (12): 1727–1736.
176. O'Connell RM, Kahn D, Gibson WSJ, Round JL, Scholz RL et al. (2010) MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* 33 (4): 607–619.
177. Cheng YQ, Ren JP, Zhao J, Wang JM, Zhou Y et al. (2015) MicroRNA-155 regulates interferon- γ production in natural killer cells via Tim-3 signalling in chronic hepatitis C virus infection. *Immunology* 145 (4): 485–497.
178. Chen Y, Chen J, Wang H, Shi J, Wu K et al. (2013) HCV-induced miR-21 contributes to evasion of host immune system by targeting MyD88 and IRAK1. *PLoS Pathog* 9 (4): e1003248.
179. Zhu H, Geng Y, He Q, Li M (2018) miRNAs regulate immune response and signaling during hepatitis C virus infection. *Eur J Med Res* 23 (1): 19.
180. Kanda T, Goto T, Hirotsu Y, Moriyama M, Omata M (2019) Molecular Mechanisms Driving Progression of Liver Cirrhosis towards Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis B and C Infections: A Review. *Int J Mol Sci* 20 (6).
181. Li H, Jiang J-D, Peng Z-G (2016) MicroRNA-mediated interactions between host and hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 22 (4): 1487–1496.
182. (2020) miR-122 HCV - PMC - NCBI. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/?term=miR-122+HCV>. Accessed 11 March 2020.
183. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W et al. (2002) Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse *12* (9): 735–739.
184. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 39 (Database issue): D152-7.
185. Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A et al. (2004) miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* 1 (2): 106–113.
186. Castoldi M, Vujic Spasic M, Altamura S, Elmén J, Lindow M et al. (2011) The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice. *J Clin Invest* 121 (4): 1386–1396.
187. Li A, Song W, Qian J, Li Y, He J et al. (2013) MiR-122 modulates type I interferon expression through blocking suppressor of cytokine signaling 1. *Int J Biochem Cell Biol* 45 (4): 858–865.

188. Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS (2009) Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* 28 (40): 3526–3536.
189. Tsai W-C, Hsu S-D, Hsu C-S, Lai T-C, Chen S-J et al. (2012) MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest* 122 (8): 2884–2897.
190. Luna JM, Scheel TKH, Danino T, Shaw KS, Mele A et al. (2015) Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122. *Cell* 160 (6): 1099–1110.
191. Fricke M, Dünnes N, Zayas M, Bartenschlager R, Niepmann M et al. (2015) Conserved RNA secondary structures and long-range interactions in hepatitis C viruses. *RNA* 21 (7): 1219–1232.
192. Wilson JA, Zhang C, Huys A, Richardson CD (2011) Human Ago2 is required for efficient microRNA 122 regulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation. *J Virol* 85 (5): 2342–2350.
193. Conrad KD, Giering F, Erfurth C, Neumann A, Fehr C et al. (2013) MicroRNA-122 dependent binding of Ago2 protein to hepatitis C virus RNA is associated with enhanced RNA stability and translation stimulation. *PLoS One* 8 (2): e56272.
194. Gerresheim GK, Dunnes N, Nieder-Rohrmann A, Shalamova LA, Fricke M et al. (2017) microRNA-122 target sites in the hepatitis C virus RNA NS5B coding region and 3' untranslated region. Function in replication and influence of RNA secondary structure. *Cell Mol Life Sci* 74 (4): 747–760.
195. Jopling CL, Schütz S, Sarnow P (2008) Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* 4 (1): 77–85.
196. Bernier A, Sagan SM (2019) Beyond sites 1 and 2, miR-122 target sites in the HCV genome have negligible contributions to HCV RNA accumulation in cell culture. *J Gen Virol* 100 (2): 217–226.
197. Schirle NT, Sheu-Gruttadauria J, MacRae IJ (2014) Structural basis for microRNA targeting. *Science* 346 (6209): 608–613.
198. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120 (1): 15–20.

199. Thibault PA, Huys A, Amador-Cañizares Y, Gailius JE, Pinel DE et al. (2015) Regulation of Hepatitis C Virus Genome Replication by Xrn1 and MicroRNA-122 Binding to Individual Sites in the 5' Untranslated Region. *J Virol* 89 (12): 6294–6311.
200. Li Y, Masaki T, Yamane D, McGivern DR, Lemon SM (2013) Competing and noncompeting activities of miR-122 and the 5' exonuclease Xrn1 in regulation of hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (5): 1881–1886.
201. Mortimer SA, Doudna JA (2013) Unconventional miR-122 binding stabilizes the HCV genome by forming a trimolecular RNA structure. *Nucleic Acids Res* 41 (7): 4230–4240.
202. Villanueva RA, Jangra RK, Yi M, Pyles R, Bourne N et al. (2010) miR-122 does not modulate the elongation phase of hepatitis C virus RNA synthesis in isolated replicase complexes. *Antiviral Res* 88 (1): 119–123.
203. Jangra RK, Yi M, Lemon SM (2010) Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol* 84 (13): 6615–6625.
204. Schult P, Roth H, Adams RL, Mas C, Imbert L et al. (2018) microRNA-122 amplifies hepatitis C virus translation by shaping the structure of the internal ribosomal entry site. *Nat Commun* 9 (1): 2613.
205. Chahal J, Gebert LFR, Gan HH, Camacho E, Gunsalus KC et al. (2019) miR-122 and Ago interactions with the HCV genome alter the structure of the viral 5' terminus. *Nucleic Acids Res* 47 (10): 5307–5324.
206. Nasheri N, Singaravelu R, Goodmurphy M, Lyn RK, Pezacki JP (2011) Competing roles of microRNA-122 recognition elements in hepatitis C virus RNA. *Virology* 410 (2): 336–344.
207. Ono C, Fukuhara T, Motooka D, Nakamura S, Okuzaki D et al. (2017) Characterization of miR-122-independent propagation of HCV. *PLoS Pathog* 13 (5): e1006374.
208. van der Ree MH, van der Meer AJ, Bruijne J de, Maan R, van Vliet A et al. (2014) Long-term safety and efficacy of microRNA-targeted therapy in chronic hepatitis C patients. *Antiviral Res* 111: 53–59.
209. van der Ree MH, Vree JM de, Stelma F, Willemse S, van der Valk M et al. (2017) Safety, tolerability, and antiviral effect of RG-101 in patients with chronic hepatitis C: a phase 1B, double-blind, randomised controlled trial 389 (10070): 709–717.
210. Jost I, Shalamova LA, Gerresheim GK, Niepmann M, Bindereif A et al. (2018) Functional sequestration of microRNA-122 from Hepatitis C Virus by circular RNA sponges. *RNA Biol*: 1–8.

211. Zhou T-B, Drummen GPC, Qin Y-H (2012) The controversial role of retinoic acid in fibrotic diseases: analysis of involved signaling pathways. *Int J Mol Sci* 14 (1): 226–243.
212. Sebastiani G, Gkouvatsos K, Pantopoulos K (2014) Chronic hepatitis C and liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 20 (32): 11033–11053.
213. Eng FJ, Friedman SL (2000) Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279 (1): G7-G11.
214. Westbrook RH, Dusheiko G (2014) Natural history of hepatitis C 61 (1, Supplement): S58-S68. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827814004814>.
215. Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A et al. (1998) Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic viral hepatitis: a prospective observation of 2215 patients 28 (6): 930–938.
216. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J et al. (2001) Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C 34 (5): 730–739.
217. Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ et al. (2014) Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet* 46 (12): 1267–1273.
218. Bartosch B, Thimme R, Blum HE, Zoulim F (2009) Hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis 51 (4): 810–820.
219. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F et al. (2017) Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 8416763.
220. Holmström KM, Finkel T (2014) Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling 15 (6): 411–421. Available: <https://www.nature.com/articles/nrm3801.pdf>.
221. Sullivan LB, Chandel NS (2014) Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab* 2: 17.
222. Hino K, Hara Y, Nishina S (2014) Mitochondrial reactive oxygen species as a mystery voice in hepatitis C. *Hepatol Res* 44 (2): 123–132.
223. Abdalla MY, Ahmad IM, Spitz DR, Schmidt WN, Britigan BE (2005) Hepatitis C virus-core and non structural proteins lead to different effects on cellular antioxidant defenses. *J Med Virol* 76 (4): 489–497.

224. Medvedev R, Ploen D, Hildt E (2016) HCV and Oxidative Stress: Implications for HCV Life Cycle and HCV-Associated Pathogenesis. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 9012580.
225. Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A (2001) Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (17): 9599–9604.
226. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O (2015) Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol* 6: 260–271.
227. Hwang S-J, Lee S-D (2011) Hepatic steatosis and hepatitis C: Still unhappy bedfellows. *J Gastroenterol Hepatol* 26 Suppl 1: 96–101.
228. Patel A, Harrison SA (2012) Hepatitis C Virus Infection and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 8 (5): 305–312.
229. Petta S, Cammà C, Di Marco V, Alessi N, Cabibi D et al. (2008) Insulin resistance and diabetes increase fibrosis in the liver of patients with genotype 1 HCV infection. *Am J Gastroenterol* 103 (5): 1136–1144.
230. Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, Hisamoto T, Nagao Y et al. (2004) Hepatitis C Virus Down-Regulates Insulin Receptor Substrates 1 and 2 through Up-Regulation of Suppressor of Cytokine Signaling 3 165 (5): 1499–1508.
231. Parvaiz F, Manzoor S, Iqbal J, McRae S, Javed F et al. (2014) Hepatitis C virus nonstructural protein 5A favors upregulation of gluconeogenic and lipogenic gene expression leading towards insulin resistance: a metabolic syndrome. *Arch Virol* 159 (5): 1017–1025.
232. Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, Nogueira-Machado JA (2018) Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death Dis* 9 (2): 119.
233. Matsuzaki K, Murata M, Yoshida K, Sekimoto G, Uemura Y et al. (2007) Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 46 (1): 48–57.
234. Park S-H, Rehmann B (2014) Immune Responses to HCV and Other Hepatitis Viruses. *Immunity* 40 (1): 13–24.
235. Haybaeck J, Zeller N, Wolf MJ, Weber A, Wagner U et al. (2009) A lymphotoxin-driven pathway to hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 16 (4): 295–308.

236. Zhang H, Zhu C, Zhao Y, Li M, Wu L et al. (2015) Long non-coding RNA expression profiles of hepatitis C virus-related dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 6 (41): 43770–43778.
237. Yang Z, Zhou L, Wu L-M, Lai M-C, Xie H-Y et al. (2011) Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation. *Ann Surg Oncol* 18 (5): 1243–1250.
238. Wang B-G, Lv Z, Ding H-X, Fang X-X, Wen J et al. (2018) The association of lncRNA-HULC polymorphisms with hepatocellular cancer risk and prognosis. *Gene* 670: 148–154.
239. Guo J, Hao C, Wang C, Li L (2018) Long noncoding RNA PVT1 modulates hepatocellular carcinoma cell proliferation and apoptosis by recruiting EZH2. *Cancer Cell Int* 18: 98.
240. Xiao J-N, Yan T-H, Yu R-M, Gao Y, Zeng W-L et al. (2017) Long non-coding RNA UCA1 regulates the expression of Snail2 by miR-203 to promote hepatocellular carcinoma progression. *J Cancer Res Clin Oncol* 143 (6): 981–990.
241. Zhang C, Yang X, Qi Q, Gao Y, Wei Q et al. (2018) lncRNA-HEIH in serum and exosomes as a potential biomarker in the HCV-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomark* 21 (3): 651–659.
242. Kamel MM, Matboli M, Sallam M, Montasser IF, Saad AS et al. (2016) Investigation of long noncoding RNAs expression profile as potential serum biomarkers in patients with hepatocellular carcinoma. *Transl Res* 168: 134–145.
243. Park S-H, Lim JS, Lim S-Y, Tiwari I, Jang KL (2011) Hepatitis C virus Core protein stimulates cell growth by down-regulating p16 expression via DNA methylation. *Cancer Lett* 310 (1): 61–68.
244. Munakata T, Liang Y, Kim S, McGivern DR, Huijbregtse J et al. (2007) Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein. *PLoS Pathog* 3 (9): 1335–1347.
245. Bittar C, Shrivastava S, Bhanja Chowdhury J, Rahal P, Ray RB (2013) Hepatitis C virus NS2 protein inhibits DNA damage pathway by sequestering p53 to the cytoplasm. *PLoS One* 8 (4): e62581.
246. Cho J-W, Baek W-K, Suh S-I, Yang S-H, Chang J et al. (2001) Hepatitis C virus core protein promotes cell proliferation through the upregulation of cyclin E expression levels. *Cancer* 87 (1): 137–142.

247. Zhao L-J, Wang L, Ren H, Cao J, Li L et al. (2005) Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors. *Exp Cell Res* 305 (1): 23–32.
248. Feng D-Y, Sun Y, Cheng R-X, Ouyang X-M, Zheng H (2005) Effect of hepatitis C virus nonstructural protein NS3 on proliferation and MAPK phosphorylation of normal hepatocyte line. *World J Gastroenterol* 11 (14): 2157–2161.
249. Higgs MR, Lerat H, Pawlotsky J-M (2013) Hepatitis C virus-induced activation of β -catenin promotes c-Myc expression and a cascade of pro-carcinogenic events. *Oncogene* 32 (39): 4683–4693.
250. ZHANG W, LIU HT (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells 12 (1): 9–18. Available: <https://www.nature.com/articles/7290105.pdf>.
251. Yang S, Liu G (2017) Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 13 (3): 1041–1047.
252. McGivern DR, Lemon SM (2011) Virus-specific mechanisms of carcinogenesis in hepatitis C virus associated liver cancer. *Oncogene* 30 (17): 1969–1983.
253. Saito K, Meyer K, Warner R, Basu A, Ray RB et al. (2006) Hepatitis C virus core protein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by a protective effect involving cellular FLICE inhibitory protein. *J Virol* 80 (9): 4372–4379.
254. Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Wakita T et al. (2014) Hepatitis C virus nonstructural protein 5A inhibits thapsigargin-induced apoptosis. *PLoS One* 9 (11): e113499.
255. Choi S-H, Hwang SB (2006) Modulation of the transforming growth factor-beta signal transduction pathway by hepatitis C virus nonstructural 5A protein. *J Biol Chem* 281 (11): 7468–7478.
256. Battaglia S, Benzoubir N, Nobilet S, Charneau P, Samuel D et al. (2009) Liver cancer-derived hepatitis C virus core proteins shift TGF-beta responses from tumor suppression to epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 4 (2): e4355.
257. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S et al. (2006) Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (19): 7408–7413.
258. Trips-Viz. Available: <http://trips.ucc.ie/>. Accessed 25 July 2019.

259. Gerresheim GK, Bathke J, Michel AM, Andreev DE, Shalamova LA et al. (2019) Cellular Gene Expression during Hepatitis C Virus Replication as Revealed by Ribosome Profiling. *Int J Mol Sci* 20 (6).
260. Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM, Weissman JS (2012) The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc* 7 (8): 1534–1550.
261. Yoshikawa FSY, Teixeira FME, Sato MN, Oliveira LMdS (2019) Delivery of microRNAs by Extracellular Vesicles in Viral Infections: Could the News be Packaged. *Cells* 8 (6).
262. Girardi E, López P, Pfeffer S (2018) On the Importance of Host MicroRNAs During Viral Infection. *Front Genet* 9: 439.
263. Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M et al. (2013) Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 368 (18): 1685–1694.
264. Regev A, Teichmann SA, Lander ES, Amit I, Benoist C et al. (2017) The Human Cell Atlas. *Elife* 6.
265. Chigbu DI, Loonawat R, Sehgal M, Patel D, Jain P (2019) Hepatitis C Virus Infection: Host-Virus Interaction and Mechanisms of Viral Persistence. *Cells* 8 (4).
266. Andreev DE, O'Connor PBF, Fahey C, Kenny EM, Terenin IM et al. (2015) Translation of 5' leaders is pervasive in genes resistant to eIF2 repression. *Elife* 4: e03971.
267. Potter H (2003) Transfection by electroporation. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 9: Unit 9.3.
268. Foreman R, Wollman R (2019) Mammalian gene expression variability is explained by underlying cell state.
269. Neumann E, Riepl B, Knedla A, Lefèvre S, Tarnier IH et al. (2010) Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 12 (3): R83.
270. Stein A (2007) Decreasing variability in your cell culture. *BioTechniques* 43 (2): 228–229.
271. McGillicuddy N, Floris P, Albrecht S, Bones J (2018) Examining the sources of variability in cell culture media used for biopharmaceutical production. *Biotechnol Lett* 40 (1): 5–21.
272. Ma X, Shao Y, Tian L, Flasch DA, Mulder HL et al. (2019) Analysis of error profiles in deep next-generation sequencing data. *Genome Biol* 20 (1): 50.

273. Schurch NJ, Schofield P, Gierliński M, Cole C, Sherstnev A et al. (2016) How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use. *RNA* 22 (6): 839–851.
274. Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, Zeisel MB (2015) miR-122 – A key factor and therapeutic target in liver disease 62 (2): 448–457. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827814007314>.
275. Spaniel C, Honda M, Selitsky SR, Yamane D, Shimakami T et al. (2013) microRNA-122 abundance in hepatocellular carcinoma and non-tumor liver tissue from Japanese patients with persistent HCV versus HBV infection. *PLoS One* 8 (10): e76867.
276. Varnholt H, Drebbler U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P et al. (2008) MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 47 (4): 1223–1232.
277. Gerresheim, Roeb, Michel, Niepmann (2019) Hepatitis C Virus Downregulates Core Subunits of Oxidative Phosphorylation, Reminiscent of the Warburg Effect in Cancer Cells. *Cells* 8 (11): 1410.
278. Tuller T, Carmi A, Vestsigian K, Navon S, Dorfan Y et al. (2010) An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation. *Cell* 141 (2): 344–354.
279. Wang X, Wang Q (2018) Alpha-Fetoprotein and Hepatocellular Carcinoma Immunity. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018: 9049252.
280. Oberlies J, Watzl C, Giese T, Luckner C, Kropf P et al. (2009) Regulation of NK cell function by human granulocyte arginase. *J Immunol* 182 (9): 5259–5267.
281. Di Scotto Carlo F, Divisato G, Iacoangeli M, Esposito T, Gianfrancesco F (2018) The identification of H3F3A mutation in giant cell tumour of the clivus and the histological diagnostic algorithm of other clival lesions permit the differential diagnosis in this location. *BMC Cancer* 18 (1): 358.
282. Jimenez M, Arechederra M, Ávila MA, Berasain C (2018) Splicing alterations contributing to cancer hallmarks in the liver: central role of dedifferentiation and genome instability. *Transl Gastroenterol Hepatol* 3: 84.
283. Lang BF, Gray MW, Burger G (1999) Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* 33: 351–397.
284. Wirth C, Brandt U, Hunte C, Zickermann V (2016) Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta* 1857 (7): 902–914.

285. Zong S, Wu M, Gu J, Liu T, Guo R et al. (2018) Structure of the intact 14-subunit human cytochrome c oxidase. *Cell Res* 28 (10): 1026–1034.
286. Allen JF (2015) Why chloroplasts and mitochondria retain their own genomes and genetic systems: Colocation for redox regulation of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (33): 10231–10238.
287. Than TT, Tran GVQ, Son K, Park E-M, Kim S et al. (2016) Ankyrin Repeat Domain 1 is Up-regulated During Hepatitis C Virus Infection and Regulates Hepatitis C Virus Entry. *Sci Rep* 6: 20819.
288. Gjymishka A, Su N, Kilberg MS (2009) Transcriptional induction of the human asparagine synthetase gene during the unfolded protein response does not require the ATF6 and IRE1/XBP1 arms of the pathway. *Biochem J* 417 (3): 695–703.
289. Saito A, Ochiai K, Kondo S, Tsumagari K, Murakami T et al. (2011) Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2(α)-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *J Biol Chem* 286 (6): 4809–4818.
290. Crawford RR, Prescott ET, Sylvester CF, Higdon AN, Shan J et al. (2015) Human CHAC1 Protein Degrades Glutathione, and mRNA Induction Is Regulated by the Transcription Factors ATF4 and ATF3 and a Bipartite ATF/CRE Regulatory Element. *J Biol Chem* 290 (25): 15878–15891.
291. Finkielstein CV, Capelluto DGS (2016) Disabled-2: A modular scaffold protein with multifaceted functions in signaling. *Bioessays* 38 Suppl 1: S45-55.
292. Hu H, Tian M, Ding C, Yu S (2018) The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Front Immunol* 9: 3083.
293. Huang C-Y, Tan T-H (2012) DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell Biosci* 2 (1): 24.
294. Chabicovsky M, Herkner K, Rossmanith W (2003) Overexpression of activin beta(C) or activin beta(E) in the mouse liver inhibits regenerative deoxyribonucleic acid synthesis of hepatic cells. *Endocrinology* 144 (8): 3497–3504.
295. Nagai MA (2016) Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1) and cancer. *Biomed Rep* 4 (3): 275–281.
296. Bertolotti A (2018) The split protein phosphatase system. *Biochem J* 475 (23): 3707–3723.

297. Ruggieri A, Dazert E, Metz P, Hofmann S, Bergeest J-P et al. (2012) Dynamic Oscillation of Translation and Stress Granule Formation Mark the Cellular Response to Virus Infection. *Cell Host Microbe* 12 (1).
298. Rhee SG, Bae SH (2015) The antioxidant function of sestrins is mediated by promotion of autophagic degradation of Keap1 and Nrf2 activation and by inhibition of mTORC1. *Free Radic Biol Med* 88 (Pt B): 205–211.
299. Ord T, Ord D, Kõivomägi M, Juhkam K, Ord T (2009) Human TRB3 is upregulated in stressed cells by the induction of translationally efficient mRNA containing a truncated 5'-UTR. *Gene* 444 (1-2): 24–32.
300. Tran SC, Pham TM, Nguyen LN, Park E-M, Lim Y-S et al. (2016) Nonstructural 3 Protein of Hepatitis C Virus Modulates the Tribbles Homolog 3/Akt Signaling Pathway for Persistent Viral Infection. *J Virol* 90 (16): 7231–7247.
301. Zhao Y, Zhang X, Zhao H, Wang J, Zhang Q (2018) CXCL5 secreted from adipose tissue-derived stem cells promotes cancer cell proliferation. *Oncol Lett* 15 (2): 1403–1410.
302. Menendez JA, Vellon L, Espinoza I, Lupu R (2016) The metastasis inducer CCN1 (CYR61) activates the fatty acid synthase (FASN)-driven lipogenic phenotype in breast cancer cells. *Oncoscience* 3 (7-8): 242–257.
303. Meng Q, Xia Y (2011) c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein Cell* 2 (11): 889–898.
304. Liu C, Li X, Li C, Zhang Z, Gao X et al. (2018) SLC3A2 is a novel endoplasmic reticulum stress-related signaling protein that regulates the unfolded protein response and apoptosis. *PLoS One* 13 (12): e0208993.
305. Huang T, Sun L, Yuan X, Qiu H (2017) Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression. *Oncotarget* 8 (48): 84546–84558.
306. Pei R, Chen H, Lu L, Zhu W, Beckebaum S et al. (2011) Hepatitis C virus infection induces the expression of amphiregulin, a factor related to the activation of cellular survival pathways and required for efficient viral assembly. *J Gen Virol* 92 (Pt 10): 2237–2248.
307. Corre J, Hébraud B, Bourin P (2013) Concise review: growth differentiation factor 15 in pathology: a clinical role. *Stem Cells Transl Med* 2 (12): 946–952.
308. Saito T, Ichimura Y, Taguchi K, Suzuki T, Mizushima T et al. (2016) p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming. *Nat Commun* 7: 12030.

309. Lai C-Y, Liu H, Tin KX, Huang Y, Yeh K-H et al. (2019) Identification of UAP1L1 as a critical factor for protein O-GlcNAcylation and cell proliferation in human hepatoma cells. *Oncogene* 38 (3): 317–331.
310. Hinnebusch AG, Ivanov IP, Sonenberg N (2016) Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science* 352 (6292): 1413–1416.
311. Perron B, Lewit-Bentley A, Geny B, Russo-Marie F (1997) Can enzymatic activity, or otherwise, be inferred from structural studies of annexin III. *J Biol Chem* 272 (17): 11321–11326.
312. Gerke V, Creutz CE, Moss SE (2005) Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (6): 449–461.
313. Rösch K, Kwiatkowski M, Hofmann S, Schöbel A, Grüttner C et al. (2016) Quantitative Lipid Droplet Proteome Analysis Identifies Annexin A3 as a Cofactor for HCV Particle Production. *Cell Rep* 16 (12): 3219–3231.
314. Thompson MR, Xu D, Williams BRG (2009) ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. *J Mol Med* 87 (11): 1053–1060.
315. Yang G, Wu L, Bryan S, Khaper N, Mani S et al. (2010) Cystathionine gamma-lyase deficiency and overproliferation of smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 86 (3): 487–495.
316. Salvador JM, Brown-Clay JD, Fornace AJ (2013) Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 793: 1–19.
317. Albritton LM, Bowcock AM, Eddy RL, Morton CC, Tseng L et al. (1992) The human cationic amino acid transporter (ATRC1): Physical and genetic mapping to 13q12–q14 12 (3): 430–434.
318. Winkles JA (2008) The TWEAK–Fn14 cytokine–receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov* 7 (5): 411–425.
319. Young SK, Willy JA, Wu C, Sachs MS, Wek RC (2015) Ribosome Reinitiation Directs Gene-specific Translation and Regulates the Integrated Stress Response. *J Biol Chem* 290 (47): 28257–28271.
320. Young SK, Wek RC (2016) Upstream Open Reading Frames Differentially Regulate Gene-specific Translation in the Integrated Stress Response. *J Biol Chem* 291 (33): 16927–16935.
321. Lee Y-Y, Cevallos RC, Jan E (2009) An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2alpha phosphorylation. *J Biol Chem* 284 (11): 6661–6673.

322. Wijarnpreecha K, Thongprayoon C, Panjawatanan P, Phatharacharukul P, Ungprasert P (2017) Hepatitis C virus infection and risk of osteoporosis: A meta-analysis. *Saudi J Gastroenterol* 23 (4): 216–221.
323. Bedimo R, Maalouf NM, Lo Re V (2016) Hepatitis C virus coinfection as a risk factor for osteoporosis and fracture. *Curr Opin HIV AIDS* 11 (3): 285–293.
324. Lin M-S, Chen P-H, Wang P-C, Lin H-S, Huang T-J et al. (2019) Association between hepatitis C virus infection and osteoporotic fracture risk among postmenopausal women: a cross-sectional investigation in Taiwan. *BMJ Open* 9 (1): e021990.
325. Deng Y, Wang J, Huang M, Xu G, Wei W et al. (2019) Inhibition of miR-148a-3p resists hepatocellular carcinoma progress of hepatitis C virus infection through suppressing c-Jun and MAPK pathway. *J Cell Mol Med* 23 (2): 1415–1426.
326. Massagué J (2008) TGFbeta in Cancer. *Cell* 134 (2): 215–230.
327. Syed V (2016) TGF- β Signaling in Cancer. *J Cell Biochem* 117 (6): 1279–1287.
328. Schulze-Krebs A, Preimel D, Popov Y, Bartenschlager R, Lohmann V et al. (2005) Hepatitis C virus-replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 129 (1): 246–258.
329. Yanagitani A, Yamada S, Yasui S, Shimomura T, Murai R et al. (2004) Retinoic acid receptor alpha dominant negative form causes steatohepatitis and liver tumors in transgenic mice. *Hepatology* 40 (2): 366–375.
330. Aguilar RP, Genta S, Oliveros L, Anzulovich A, Giménez MS et al. (2009) Vitamin A deficiency injures liver parenchyma and alters the expression of hepatic extracellular matrix. *J Appl Toxicol* 29 (3): 214–222.
331. Wang L, Potter JJ, Rennie-Tankersley L, Novitskiy G, Sipes J et al. (2007) Effects of retinoic acid on the development of liver fibrosis produced by carbon tetrachloride in mice. *Biochim Biophys Acta* 1772 (1): 66–71.
332. Ross AC, Zolfaghari R (2011) Cytochrome P450s in the regulation of cellular retinoic acid metabolism. *Annu Rev Nutr* 31: 65–87.
333. Dai B, Chen AY, Corkum CP, Peroutka RJ, Landon A et al. (2016) Hepatitis C virus upregulates B-cell receptor signaling: a novel mechanism for HCV-associated B-cell lymphoproliferative disorders. *Oncogene* 35 (23): 2979–2990.
334. Novobrantseva TI (2005) Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells 115 (11): 3072–3082.

335. Faggioli F, Palagano E, Di Tommaso L, Donadon M, Marrella V et al. (2018) B lymphocytes limit senescence-driven fibrosis resolution and favor hepatocarcinogenesis in mouse liver injury 67 (5): 1970–1985.
336. Krstic J, Galhuber M, Schulz T, Schupp M, Prokesch A (2018) p53 as a Dichotomous Regulator of Liver Disease: The Dose Makes the Medicine 19 (3): 921.
337. Lan K-H, Sheu M-L, Hwang S-J, Yen S-H, Chen S-Y et al. (2002) HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis 21 (31): 4801–4811. Available: <https://www.nature.com/articles/1205589.pdf>.
338. Appert-Collin A, Hubert P, Crémel G, Bennisroune A (2015) Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Front Pharmacol* 6: 283.
339. Stindt S, Cebula P, Albrecht U, Keitel V, Am Schulte Esch J et al. (2016) Hepatitis C Virus Activates a Neuregulin-Driven Circuit to Modify Surface Expression of Growth Factor Receptors of the ErbB Family. *PLoS One* 11 (2): e0148711.
340. Warburg O, Wind F, Negelein E (1927) THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol* 8 (6): 519–530.
341. Levine AJ, Puzio-Kuter AM (2010) The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 330 (6009): 1340–1344.
342. Jia D, Park JH, Jung KH, Levine H, Kaiparettu BA (2018) Elucidating the Metabolic Plasticity of Cancer: Mitochondrial Reprogramming and Hybrid Metabolic States. *Cells* 7 (3).
343. Herling A, König M, Bulik S, Holzhütter H-G (2011) Enzymatic features of the glucose metabolism in tumor cells. *FEBS J* 278 (14): 2436–2459.
344. Bensinger SJ, Christofk HR (2012) New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. *Semin Cell Dev Biol* 23 (4): 352–361.
345. Shang R-Z, Qu S-B, Wang D-S (2016) Reprogramming of glucose metabolism in hepatocellular carcinoma: Progress and prospects. *World J Gastroenterol* 22 (45): 9933–9943.
346. Marbaniang C, Kma L (2018) Dysregulation of Glucose Metabolism by Oncogenes and Tumor Suppressors in Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 19 (9): 2377–2390.
347. Costello LC, Franklin RB (2005) 'Why do tumour cells glycolyse?': From glycolysis through citrate to lipogenesis. *Mol Cell Biochem* 280 (0): 1–8.
348. Seifert F, Golbik R, Brauer J, Lilie H, Schröder-Tittmann K et al. (2006) Direct kinetic evidence for half-of-the-sites reactivity in the E1 component of the human pyruvate

- dehydrogenase multienzyme complex through alternating sites cofactor activation. *Biochemistry* 45 (42): 12775–12785.
349. Duff SMG, Rydel TJ, McClerren AL, Zhang W, Li JY et al. (2012) The enzymology of alanine aminotransferase (AlaAT) isoforms from *Hordeum vulgare* and other organisms, and the HvAlaAT crystal structure. *Arch Biochem Biophys* 528 (1): 90–101.
350. Garza-Ramos G, Fernández-Velasco DA, Ramírez L, Shoshani L, Darszon A et al. (1992) Enzyme activation by denaturants in organic solvent systems with a low water content. *Eur J Biochem* 205 (2): 509–517.
351. Wolski D, Foote PK, Chen DY, Lewis-Ximenez LL, Fauvelle C et al. (2017) Early Transcriptional Divergence Marks Virus-Specific Primary Human CD8+ T Cells in Chronic versus Acute Infection. *Immunity* 47 (4): 648-663.e8.
352. Nagao A, Kobayashi M, Koyasu S, Chow CCT, Harada H (2019) HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance 20 (2).
353. Semenza GL (2011) Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76: 347–353.
354. Jung G-S, Jeon J-H, Choi Y-K, Jang SY, Park SY et al. (2016) Pyruvate dehydrogenase kinase regulates hepatitis C virus replication. *Sci Rep* 6: 30846.
355. Meoni G, Lorini S, Monti M, Madia F, Corti G et al. (2019) The metabolic fingerprints of HCV and HBV infections studied by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Sci Rep* 9 (1): 4128.
356. Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K (2009) Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a 50 (3): 453–460.
357. Pietschmann T (2009) Regulation of hepatitis C virus replication by microRNAs 50 (3): 441–444.
358. Liu AM, Xu Z, Shek FH, Wong K-F, Lee NP et al. (2014) miR-122 targets pyruvate kinase M2 and affects metabolism of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 9 (1): e86872.
359. Diamond DL, Syder AJ, Jacobs JM, Sorensen CM, Walters K-A et al. (2010) Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. *PLoS Pathog* 6 (1): e1000719.
360. Sugiyama K, Ebinuma H, Nakamoto N, Sakasegawa N, Murakami Y et al. (2014) Prominent steatosis with hypermetabolism of the cell line permissive for years of infection with hepatitis C virus. *PLoS One* 9 (4): e94460.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
5B.1/2/3	1/2/3 miR-Bindungsstelle in der NS5B-codierenden Region
A	Adenin
A	Ampere
Ac-CoA	Acetyl-Coenzyme A
AFP	Alpha-Fetoprotein
AG	Arbeitsgruppe
Ago	Argonaute-Protein
AK	Antikörper
ALB	Albumin
Amp	Ampicillin
ANKRD1	Ankyrin Repeat Domain 1
ANXA3	Annexin A3
apo	Apolipoprotein
APS	Ammoniumpersulfat
AREG	Amphiregulin
ARG1	Arginase 1
AS	Aminosäuren
ASNS	Asparagine Synthetase
ATF3	Activating transcription factor 3
ATP	Adenosintriphosphat
ATP Syn	ATP Synthase
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
c	Cytochrom c
CD	cluster of differentiation
CHAC1	ChaC Glutathione Specific Gamma-Glutamylcyclotransferase 1
CLDN1	Claudine

co-IP	co-Immunopräzipitation
CRE	cis-agierendes Replikationselement
Ct	engl. <i>threshold cycle</i>
CTH	cystathionine gamma-lyase
CXCL5	C-X-C Motif Chemokine Ligand 5
CYP	Cytochrom P450
CYR61	Cysteine-rich angiogenic inducer 61
DAA	engl. <i>direct-acting antivirals</i>
DAB2	Disabled Homolog 2
DAB2	Clathrin Adaptor Protein
DAPI	4', 6-Diamidin-2 -phenyl-indol-dihydro-chlorid
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
DDIT3	DNA Damage Inducible Transcript 3
DDX5	DEAD Box Protein 5
DHAP	Dihydroxyaceton-Phosphat
DLS	engl. <i>dimerization linkage sequence</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DUSP1	Dual Specificity Phosphatase 1
E	Hüllprotein (engl. <i>envelope</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E2F	Transkriptionsfaktor
EGRF	epidermal growth factor
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EMCV	Encephalomyokarditis Virus
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere (lat. <i>et altera</i>)
F-1,6-BP	Fruktose-1,6-Bisphosphat
F-6-P	Fruktose-6-Phosphat
FA	Formamid
FBS	fötale Rinderserum (engl. <i>fetal bovine serum</i>)

FC	engl. <i>fold change</i>
FLuc	Leuchtkäfer-Luziferase (engl. <i>firefly luciferase</i>)
fwd	vorwärts (engl. <i>forward</i>)
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
G	Guanin
G-3-P	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
GADD45A	Growth Arrest and DNA Damage Inducible Alpha
GAG	Glycoaminoglycane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDF15	Growth differentiation factor 15
GK	Glukokinase
Gik	Glukose
GLUT	Glukosetransporter
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde (lat. <i>hora</i>)
H3F3A	H3 Histone Family Member 3A
HCC	Leberzellkarzinom (engl. <i>hepatocellular carcinoma</i>)
HCV	Hepatitis C Virus
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (engl. <i>high-density lipoprotein</i>)
HDV	Hepatitis D Virus
HK2	Hexokinase 2
hnRNP	heterogenes nukleares Ribonukleoprotein
hsa	<i>Homo sapiens</i>
HSC	Stern-Zellen (engl. <i>hepatic stellate cells</i>)
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
ICTV	Internationales Komitee für Virustaxonomie
IGF2	Insulin-like growth factor 2
IMP-1	mRNA-Bindungs Protein 1
INF	Interferon
INHBE	Inhibin Beta E Subunit
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
ITAF	IRES trans-agierende Faktoren
JUN	Jun Proto-Oncogene
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
l	Liter
lat	lateinisch
LB	Lennox Broth
LD	Lipidorganellen (engl. <i>lipid droplets</i>)
LDHA	Laktat-Dehydrogenase A
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (engl. <i>low-density lipoprotein</i>)
LNA	locked nucleic acid
lncRNA	long non-coding RNAs
log	Logarithmus
LVP	Lipovirales Partikel
m	mutiert
m	Meter
m	Milli (als Präfix)
M	Molar (mol/l)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAVS	Mitochondriales antivirales Signalprotein
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	mindestens
min	Minute
miR	microRNA
miRNP	Ribonukleoproteinkomplex
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
MT-CO2	Mitochondrial Cytochrome C Oxidase II
MT-ND1	Mitochondrial NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 1
MT-ND3	Mitochondrial NADH dehydrogenase 3
MT-ND4	Mitochondrial NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 4
MT-ND4L	Mitochondrial NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 4L
mTOR	engl. <i>mechanistic Target of Rapamycin</i> (oder " <i>mammalian</i> " TOR)
MW	engl. <i>membranous web</i>
n	Nano
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NaOAc	Natriumacetat
nc	non coding
NGS	Next generation sequencing
Nrf-2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

NS	Nicht-Strukturprotein
NSAP1	NS1-assoziiertes Protein
nt	Nukleotide
NTP	Ribonukleotidtriphosphat
OCLN	Occludin
ORF	Offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)
p	Wahrscheinlichkeit (lat. <i>probabilitas</i>)
p	Pico
p(U/C)	Poly Uracil/Cytosin-Trakt
PAA	Polyacrylamid
PABP	poly(A)-Bindeprotein
PARP1	Poly-[ADP-Ribose] Polymerase 1
PAZ	Piwi, Argonaute, Zwillie
p-bodies	engl. <i>processing bodies</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl. <i>Principal component analysis</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PDK	PDH-Kinase
PE	engl. <i>paired end</i>
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFA	Paraformaldehyde
PFK-1	Phosphofruktokinase-1
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ Ionen-Konzentration
PHLDA1	Pleckstrin Homology Like Domain Family A Member 1
PIWI	P-element induced wimpy testis
PNK	Polynukleotid-Kinase/Phosphatase
Pol	Polymerase
PPP1R15A	Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A
PPPC	Proteinprobenpuffer
PPW	Pentose-Phosphatweg
Pyr	Pyruvat
RA	Retinsäure
Rb	Retinoblastoma Protein
rev	rückwärts (engl. <i>reverse</i>)

RF	Ribosomen geschützten RNA-Fragmente (engl. <i>ribosome protected fragments</i>)
RISC	RNA-induced silencing complex
RLuc	Seefeder Luziferase (<i>Renilla Luciferase</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	Ribosome Profiling
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	quantitative-Reverse-Transkriptase-PCR
S	Svedberg-Einheiten
s	Sekunde
S1/2/3	1/2/3 miR-Bindungsstelle in den UTRs des HCV Genoms
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SE	engl. <i>single end</i>
SESN2	Sestrin 2
SL	Haarnadelstruktur (engl. <i>stem-loop</i>)
SLC3A2	Solute Carrier Family 3 Member 2
SLC7A1	Solute Carrier Family 7 Member 1
SNRPG	Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide G
SQSTM1	Sequestosome 1
SRB1	Scavenger-Rezeptor B1
ss	Einzelstrang (engl. <i>single strand</i>)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat EDTA
TBE	Tris-Borat-Essigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
THBS1	Thrombospondin 1
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNFRSF12A	TNF receptor superfamily member 12A
TR	Transkriptom, gesamte RNA
TRIB3	Tribbles Pseudokinase 3

tRNA	transfer-RNA
U	Uracil
UAP1L1	UDP-N-Acetylglucosamine Pyrophosphorylase 1 Like 1
UE	Untereinheit(en)
ün	über Nacht
uORF	upstream open reading frame
UTR	nicht-translatierte Region (engl. <i>untranslated Region</i>)
V	Volt
VLDL	engl. <i>very low density lipoprotein</i>
VR	variable Region
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wt	Wildtyp
XRN1	5'-3' Exoribonullease 1

(der Abgrenzung zu Abkürzungen wegen sind hier einige SI-Einheiten mit aufgeführt)

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Morphologie von HCV-Partikeln.	3
Abbildung 1-2: Genomorganisation des HCV.	4
Abbildung 1-3: Aufbau des HCV-Polyproteins.	5
Abbildung 1-4: Darstellung des HCV-Replikationszyklus.	7
Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der HCV-IRES-abhängigen Initiation der Translation.	9
Abbildung 1-6: Prozessierung des HCV-Polyproteins.	11
Abbildung 1-7: Biogenese der miRNAs.	16
Abbildung 1-8: Interaktion der miR-122 mit HCV.	17
Abbildung 1-9: Modell der Entstehung vom HCV-induziertem Leberkrebs.	20
Abbildung 2-1: Methode der Mutagenese-PCR (<i>Overlap-Extension-PCR</i>).	49
Abbildung 2-2: Übersicht über die angewendete Ribosome Profiling Methode.	60
Abbildung 3-1: Schritte bei der Produktion des HCV-Genoms.	70
Abbildung 3-2: Western Blot zur Kontrolle der Expression viraler Proteine.	72
Abbildung 3-3: Kontrolle des Zellwachstums mittels Fluoreszenzmikroskopie.	73
Abbildung 3-4: Nachweis der Infektion mit HCV.	74
Abbildung 3-5: Transkription der generierten HCV-Genome.	77
Abbildung 3-6: Western Blot des HCV mit mutierten miR-Bindungsstellen.	78
Abbildung 3-7: Fluoreszenzaufnahmen des HCV mit mutierten miR-Bindungsstellen. .	79
Abbildung 3-8: Western Blot des HCV mit mutierten miR-Bindungsstellen in der NS5B-codierenden Region und der 3'UTR.	81
Abbildung 3-9: Vergleich der relativen Änderung der Anzahl an HCV Genomen gemessen mit RT-qPCR.	82
Abbildung 3-10: Gradienten der ersten zwei sequenzierten Ribosome Profiling Experimente.	85
Abbildung 3-11: Überprüfung der HCV-Infektion mittels Western Blot (A und B) und RT-qPCR (C und D).	86
Abbildung 3-12: Erste Größenselektion der Fragmente.	87
Abbildung 3-13: Zweite Größenselektion der Fragmente.	87
Abbildung 3-14: Dritte Größenselektion der Fragmente.	88
Abbildung 3-15: Test-PCR zur Kontrolle der Zirkularisierung.	88

Abbildung 3-16: Beispiel einer PCR zur Bestimmung der Zyklusanzahl für die finale Amplifikation der Probe.....	89
Abbildung 3-17 Finale PCR zur Amplifikation der Proben.....	89
Abbildung 3-18: Überprüfung der Proben des Experimentes mittels Bioanalyzer.	90
Abbildung 3-19: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Gesamt-RNA (TR).	91
Abbildung 3-20: Korrelationsanalyse der ersten sequenzierten Ribosome Profiling Experimente.	92
Abbildung 3-21: MA-Plots zur Veranschaulichung der differentiellen Genanalyse.	93
Abbildung 3-22: Kontrolle der HCV-Replikation im zweiten Ribosome Profiling Versuch mittels Western Blot.....	95
Abbildung 3-23: Kontrolle der HCV-Replikation (A) und der miR-122 Menge (B) im zweiten Ribosome Profiling Durchlauf mittels RT-qPCR.	95
Abbildung 3-24: Gradienten der zweiten sequenzierten Ribosome Profiling Experimente.	96
Abbildung 3-25 Test der Inkubationszeit der gesamt RNA mit der alkalischen Fragmentationslösung.	97
Abbildung 3-26: Kontrolle der generierten cDNA-Bibliotheken im zweiten Profiling Durchlauf.	97
Abbildung 3-27: Hauptkomponentenanalyse (PCA) des zweiten Ribosome Profiling Durchlaufs.	99
Abbildung 3-28: MA-Plots zur ersten Veranschaulichung der differentiellen Genanalyse.	100
Abbildung 3-29: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der HCV infizierten Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen.	101
Abbildung 3-30: Metagen-Analyse des Profiling zur Kontrolle der Translationsinitiation und -termination.....	102
Abbildung 3-31: Differentielle Genexpression in HCV infizierten Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen.	104
Abbildung 3-32: Translationelle Regulation in HCV-infizierten Zellen.	106
Abbildung 3-33: Detaillierte Analyse der Ribosomen-Verteilung auf dem durch 5´-gelegene ORFs (uORF) regulierten Gen PPP1R5A..	107
Abbildung 3-34: Ausschnitt des signifikant regulierten Retinol-Metabolismus.....	108
Abbildung 4-1: Einfluss der HCV-Infektion auf die Glykolyse und die oxidative Phosphorylierung.....	124

6.3 Plasmide

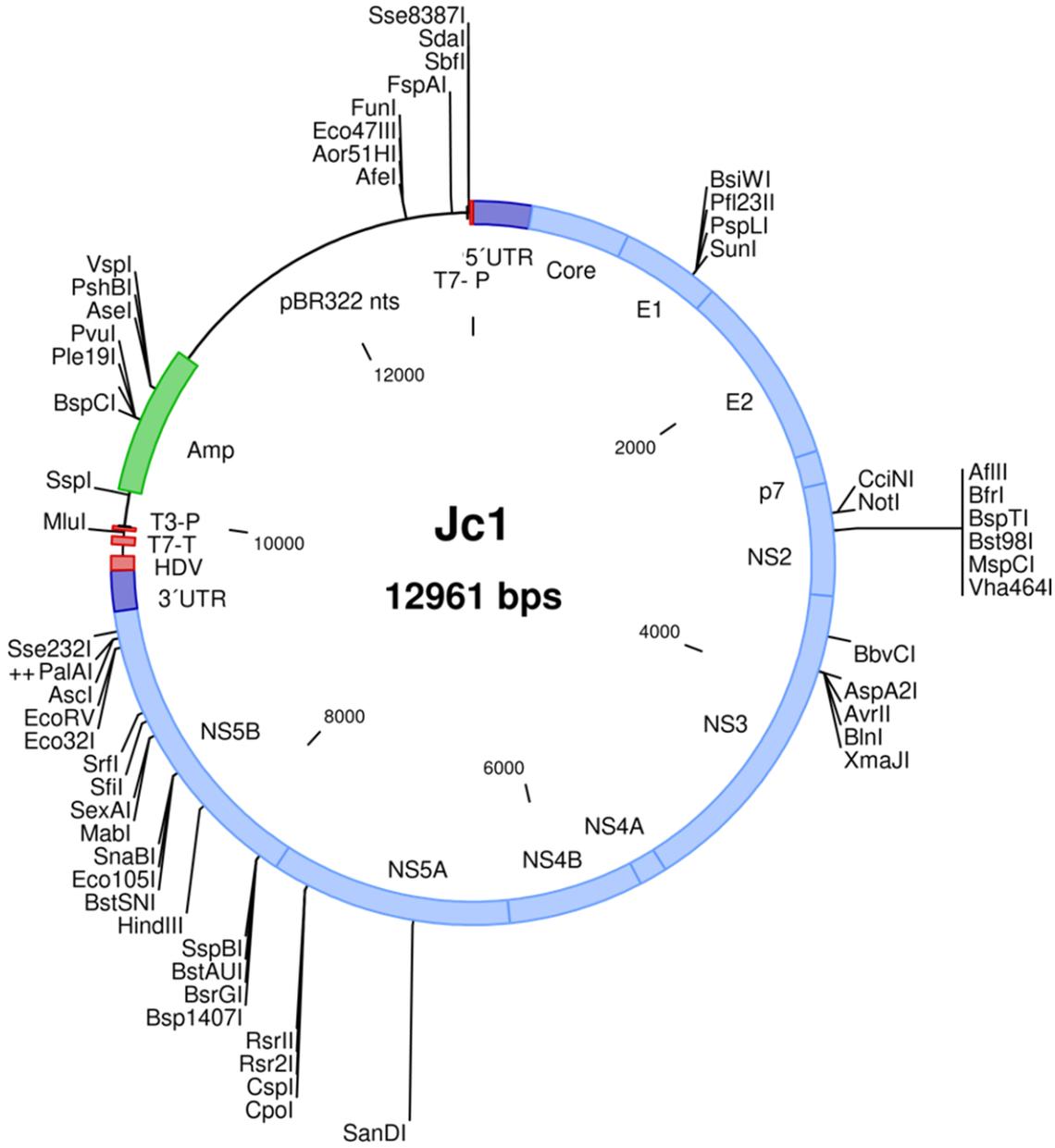


Tabelle 6-1: Elemente des HCV-Jc1-Plasmides

Region	Beschreibung	Start – Stopp (bp)
5`UTR	Sequenz der 5`UTR des HCV	1 – 340
S1	miR-122 Bindungsstelle S1 in der 5`UTR	21 – 27
S2	miR-122 Bindungsstelle S2 in der 5`UTR	37 – 42
Core	Core-Protein codierende Region	341 – 913
E1	E1-Protein codierende Region	914 – 1489
E2	E2-Protein codierende Region	1490 – 2590
p7	p7-Protein codierende Region	2591 – 2779
NS2	NS2-Protein codierende Region	2780 – 3430
NS3	NS3-Protein codierende Region	3431 – 5323
NS4A	NS4A-Protein codierende Region	5324 – 5485
NS4B	NS4B-Protein codierende Region	5486 – 6268
NS5A	NS5A-Protein codierende Region	6269 – 7666
NS5B	NS5B-Protein codierende Region	7667 – 9442
5B.2	miR-122 Bindungsstelle 5B.2 in der NS5B-codierenden Region	8869 – 8875
5B.3	miR-122 Bindungsstelle 5B.3 in der NS5B-codierenden Region	9274 – 9279
Seltene Codons	Seltene Codons am Ende der codierenden Region	9392 – 9415
3`UTR	Sequenz der 3`UTR des HCV	9443 – 9678
S3	miR-122 Bindungsstelle S3 in der 3`UTR	9460 – 9466
HDV	Sequenz für das Hepatitis D Virus (HDV)-Ribozym	9679 – 9762
T7-T	Terminator für die T7-RNA-Polymerase	9828 – 9874
T3-P	Promotor für die T3-Polymerase	9933 – 9914
pBR322	pBR322-Vektor mit Replikationsursprung	9937 – 12928
Amp	Ampicillin-Resistenzgen	10145 – 11002
T7-P	Promotor für die T7-RNA-Polymerase	12945 – 12961

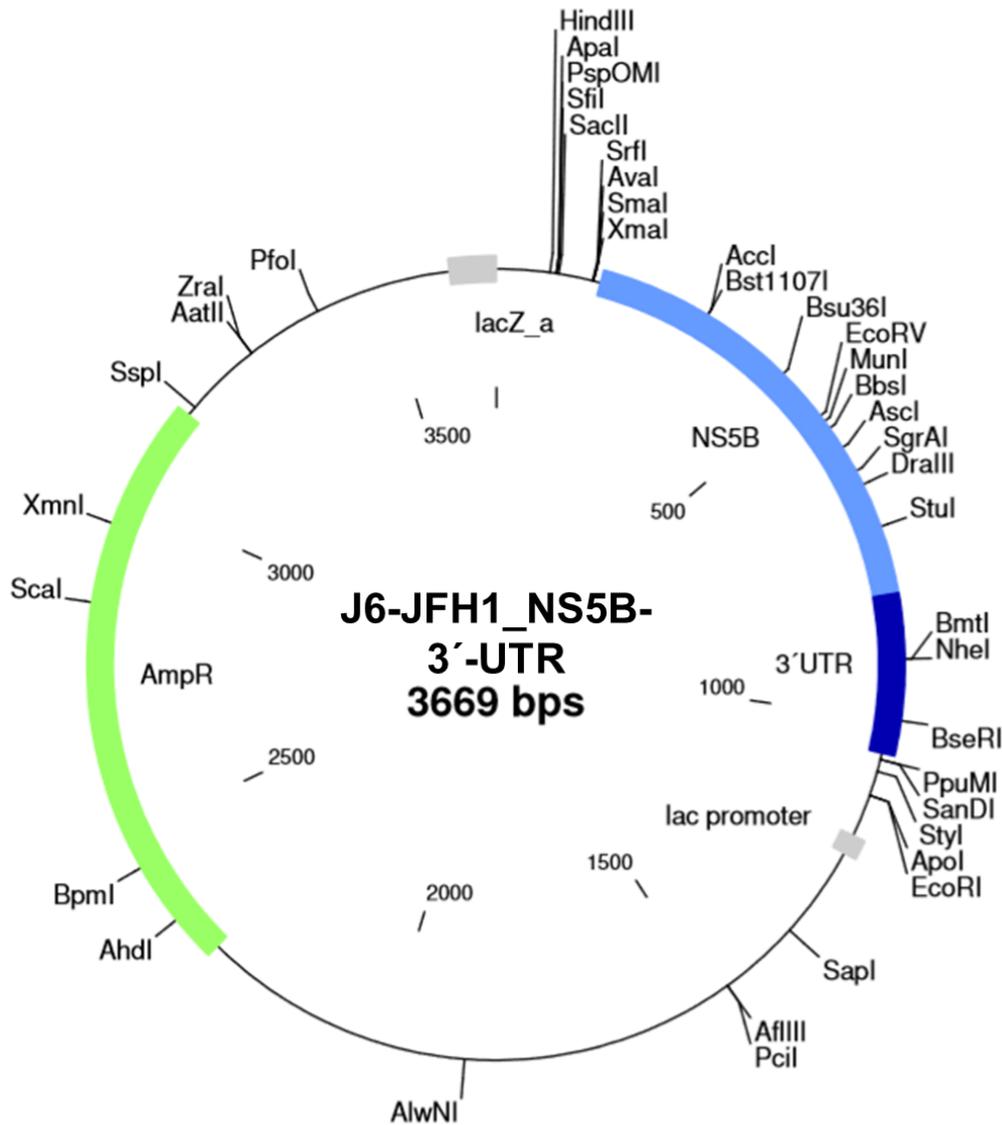


Tabelle 6-2: Elemente des J6-JFH1_NS5B-3'-UTR-Plasmides

Region	Beschreibung	Start – Stopp (bp)
lacZ_a	Lactose-Operon	1 – 144
NS5B	NS5B-Protein codierende Region	156 – 814
Seltene Codons	Seltene Codons am Ende der codierenden Region	9392 – 9415
3`UTR	Sequenz der 3`UTR des HCV	814 – 1049
Amp	Ampicillin-Resistenzgen	3220 – 2360

6.4 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

6.4.1 Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

Gerresheim GK, Roeb E, Michel AM, Niepmann M. (2019) Hepatitis C Virus Downregulates Core Subunits of Oxidative Phosphorylation, Reminiscent of the Warburg Effect in Cancer Cells. *Cells* 8 (11): 1410.

Hu P, Wilhelm J, **Gerresheim GK**, Shalamova LA, Niepmann M. (2019) Lnc-ITM2C-1 and GPR55 Are Proviral Host Factors for Hepatitis C Virus. *Viruses* 11 (6).

Gerresheim GK, Bathke J, Michel AM, Andreev DE, Shalamova LA, Rossbach O, Hu P, Glebe D, Fricke M, Marz M, Goesmann A, Kiniry SJ, Baranov PV, Shatsky IN, Niepmann M. (2019) Cellular Gene Expression during Hepatitis C Virus Replication as Revealed by Ribosome Profiling. *Int J Mol Sci* 20 (6).

Niepmann M, Shalamova LA, **Gerresheim GK**, Rossbach O. (2018) Signals Involved in Regulation of Hepatitis C Virus RNA Genome Translation and Replication. *Front Microbiol* 9: 395.

Jost I, Shalamova LA, **Gerresheim GK**, Niepmann M, Bindereif A, Rossbach O. (2018) Functional sequestration of microRNA-122 from Hepatitis C Virus by circular RNA sponges. *RNA Biol*: 1–8.

Nieder-Röhrmann A, Dünnes N, **Gerresheim GK**, Shalamova LA, Herchenröther A, Niepmann M. (2017) Cooperative enhancement of translation by two adjacent microRNA-122/Argonaute 2 complexes binding to the 5' untranslated region of hepatitis C virus RNA. *J Gen Virol* 98 (2): 212–224.

Gerresheim GK, Dünnes N, Nieder-Röhrmann A, Shalamova LA, Fricke M, Hofacker I, Höner Zu Siederdisen C, Marz M, Niepmann M. (2017) microRNA-122 target sites in the hepatitis C virus RNA NS5B coding region and 3' untranslated region. Function in replication and influence of RNA secondary structure. *Cell Mol Life Sci* 74 (4): 747–760.

Eingereicht:

Niepmann M, **Gerresheim GK**: Hepatitis C Virus Translation Regulation. Review. Eingereicht bei Int. J. Mol. Sci. (06/03/2020)

Aus der Masterarbeit hervorgegangene Publikation:

Zurnic I, Hütter S, Rzeha U, Helbig R, Stanke N, Reh J, Müllers E, Hamann MV, Kern T, **Gerresheim GK**, Lindel F, Serrao E, Lesbats P, Engelman AN, Cherepanov P, Lindemann D. (2016) Interactions of Prototype Foamy Virus Capsids with Host Cell Polo-Like Kinases Are Important for Efficient Viral DNA Integration. PLoS Pathog 12 (10): e1005956.

6.4.2 Internationaler Vortrag**26th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (HCV2019)**

5. — 8. Oktober 2019 in Seoul, Südkorea

Titel: Cellular Gene Expression during Hepatitis C Virus Replication as Revealed by Ribosome Profiling

6.4.3 Unterstützte Abschlussarbeiten

Jonas Budnik: medizinische Doktorarbeit

Anna-Lena Hell: Masterarbeit

Carolin S. Hess: medizinische Doktorarbeit

Selena A. Guggenberger: medizinische Doktorarbeit

Stefanie M. Herbel: Masterarbeit

Andreas Herchenröther: Masterarbeit

Lisa Löw: Masterarbeit

6.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Möglichkeit nutzen, mich bei all jenen zu bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Niepmann, welcher mir nicht nur die Möglichkeit gab, an mehreren spannenden Projekten mitzuarbeiten, sondern mich vielfältig unterschützte, durch die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Materialien, der Möglichkeit an Konferenzen teilzunehmen und vor allem die unzähligen anregenden Diskussionen, ohne die das Anfertigen dieser Arbeit nicht vorstellbar gewesen wäre.

Ein spezieller Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Friedhoff, welcher sich bereit erklärt hat, die Position als Erstprüfer zu übernehmen und somit die externe Anfertigung dieser Arbeit ermöglichte.

Dr. Oliver Rossbach und Prof. Dr. Albrecht Bindereif möchte ich für das halbe Jahr danken, das ich in ihrem Labor verbringen und so neue Methoden und Menschen kennenlernen konnte.

Danke an Prof. Dr. Dieter Glebe, in dessen S3**-Labor ich mit HCV arbeiten konnte, um so einen Großteil meiner Ergebnisse zu erzielen.

Einen großen Dank an die DFG und im Speziellen den SFB 1021 für die Finanzierung aber auch zahlreiche Seminare, die einen unschätzbaren wissenschaftlichen und persönlichen Austausch ermöglichten.

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen ehemaligen Kollegen, welche heute zu meinen besten Freunden zählen und auch bei allen weiteren liebsten und wundervollsten Menschen in meinem Leben. Ohne euch hätte ich es nie geschafft, und selbst wenn, hätte es nicht annähernd so viel Spaß gemacht und wäre nicht halb so schön gewesen.

Meiner Familie möchte ich für die riesige Unterstützung und all die Liebe danken, ohne die ich heute nicht hier wäre.

6.6 Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Giessen, den 20.03.2020

Gesche K. Gerresheim