

**Molekulare Mechanismen der Wirkung  
der leberspezifischen microRNA-122  
auf die Translation der Hepatitis C Virus-RNA**

**Inauguraldissertation**

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

vorgelegt von

**Dagmar Goergen**

Diplom-Biologin

Gießen, Mai 2010

Die vorliegende Arbeit wurde vom Januar 2007 bis Mai 2010 im Labor von Prof. Dr. Michael Niepmann im Biochemischen Institut des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt.

Die Promotion wurde durch den Sonderforschungsbereich 535 „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“ im Rahmen des Teilprojekts B1 „Regulation der Translation bei Picornaviren und Hepatitis C Virus“ und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Einzelprojekts Ni 604/2-1 gefördert.

Erstgutachter:

**Prof. Dr. Albrecht Bindereif**

Institut für Biochemie

Fachbereich Biologie und Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter:

**Prof. Dr. Michael Niepmann**

Biochemisches Institut

Fachbereich Medizin

Justus-Liebig-Universität Gießen

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der molekulare Mechanismus der Stimulation der Translation der Hepatitis C Virus-RNA durch die leberspezifische microRNA-122 in humanen Zelllinien sowie in dem *in vitro* Translationssystem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (RRL) untersucht.

Das Hepatitis C Virus (HCV) ist ein Positivstrang-RNA-Virus der Familie *Flaviviridae*, das bevorzugt in humanen Leberzellen repliziert. Ein früher Schritt im Vermehrungszyklus des HCV ist die Translation des viralen RNA-Genoms. Die Initiation der Translation der HCV-RNA erfolgt unabhängig von einem Cap-Nukleotid an einer internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) in der 5'-nicht-translatierten Region (5'-NTR) des Virus-Genoms.

microRNAs sind einzelsträngige nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von etwa 22 Nukleotiden, die gewebespezifisch exprimiert werden. Als Bestandteil von microRNA-Protein-Komplexen (miRNP-Komplexen) fungieren sie hauptsächlich als Regulatoren der posttranskriptionellen Genexpression. Die Regulation der Translation erfolgt im Allgemeinen durch Interaktion der microRNA mit Ziel-Sequenzen in der 3'-NTR der mRNA, was zu einer Repression der Protein-Synthese führt. Dagegen stimuliert die leberspezifische microRNA-122 (miR-122) die IRES-vermittelte Translation einer HCV-Reporter-RNA in humanen Zelllinien.

In dieser Arbeit wurde die biologische Relevanz der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 durch Studien mit vollständiger genomischer HCV-RNA in humanen Hepatoma-Zellen bestätigt. Weiterhin wurde gezeigt, dass die HCV-Translation auch im nicht-hepatozellulären *in vitro* Translationssystem RRL durch Zugabe von reifer miR-122 gefördert wird. Die Stimulation der HCV-Translation wird in RRL wie in humanen Zellen durch Interaktion der miR-122 mit Ziel-Sequenzen in der 5'-NTR der viralen RNA vermittelt. Weitere Analysen ergaben, dass die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 *in vitro* und in lebenden Zellen auf unterschiedlichen Wirkmechanismen beruht. Die Translationsstimulation in RRL erfolgt im Stadium der Initiation. Eine verstärkte Basenpaarung einzelsträngiger miR-122 mit der HCV-5'-NTR führt zur Blockierung einer inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion zwischen Sequenzabschnitten der Protein-kodierenden Region und der 5'-NTR der HCV-RNA, was die Effizienz der Translation steigert. miR-122-assoziierte Proteine spielen dabei in RRL eine untergeordnete Rolle, da auch die Hybridisierung anderer einzelsträngiger RNA-Oligonukleotide verschiedener Länge mit der HCV-5'-NTR die Translation fördert. Die Stimulation der HCV-Translation in lebenden Zellen erfolgt dagegen unabhängig von der Ausbildung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion und erfordert die Transfektion von doppelsträngigen Vorläufern der miR-122 mit exakter Länge, während einzelsträngige microRNAs keine translationsfördernde Wirkung haben.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit weisen auf eine Beteiligung von miR-122-assoziierten Proteinen in miRNP-Komplexen bei der Stimulation der HCV-Translation in lebenden Zellen hin und zeigen, dass die weitere Untersuchung des Einflusses der miR-122 auf die HCV-Translation in intakten Zellen erfolgen sollte.

## Summary

In the present study, the molecular mechanism of the stimulatory effect of the liver-specific microRNA-122 on translation of the hepatitis C virus RNA was investigated in human cell lines and in the *in vitro* translation system rabbit reticulocyte lysate (RRL).

The hepatitis C virus (HCV) is a positive strand RNA virus classified into the family *Flaviviridae*. HCV preferentially propagates in human hepatocytes. An early step in the viral replication cycle is the translation of the viral RNA genome. Translation initiation is mediated independently of a cap-nucleotide by an internal ribosome entry site (IRES) located in the 5'-nontranslated region (5'-NTR) of the HCV-RNA.

microRNAs are tissue-specific small non-coding RNAs of about 22 nucleotides. Within microRNA-protein complexes (miRNP complexes) they mainly act as regulators of posttranscriptional gene expression. Regulation of translation is mediated by the interaction of microRNAs with target sequences in the 3'-NTR of cellular mRNAs, usually leading to repression of protein synthesis. In contrast, the liver-specific microRNA-122 (miR-122) stimulates IRES mediated translation of an HCV-reporter-RNA in human cell lines.

In this study the biological relevance of the stimulatory effect of miR-122 on HCV translation could be confirmed by investigating the translation of complete genomic HCV RNAs in human hepatoma cells. It is further shown that translation stimulation also takes place in the non-hepatocellular *in vitro* translation system RRL when miR-122 is added. In RRL as well as in human cells HCV translation stimulation is mediated through interaction of miR-122 with target sequences in the 5'-NTR of the viral RNA. However, further analysis showed that the stimulation of HCV translation by miR-122 in RRL is based on a different molecular mechanism compared to living cells. In RRL translation stimulation takes place early in the initiation phase. Extended base pairing of single stranded miR-122 with the HCV 5'-NTR blocks the formation of an inhibitory RNA-RNA interaction between protein-coding sequences and the 5'-NTR of the HCV RNA and therefore stimulates translation efficiency. In this process, in RRL, miR-122-associated proteins play a minor role since also hybridization with the HCV 5'-NTR of other single stranded RNA-oligonucleotides of different length stimulate translation. In contrast, in living cells stimulation of HCV-translation occurs independently of the formation of the inhibitory RNA-RNA interaction. Moreover, the stimulatory effect can only be detected upon transfection of double stranded miR-122 precursors of exact length, whereas transfection of single stranded microRNAs does not elevate translation efficiency of the HCV RNA.

These results indicate that miR-122-associated proteins in miRNP complexes contribute to HCV translation stimulation in living cells and suggest, that intact human cells should be used to further analyse the effect of miR-122 on HCV-translation.

# INHALTSVERZEICHNIS

## Zusammenfassung

## Summary

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Das Hepatitis C Virus.....</b>	<b>1</b>
1.1	Klassifizierung in die Familie der <i>Flaviviridae</i> .....	1
1.2	Aufbau und Genom-Organisation des Hepatitis C Virus.....	2
1.3	Vermehrungszyklus des Hepatitis C Virus.....	6
<b>2</b>	<b>Molekulare Mechanismen der Translation.....</b>	<b>9</b>
2.1	Die Cap-Nukleotid-abhängige Translation eukaryotischer mRNAs.....	9
2.2	Die IRES-vermittelte Translation des HCV-RNA-Genoms.....	12
<b>3</b>	<b>Ein monocistronisches Reporter-System zur Untersuchung der HCV-Translation.....</b>	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>Einfluss einer leberspezifischen microRNA auf den Vermehrungszyklus des HCV.....</b>	<b>15</b>
4.1	microRNAs - Regulatoren der Translation.....	15
4.1.1	Biogenese und Funktion von microRNAs.....	15
4.2	Die leberspezifische microRNA-122 .....	17
4.3	Einfluss der leberspezifischen microRNA-122 auf die Translation der HCV-RNA.....	18
<b>5</b>	<b>Ziel dieser Arbeit.....</b>	<b>19</b>
<b>II</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>20</b>
<b>1</b>	<b>Die biologische Relevanz der Stimulation der HCV-Translation durch die leberspezifische microRNA-122.....</b>	<b>20</b>
1.1	miR-122 stimuliert die Translation des authentischen HCV-Genoms.....	20
1.2	Die Translationsstimulation durch miR-122 ist unabhängig von der Replikation des HCV-Genoms.....	22
1.3	Diskussion.....	23
1.4	Fazit.....	24
<b>2</b>	<b>microRNA-122 stimuliert die HCV-Translation in einem nicht-hepatozellulären <i>in vitro</i> Translationssystem.....</b>	<b>25</b>
2.1	Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation in HeLa-Extrakt.....	25
2.2	miR-122 stimuliert die HCV-Translation in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat.....	27

---

2.3	Sequestrierung der miR-122 inhibiert die Stimulation der HCV-Translation in RRL.....	29
2.4	Die Stimulation durch miR-122 in RRL ist spezifisch für die IRES-vermittelte Translation der HCV-RNA.....	30
2.5	Diskussion.....	31
2.6	Fazit.....	32
<b>3</b>	<b>Identifizierung der funktionellen Ziel-Sequenzen der microRNA-122 in der HCV-RNA.....</b>	<b>33</b>
3.1	Die HCV-3'-NTR hat keinen Einfluss auf die Translationsstimulation durch miR-122.....	33
3.2	miR-122 stimuliert die HCV-Translation durch Interaktion mit der HCV-5'-NTR.....	35
3.3	Diskussion.....	36
3.4	Fazit.....	37
<i>Exkurs</i>	<b>Einfluss der microRNA-122 auf die Reporter-Expression in RRL.....</b>	<b>38</b>
<i>E1</i>	miR-122 reprimiert die Expression der <i>Firefly</i> - und <i>Renilla</i> -Luziferase.....	38
<i>E2</i>	miR-122 hat keinen Einfluss auf die Enzymaktivität der <i>Firefly</i> - und <i>Renilla</i> -Luziferase.....	39
<i>E3</i>	miR-122 wirkt auf die Translation der Reporter-RNAs.....	40
<i>E4</i>	Die Mutation einer potentiellen Ziel-Sequenz in der <i>Firefly</i> -Luziferase-Sequenz hat keinen Einfluss auf den Effekt der miR-122 auf die Translation der Reporter-RNAs.....	42
<i>E5</i>	Der allgemeine inhibierende Effekt der miR-122 auf die Translation in RRL ist für die Translation der HCV-Reporter-RNA nicht relevant.....	43
<i>E6</i>	Diskussion.....	44
<i>E7</i>	Fazit.....	46
<b>4</b>	<b>microRNA-122 stimuliert die HCV-Translation im Stadium der Initiation.....</b>	<b>47</b>
4.1	miR-122 steigert die Bildung der 48S-Translations-Initiationskomplexe.....	47
4.2	Die Stimulation der 48S-Komplexbildung durch miR-122 resultiert in gesteigerter Polysomen-Bildung.....	51
4.3	Diskussion.....	53
4.4	Fazit.....	54
<b>5</b>	<b>Untersuchung der Beteiligung von Ago2-Proteinen an der Stimulation der HCV-Translation durch microRNA-122 in RRL.....</b>	<b>55</b>
5.1	Isolierung von HCV-Translations-Initiationskomplexen aus RRL mittels Streptavidin-Beads und Nachweis von Ago2-Proteinen.....	55
5.1.1	Optimierung der Hybridisierung von HCV-RNA mit Biotin-gekoppelten DNA/LNA-Oligonukleotiden und Bindung biotinylierter HCV-RNA an Streptavidin-Beads.....	57

---

5.1.2	Nachweis der Bildung von Translations-Initiationskomplexen und microRNA-Effekt mit Biotin-gekoppelter HCV-RNA.....	63
5.1.3	Nachweis von Ago2-Proteinen in aus RRL isolierten HCV-Translations-Initiationskomplexen.....	64
5.2	Analyse der Kosedimentation von Ago2-Proteinen mit HCV-Translations-Initiationskomplexen in Sucrose-Dichtegradienten.....	65
5.2.1	Optimierung der Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation in Anwesenheit von Proteasom- und Protease-Inhibitoren.....	66
5.2.2	Nachweis der Kosedimentation von Ago2-Proteinen mit HCV-Translations-Initiationskomplexen in Sucrose-Dichtegradienten.....	67
5.3	Diskussion.....	69
5.4	Fazit.....	71
<b>6</b>	<b>microRNA-122 stimuliert die HCV-Translation in RRL durch Blockierung einer inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion.....</b>	<b>72</b>
6.1	Eine RNA-RNA-Interaktion zwischen Sequenzabschnitten der HCV-5'-NTR und der Core-kodierenden Region reprimiert die HCV-Translation in RRL.....	73
6.2	Die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in RRL ist abhängig von der Ausbildung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion.....	77
6.3	Die Funktion der 3'-Region der miR-122 bei der Stimulation der HCV-Translation in RRL.....	78
6.4	Ein RNA-Oligonukleotid mit vollständiger Komplementarität zur HCV-5'-NTR stimuliert die HCV-Translation in RRL.....	82
6.5	Diskussion.....	83
6.6	Fazit.....	85
<b>7</b>	<b>Einfluss der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion auf die Stimulation der HCV-Translation durch microRNA-122 in humanen Zellen.....</b>	<b>86</b>
7.1	Die Kotransfektion einzelsträngiger miR-122 hat keinen stimulierenden Effekt auf die Translation der HCV-RNA in humanen Zellen .....	86
7.2	Die RNA-RNA-Interaktion zwischen der HCV-5'-NTR und der Core-Sequenz hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Translation der HCV-RNA in humanen Zellen....	87
7.3	Die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in humanen Zellen erfolgt unabhängig von der Ausbildung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion.....	89
7.4	Die Funktion der 3'-Region der miR-122 bei der Stimulation der HCV-Translation in humanen Zellen.....	91
7.5	Diskussion.....	93
7.6	Fazit.....	95

---

<b>III</b>	<b>SCHLUSSDISKUSSION.....</b>	<b>96</b>
1	Unterschiedliche Wirkmechanismen der microRNA-122 bei der Stimulation der HCV-Translation <i>in vitro</i> und in lebenden Zellen.....	96
2	An der Stimulation der HCV-Translation in humanen Zellen sind höchstwahrscheinlich miRNP-Komplexe beteiligt.....	101
3	Mögliche Wirkmechanismen von miRNP-Komplexen bei der Stimulation der HCV-Translation durch microRNA-122.....	103
4	Positionseffekte bei der Regulation der Translation durch microRNAs.....	109
5	Die microRNA-122 als Determinante für den Lebertropismus des HCV.....	116
<b>IV</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>118</b>
<b>1</b>	<b>Bakterienstämme und Zelllinien.....</b>	<b>118</b>
<b>2</b>	<b>Kulturmedien.....</b>	<b>118</b>
<b>3</b>	<b>Nukleinsäuren.....</b>	<b>118</b>
3.1	Plasmide.....	118
3.2	Oligonukleotide.....	119
3.2.1	DNA-Oligonukleotide.....	119
3.2.2	RNA-Oligonukleotide.....	120
3.3	Nukleotide.....	120
<b>4</b>	<b>Enzyme.....</b>	<b>121</b>
4.1	Restriktionsendonukleasen.....	121
4.2	Andere modifizierende Enzyme.....	121
<b>5</b>	<b>Radioaktiv markierte Aminosäuren.....</b>	<b>121</b>
<b>6</b>	<b>Antikörper.....</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>Protease- und Proteasomeninhibitoren.....</b>	<b>122</b>
<b>8</b>	<b>Translationsinhibitoren.....</b>	<b>122</b>
<b>9</b>	<b><i>In vitro</i> Translationssysteme.....</b>	<b>122</b>
<b>10</b>	<b>Größenstandards für elektrophoretische Auftrennungen.....</b>	<b>122</b>
10.1	DNA-Größenstandards.....	122
10.2	Protein-Größenstandards.....	123
<b>11</b>	<b>Kits.....</b>	<b>123</b>
<b>12</b>	<b>Spezielle Chemikalien und Reagenzien.....</b>	<b>123</b>
<b>13</b>	<b>Spezielle Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>125</b>
<b>14</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>125</b>

---

<b>V</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>126</b>
<b>1</b>	<b>Mikrobiologische Methoden.....</b>	<b>126</b>
1.1	Kultivierung von <i>E.coli</i> XL1-Blue.....	126
1.2	Herstellung von Glycerol-Stocks von Bakterien.....	126
1.3	Transformation von <i>E.coli</i> XL1-Blue.....	126
1.3.1	Herstellung elektrokompenter Zellen.....	126
1.3.2	Transformation von DNA in kompetente Zellen durch Elektroporation.....	127
<b>2</b>	<b>Arbeiten mit DNA.....</b>	<b>127</b>
2.1	DNA-Synthese.....	127
2.1.1	Standard-Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).....	127
2.1.2	Präparative Polymerase-Kettenreaktion.....	128
2.2	Modifikation von DNA - Mutagenese von DNA-Sequenzen und Klonierung.....	128
2.2.1	Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR.....	128
2.2.2	Enzymatische Modifikation von DNA.....	129
2.2.2.1	Restriktion von DNA.....	129
2.2.2.2	Entfernung von 5'-Phosphatresten.....	130
2.2.2.3	Ligation von DNA-Fragmenten.....	130
2.3	Präparation und Aufreinigung von DNA.....	131
2.3.1	Aufreinigung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation).....	131
2.3.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräparation).....	131
2.3.3	Präparation von Plasmid-DNA über Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation.....	131
2.3.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten über präparative Agarosegele.....	132
2.3.5	Aufreinigung von DNA-Matrizen für die <i>in vitro</i> Transkription.....	133
2.3.5.1	Proteinase K-Verdau.....	133
2.3.5.2	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	134
2.3.5.3	Alkoholfällung von Nukleinsäuren (Ethanol-Präzipitation).....	134
2.3.5.4	Aufreinigung von Nukleinsäuren über Sephadex G25-Säulen.....	134
<b>3</b>	<b>Arbeiten mit RNA.....</b>	<b>135</b>
3.1	RNA-Synthese.....	135
3.1.1	Herstellung von DNA-Matrizen für die <i>in vitro</i> Transkription.....	135
3.1.2	Standard <i>in vitro</i> Transkription .....	135
3.1.3	<i>In vitro</i> Transkription radioaktiv markierter RNA.....	135
3.1.4	Synthese von RNA mit 5'-Cap-Nukleotid und 3'-Poly(A)-Schwanz.....	136
3.1.5	Synthese von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden für Northern Blot.....	136
3.1.6	Synthese von intern biotinylierter RNA.....	137
3.1.7	Synthese von vollständigen HCV-Genomen.....	137

---

3.2	Präparation und Aufreinigung von RNA.....	137
3.2.1	DNase-Verdau.....	137
3.2.2	Aufreinigung von RNA über RNeasy® Mini-Säulen.....	137
3.2.3	Aufreinigung von RNA über mini Quick Spin Columns.....	138
3.2.4	Präparation von RNA mittels Trizol-Reagenz.....	138
3.3	Hybridisierung von RNA.....	138
3.3.1	Herstellung von microRNA-Duplexen.....	138
3.3.2	Hybridisierung von RNA mit Biotin-gekoppelten DNA/LNA-Oligonukleotiden.....	138
<b>4</b>	<b>Nachweis von Nukleinsäuren.....</b>	<b>139</b>
4.1	Elektrophorese.....	139
4.1.1	Analytische Agarosegel-Elektrophorese.....	139
4.1.2	Denaturierende Agarosegel-Elektrophorese.....	139
4.1.3	Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur Auftrennung von RNA.....	140
4.2	Northern Blot.....	140
<b>5</b>	<b>Zellkultur-Methoden.....</b>	<b>141</b>
5.1	Kultivierung von adhärennten eukaryotischen Zellen.....	141
5.2	Passagieren von adhärennten Zellen.....	142
5.3	Aussäen von adhärennten Zellen.....	142
5.4	Einfrieren von Zellen.....	142
5.5	Auftauen von Zellen.....	142
<b>6</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>143</b>
6.1	Expression von Reporter-Proteinen.....	143
6.1.1	<i>In vitro</i> Translation.....	143
6.1.2	<i>In vivo</i> Translation – Transfektion von RNA in eukaryotische Zellen.....	143
6.1.2.1	Transfektion von Reporter-RNAs.....	143
6.1.2.2	Transfektion von vollständigen HCV-Genomen.....	144
6.1.2.3	Kotransfektion eines zweiten Reporters und WST1-Test.....	145
6.2	Fällung von Proteinen mittels Trichloressigsäure (TCA) und Aceton.....	146
6.3	Nachweis von Proteinen.....	146
6.3.1	Nachweis der Expression von Reporter-Proteinen (Luziferase-Assay).....	146
6.3.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	147
6.3.3	Coomassie-Färbung.....	148
6.3.4	Western Blot.....	148
<b>7</b>	<b>RNA-Protein-Wechselwirkungen.....</b>	<b>149</b>
7.1	Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	149
7.1.1	Herstellung von Sucrose-Dichtegradienten.....	149

7.1.2	Auftrennung von Translationskomplexen.....	149
7.1.3	Einsatz von Translationsinhibitoren zur Anreicherung und Identifizierung von Translations-Initiationskomplexen.....	150
7.1.4	Nachweis der Kosedimentation bestimmter Proteine mit Translationskomplexen.....	151
7.2	Isolierung von HCV-Translationskomplexen aus Kaninchen-Retikulozyten-Lysat mittels Streptavidin-Beads.....	151
<b>8</b>	<b>Autoradiographie.....</b>	<b>152</b>
<b>VI</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>153</b>
<b>VII</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS UND GLOSSAR.....</b>	<b>169</b>
<b>VIII</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>171</b>
	Alignment der HCV-5'-NTR und angrenzender Core-kodierender Sequenz verschiedener HCV-Genotypen.....	171
	Alignment der HCV-3'-NTR verschiedener HCV-Genotypen.....	173
	Sequenz und Struktur verwendeter microRNA-Duplexe.....	174
	Mögliche Sekundärstruktur der HCV-5'-NTR nach <i>mfold</i> .....	175
	Mögliche Veränderung der Sekundärstruktur der HCV-5'-NTR bei Bindung der miR-122 an die enthaltenen Ziel-Sequenzen nach <i>mfold</i> .....	176
	Potentielle Bindestellen der miR-122 in der Protein-kodierenden Sequenz des HCV-Genoms.....	177
	Konserviertheit der potentiellen Bindestellen der miR-122 in der Protein-kodierenden Sequenz des HCV-Genoms.....	178
	Potentielle Bindestellen der miR-122 in der <i>Firefly</i> - und <i>Renilla</i> -Luziferase-Sequenz..	179
	Annotierte Sequenz der HCV-Reporter-Plasmide mit eingefügten Mutationen.....	180
	Plasmidkarten.....	185

**Wissenschaftliche Veröffentlichungen**

**Danksagungen**

**Eidesstattliche Erklärung**

# I EINLEITUNG

Viren (*virus*, lateinisch für „Gift“) sind kleine infektiöse Partikel mit einer Größe von 20 – 300 nm. Sie bestehen aus einer Art Nukleinsäure, entweder DNA oder RNA, die in einer Proteinhülle, dem Kapsid, verpackt ist. Manche Viren sind zusätzlich von einer Membran zellulären Ursprungs umhüllt, in die zelluläre und virale Glykoproteine eingelagert sind. Viren haben keinen eigenen Proteinsyntheseapparat und keine energiebildenden Stoffwechselsysteme. Sie vermehren sich nicht durch Teilung, sondern replizieren sich in lebenden Zellen, die sie infizieren. Als obligat intrazelluläre Parasiten sind sie in der Lage, zelluläre Prozesse umzusteuern und für den optimalen Verlauf ihrer Vermehrung zu modifizieren. Den Grundstein der Entdeckung der Viren legte 1882 Adolf Meyer, der ein „ultrafiltrierbares Agens“ als Ursache der Mosaik-Krankheit der Tabakpflanze beschrieb, heute bekannt als Tabakmosaik Virus. Seit ihrem Nachweis 1898 durch Loeffler und Frosch, denen es gelang, das tierpathogene Maul- und Klauenseuche Virus zu isolieren (Loeffler & Frosch, 1964), wurden sie als Ursache vieler humaner Krankheiten entdeckt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Erreger der chronischen Hepatitis, dem Hepatitis C Virus, und dessen Vermehrung in humanen Leberzellen.

## 1 Das Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus (HCV) blieb lange Zeit unentdeckt. Es zählte zu den Erregern der NonA-NonB-Hepatitis, die nicht durch die bereits bekannten Hepatitis A oder Hepatitis B Viren verursacht wurde und häufig eine Folgeerkrankung nach Bluttransfusionen war. Erst 1989 gelang die Identifizierung des Virus mittels molekularbiologischer Techniken und Klonierung des HCV-Genoms aus dem Serum experimentell infizierter Schimpansen (zusammengefasst in Choo et al., 1989; Kuo et al., 1989; Houghton, 2009). Der natürliche Wirt des HCV ist ausschließlich der Mensch, wo sich das Virus bevorzugt in der Leber vermehrt. Nach neueren Untersuchungen sind etwa 2,2 % der Weltbevölkerung (ca. 130 Mio. Menschen) mit dem Virus infiziert (Alter, 2007). Die Infektion mit dem HCV ist eine der häufigsten Ursachen der chronischen Hepatitis, die oft zu Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom führt (El-Serag, 2002). Aufgrund der hohen Variabilität und schwierigen Kulturbedingungen des HCV konnte bis jetzt kein geeigneter Impfstoff entwickelt werden. Die einzige derzeit mögliche Therapie ist eine Kombination aus hohen Dosen Interferon- $\alpha$  und dem Nukleosid-Analogon Ribavirin, worauf nur etwa 40 % der Patienten ansprechen.

### 1.1 Klassifizierung in die Familie der *Flaviviridae*

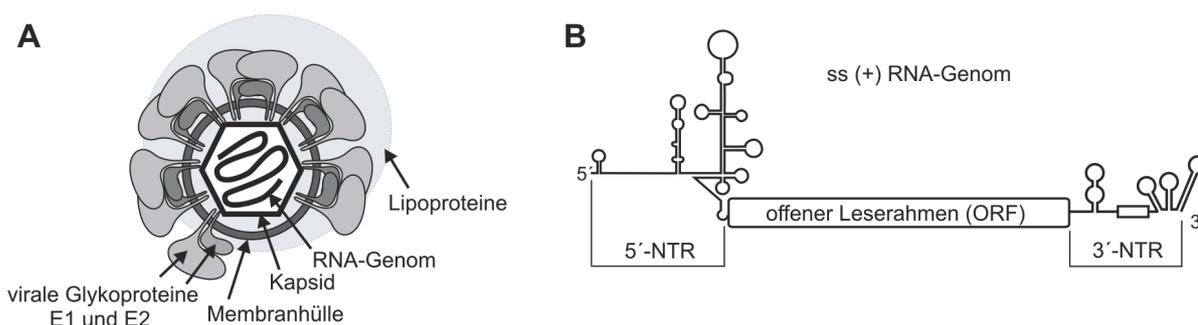
Das Hepatitis C Virus wurde aufgrund seiner Genom-Organisation und seiner molekularen und biochemischen Eigenschaften in die Familie der *Flaviviridae* klassifiziert.

*Flaviviridae* sind mit einer zellulären Membran umhüllte Viren mit einem Positivstrang-RNA-Genom. Die Familie der *Flaviviridae* umfasst drei Genera. Zum Genus *Flavivirus* gehört das namensgebende

Gelbfiebertvirus (*flavus*, lateinisch für „gelb“) und eine Reihe anderer humanpathogener Viren, die durch Arthropoden übertragen werden. Das zweite Genus *Pestivirus* umfasst Viren, die schwere Tierseuchen wie die klassische Schweinepest auslösen. Das HCV ist trotz vieler übereinstimmender Merkmale mit den Pestiviren in ein eigenes Genus *Hepacivirus* eingeteilt (van Regenmortel et al., 2000). Aufgrund der hohen genetischen Heterogenität des HCV-Genoms (Pawlotsky, 2003) erfolgte eine weitere Einteilung der Hepatitis C Viren in 6 Genotypen, die wiederum in enger miteinander verwandte Subtypen gegliedert sind (z.B. Genotyp 1, Subtyp a) (Simmonds et al., 1993). Während die HCV-Genotypen 1 bis 3 eine weltweite Verbreitung zeigen, werden die Genotypen 4 bis 6 nur in bestimmten geographischen Regionen wie Südost-Asien, Afrika und Ägypten gefunden (Bartenschlager et al., 2004). In Mitteleuropa und den USA sind die Genotypen 1a und 1b die häufigste Ursache von Hepatitis C Infektionen.

## 1.2 Aufbau und Genom-Organisation des Hepatitis C Virus

Die infektiösen Partikel (Virionen) des HCV (Abb. 1A) enthalten die Erbinformation in Form einer einzelsträngigen RNA (Abb. 1B). Zum Schutz vor Ribonukleasen wird das virale RNA-Genom von einem Kapsid umgeben, welches aus dem viruskodierte Core-Protein besteht (Penin, 2003). Das Kapsid ist von einer von der Wirtszelle stammenden Hüllmembran umgeben, in die virale Glykoproteine, E1 und E2, eingelagert sind (Feinstone et al., 1983; Shimizu et al., 1996). Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wird angenommen, dass die Virionen von sphärischer Gestalt mit einem Durchmesser von etwa 40 - 70 nm sind (Kaito et al., 1994; Shimizu et al., 1996; Wakita et al., 2005). Die im Serum von Patienten zirkulierenden infektiösen HCV-Partikel sind zudem häufig mit Lipoproteinen (LDL, engl. *low density lipoprotein* und VLDL, engl. *very low density lipoprotein*) assoziiert und werden auch als Lipo-Viro-Partikel bezeichnet (André et al., 2002; Nielsen et al., 2006).



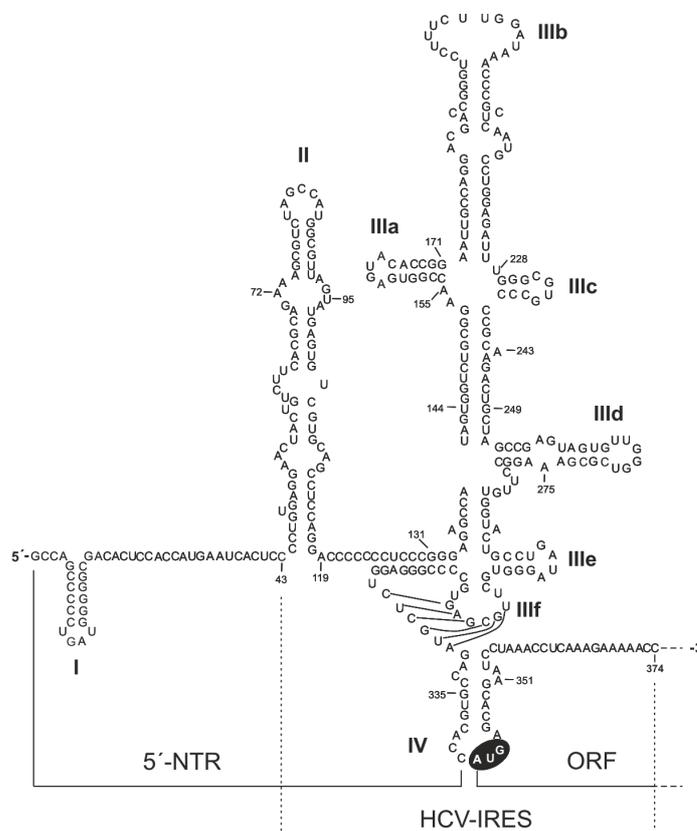
**Abbildung 1: Aufbau und Genom-Organisation des HCV.** (A) Modell des mit Lipoproteinen assoziierten HCV-Partikels bestehend aus einem RNA-Genom enthaltenden Kapsid, umhüllt von einer Membran zellulären Ursprungs in die die viralen Glykoproteine E1 und E2 eingelagert sind. (B) Schematische Darstellung des einzelsträngigen (ss) Positivstrang (+) RNA-Genoms des Hepatitis C Virus bestehend aus der 5'-nicht-translatierten Region (5'-NTR), einem offenen Leserahmen (ORF) kodierend für ein Polyprotein und der 3'-nicht-translatierten Region (3'-NTR).

Das HCV-RNA-Genom (Abb. 1B) hat eine Länge von etwa 9600 Nukleotiden (nts) und liegt in Positivstrang-Orientierung entsprechend einer eukaryotischen Messenger-RNA (mRNA) vor

(Takamizawa et al., 1991). Anders als zelluläre mRNAs enthält die virale RNA am 5'-Ende kein 5'-Methylguanosin (Cap-Nukleotid, Cap) und ist am 3'-Ende nicht polyadenyliert. Das HCV-Genom enthält einen einzigen offenen Leserahmen (ORF), der von zwei hochstrukturierten nicht-translatierten Regionen (NTRs) flankiert wird (Takamizawa et al., 1991), die als Kontroll-Elemente der viralen Translation und Replikation fungieren (Friebe et al., 2002,2001; Kim et al., 2002; Bradrick et al., 2006; Song et al., 2006).

**Struktur und Funktion der HCV-5'-NTR**

Die Sequenz der HCV-5'-NTR hat eine Länge von etwa 340 Nukleotiden und ist zwischen den HCV-Genotypen hochgradig konserviert (> 93 %) (Okamoto et al., 1991). Die HCV-5'-NTR hat eine komplexe Sekundärstruktur, die nach dem aktuellen Struktur-Modell in 5'- 3'-Richtung in vier Domänen (I - IV) eingeteilt werden kann (Abb. 2) (Brown et al., 1992; Honda et al., 1999a).



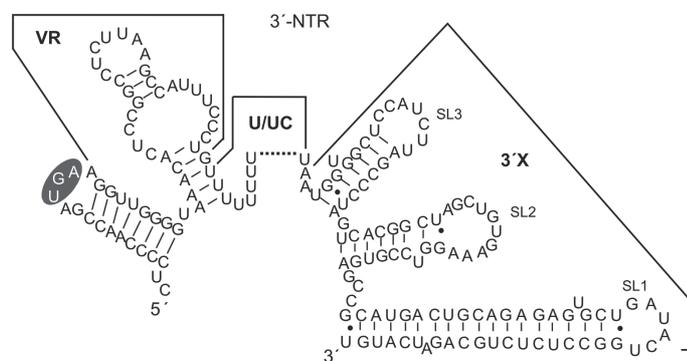
**Abbildung 2: Sequenz und Sekundärstruktur der HCV-5'-NTR mit anschließendem ORF** (verändert nach Honda et al., 1999a). Die römischen Ziffern I – IV bezeichnen die vier Domänen der HCV-5'-NTR. Die HCV-IRES (interne Ribosomen-Eintrittsstelle) beinhaltet die Domänen II – IV sowie ein Stück des offenen Leserahmens (ORF). Das Start-Codon der Protein-kodierenden Sequenz (AUG) ist schwarz unterlegt.

Die Domänen I und II und IV bilden einfachere Haarnadelstrukturen, während die Domäne III eine komplexe Struktur hat, die weiterhin in die Subdomänen (IIIa – f) eingeteilt wird. Die Haarnadelstruktur der Domäne IV wird sowohl von Sequenzen der 5'-NTR als auch von den ersten Nukleotiden des Protein-kodierenden Bereiches gebildet und enthält demzufolge das Start-Codon (AUG) des ORF (Honda et al., 1996).

Die 5'-NTR des HCV-Genoms ist im Wesentlichen Ort der Initiation der Translation des viralen ORF. Die Domäne II – IV inklusive der ersten 32 Nukleotide des ORF bilden als funktionelle Einheit eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) (Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Wang et al., 1993; Reynolds et al., 1995; Honda et al., 1999a). Die IRES ermöglicht eine Cap-Nukleotid unabhängige Initiation der Translation des viralen Genoms, indem sie die direkte Bindung des Ribosoms an die HCV-RNA in der Nähe des Start-Codons des offenen Leserahmens vermittelt (Ji et al., 2004; Otto & Puglisi, 2004). Die Domäne I der HCV-5'-NTR ist nicht Teil des eigentlichen IRES-Elements und für dessen Funktionalität nicht essentiell (Friebe et al., 2001). Es gibt jedoch kontroverse Studien, die sowohl positive als auch negative Effekte der Domäne I auf die IRES-Aktivität beschreiben (Fukushi et al., 1994; Rijnbrand et al., 1995; Luo et al., 2003; Grassmann et al., 2005). Andere Studien zeigten, dass die Domäne I sowie auch Domäne II wichtig für die Replikation des Virusgenoms ist (Friebe et al., 2001; Kim et al., 2002; Luo et al., 2003).

### Struktur und Funktion der HCV-3'-NTR

Anders als bei den meisten anderen Positivstrang-RNA-Viren, die einen Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende des RNA-Genoms tragen, enthält das HCV-Genom am 3'-Ende eine charakteristische 3'-nicht-translatierte Region (3'-NTR) mit einer Länge von etwa 225 Nukleotiden (Abb. 3). Wie die HCV-5'-NTR bildet die Sequenz der HCV-3'-NTR geordnete Strukturen, die in drei Regionen eingeteilt werden (Kolykhalov et al., 1996).



**Abbildung 3: Sequenz und Sekundärstruktur der HCV-3'-NTR** (verändert nach Blight & Rice, 1997; Kolykhalov et al., 1996). Die Darstellung zeigt beispielhaft die Sequenz und Struktur der 3'-NTR des HCV-Genoms Genotyp 1a. Die 3'-NTR enthält eine variable Region (VR), einen Poly-U/UC-Trakt (U/UC) und die X-Region (3'X). Das Stop-Codon der Protein-kodierenden Region ist grau unterlegt.

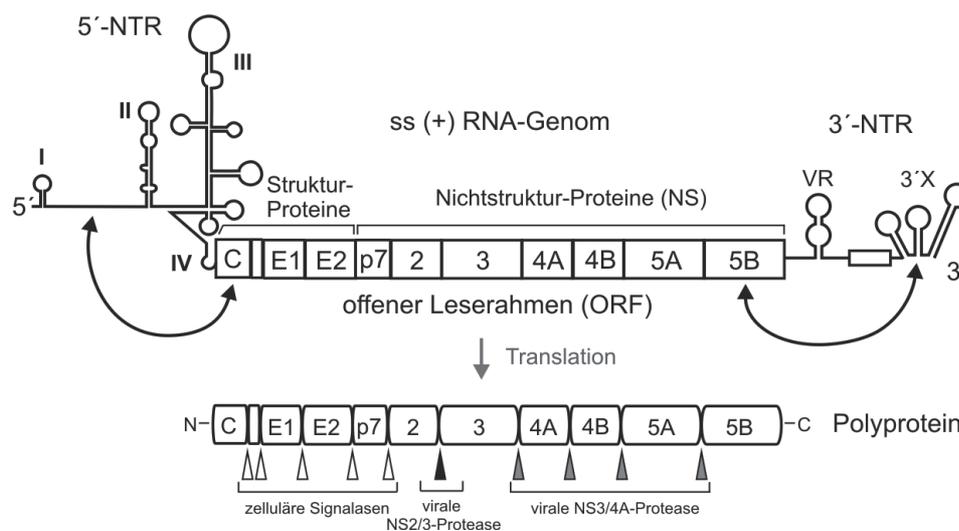
An das Stop-Codon der Polyprotein-kodierenden Sequenz (UGA) schließt eine kurze sogenannte variable Region (VR) an, deren Sequenz eine hohe Diversität innerhalb der HCV-Genotypen aufweist. Darauf folgt der Poly-U/UC-Trakt (U/UC), eine Pyrimidin-reiche Sequenz unterschiedlicher Länge (Tanaka et al., 1996, Yamada et al., 1996). Das 3'-Ende des HCV-Genoms bildet die X-Region (3'X) eine hochkonservierte Sequenz von 98 Nukleotiden, die drei distinkte Haarnadelstrukturen ausbildet (SL 1 – 3) (Kolykhalov et al., 1996; Blight & Rice, 1997).

An der HCV-3'-NTR erfolgt die Initiation der Replikation des HCV-Genoms. Mutagenese-Studien zeigten, dass eine minimale Länge des Poly-U/UC-Traktes von 25 Nukleotiden sowie die vollständige X-Region der HCV-3'-NTR für die Replikation der HCV-RNA essentiell sind (Yanagi et al., 1999; Kolykhalov et al., 2000; Friebe & Bartenschlager, 2002; Yi & Lemon, 2003a/b), während die variable Region (VR) nur modulierende Funktion hat (Friebe & Bartenschlager, 2002).

Die Funktion der HCV-3'-NTR bei der Translation des HCV-Genoms wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Einige Studien berichteten keinen Einfluss der 3'-NTR auf die Translation (Murakami et al., 2001; Friebe & Bartenschlager, 2002), während andere Studien einen translationssteigernde Wirkung zeigten (Ito et al., 1998; Bradrick et al., 2006). Durch Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die kontroversen Ergebnisse verschiedener Studien im Wesentlichen auf der Verwendung unterschiedlicher Reporter-Konstrukte beruhen (Song et al., 2006). Durch Verwendung von monocistronischen HCV-Reporter-RNAs, die am ehesten den authentischen Ablauf der HCV-Translation widerspiegeln, konnte gezeigt werden, dass die vollständige 3'-NTR mit einem exakten 3'-Ende maßgeblich zur Effizienz der HCV-Translation beiträgt (Song et al., 2006).

#### Organisation und Funktion des offenen Leserahmens

Die Sequenz des offenen Leserahmens (ORF) kodiert für ein virales Polyprotein von etwa 3000 Aminosäuren, welches ko- und posttranslational durch virale und zelluläre Proteasen in einzelne Proteine gespalten wird (Abb. 4). Der 5'-Bereich kodiert für die viralen Struktur-Proteine Core (C), E1 und E2, die Bestandteile des Virions sind (siehe auch Abb.1A). Im 3'-Bereich des ORF befinden sich die Sequenzen für die Nicht-Struktur-Proteine (NS), die im Wesentlichen an der Prozessierung des Polyproteins und der Replikation des viralen Genoms beteiligt sind (zusammengefasst in Moradpour et al., 2007; Tang & Grisé, 2009).



**Abbildung 4: Organisation und Funktion des offenen Leserahmens der HCV-RNA.** Der offene Leserahmen des HCV-Genoms kodiert für virale Struktur- und Nichtstruktur-Proteine, die als Polyprotein exprimiert werden. Das Polyprotein wird durch zelluläre und virale Proteasen prozessiert; unterschiedlich gefärbte Dreiecke kennzeichnen die Spaltstellen. Des Weiteren enthalten die Sequenzen kodierend für das Core-Protein (C) und NS5B-Protein (5B) regulatorische Elemente, die über RNA-RNA-Interaktionen (gekennzeichnet durch Pfeile) mit der HCV-5'-NTR oder HCV-3'-NTR die Translation und Replikation der HCV-RNA regulieren.

Entgegen der hohen Nukleotiddiversität der Protein-kodierenden Sequenz zwischen den HCV-Genotypen konnten auch innerhalb des ORF konservierte Elemente nachgewiesen werden, die die Translation und Replikation des HCV-Genoms beeinflussen.

Die Core-kodierende Sequenz, die direkt an die HCV-5'-NTR anschließt, weist innerhalb des ORF die geringste Variabilität auf (Ina et al., 1994; Simmonds, 1995). Sie beinhaltet eine Region mit konservierter Nukleotidabfolge (siehe auch Anhang), die komplementär zu einem Sequenzabschnitt zwischen Domäne I und II in der HCV-5'-NTR ist (Honda et al., 1999b; Wang et al., 2000; Kim et al., 2003). Untersuchungen zeigten, dass eine RNA-RNA-Interaktion dieser komplementären Sequenzbereiche (Abb. 4) einen Einfluss auf die Translationseffizienz der HCV-RNA hat und diese reprimiert (Honda et al., 1999b; Wang et al., 2000; Kim et al., 2003). Des Weiteren bildet die Core-kodierende Sequenz konservierte Haarnadelstrukturen aus, deren Funktion noch wenig untersucht ist (Tuplin et al., 2002, 2004). Erste Studien deuten darauf hin, dass sie einen positiven Effekt auf Translation des HCV-Genoms haben (McMullan et al., 2007; Vassilaki et al., 2008).

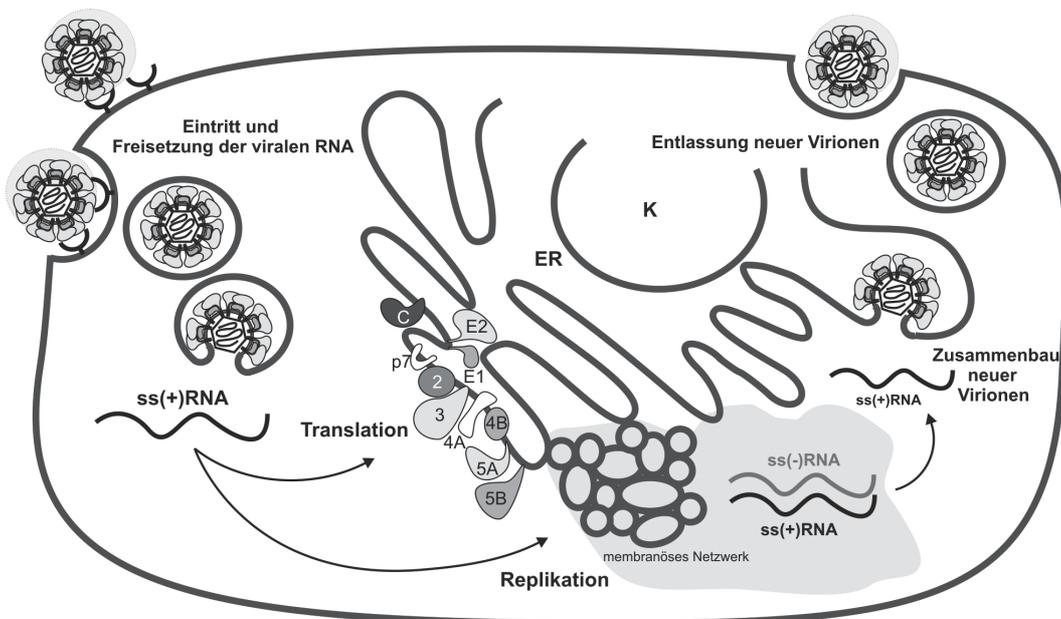
Auch das 3'-Ende der kodierenden Sequenz für das NS5B-Protein weist eine konservierte Sekundärstruktur auf (Tuplin et al., 2002, 2004), die essentiell für die Replikation des HCV-Genoms ist (You et al., 2004; Friebe et al., 2005; Diviney et al., 2008). Friebe et al. (2005) wiesen nach, dass die entsprechende Region konservierte Sequenzabschnitte enthält, die mit komplementären Sequenzen in der X-Region der HCV-3'-NTR eine RNA-RNA-Interaktion („kissing-loop“) eingehen und so die Replikation fördern.

### 1.3 Vermehrungszyklus des Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus repliziert bevorzugt in humanen Hepatozyten. Ein entscheidendes Merkmal der Reproduktion des HCV ist die schnelle Generation von Virus-Varianten, verursacht durch die hohe Fehlerrate von etwa  $10^{-4}$  der viruskodierten RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Lohmann et al., 2000), die eine effiziente Immunevasion und damit eine persistierende Infektion hervorrufen.

Das HCV ist ein Positivstrang-RNA-Virus, deren Vermehrung generell im Zytoplasma der Wirtszellen stattfindet. Folglich steht dem Virus der zelluläre Translationsapparat für die Produktion viraler Proteine zur Verfügung, während die Enzyme für die Replikation des viralen Genoms wie eine RNA-abhängige RNA-Polymerase nicht vorhanden sind und vom Virus selbst kodiert werden. Der erste Schritt bei der Reproduktion des Virus nach dem Eintritt in die Wirtszelle ist daher die Translation des RNA-Genoms zur Synthese der viralen Proteine. Erst im Anschluss kann die Vervielfältigung des HCV-Genoms stattfinden, welches in neue Virionen verpackt wird.

Die molekularen Abläufe des Vermehrungszyklus des HCV sind noch nicht vollständig bekannt. Das folgende Kapitel und Abbildung 5 geben einen Überblick über die bisherigen Kenntnisse und Hypothesen.



**Abbildung 5: Vermehrungszyklus des Hepatitis C Virus.** Schematische Darstellung des Vermehrungszyklus des HCV. ss(+)-RNA, einzelsträngiges Positivstrang-RNA-Genom; ss(-)-RNA, einzelsträngiges Antigenom; ER, Endoplasmatisches Retikulum; K, Zellkern.

#### Anlagerung und Eintritt in die Wirtszelle

Die Anlagerung des HCV an die Wirtszelle und die Aufnahme der Virionen ist nach bisherigen Kenntnissen ein mehrschrittiger Prozess, der durch die Wechselwirkung der Virus-assoziierten Lipoproteine und des viralen Hüllproteins E2 mit verschiedenen zellulären Rezeptoren vermittelt wird (zusammengefasst in Burlone & Budkowska, 2009; Tang & Gris , 2009). Es wird vermutet, dass der initiale Kontakt der Lipo-Viro-Partikel mit der Wirtszellmembran durch eine Interaktion mit dem *Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor* (LDL-R) (Agnello et al., 1999; Molina et al., 2007) sowie Lectinen (DC-SIGN und L-SIGN) (Gardner et al., 2003; Lozach et al., 2004) und Glykosaminoglykanen (Germi et al., 2002; Barth et al., 2006b) hergestellt wird. Für die Aufnahme des HCV-Partikels ist dann wahrscheinlich eine spezifische Interaktion des viralen Hüllproteins E2 mit dem Oberflächenmolekül CD81 (Pileri et al., 1998, Wunschmann et al., 2000; Molina et al., 2008) und dem Scavenger-Rezeptor der Klasse B Typ1 (Scarselli et al., 2002; Zeisel et al., 2007) erforderlich. Neuere Untersuchungen zeigen zudem, dass Claudin-1 und Occludin, wichtige Bestandteile von Zell-Zell-Verbindungen (engl. *tight junctions*), als Ko-Rezeptoren fungieren und den Eintritt des Virus an der basolateralen Membran der Hepatozyten initiieren (Evans et al., 2007; Liu et al., 2009). Des Weiteren wird auch eine direkte Aufnahme der HCV-Partikel nach Bindung an den LDL-R diskutiert.

Die Einschleusung der HCV-Partikel in die Wirtszelle erfolgt nach bisherigen Kenntnissen über Clathrin-vermittelte Endozytose (Blanchard et al., 2006). Es folgt die Entlassung des viralen Genoms in das Zytoplasma der Zelle durch eine pH-abhängige Verschmelzung der Virushülle mit der Endosomenmembran, wobei die viralen Hüllproteine E1 und E2 vermutlich als Fusionsproteine fungieren (Garry & Dash, 2003; Tschernie et al., 2006; Lavilette et al., 2007).

### Translation und Prozessierung des Polyproteins

Nach der Entlassung des viralen RNA-Genoms in das Zytoplasma der Wirtszelle kann dieses aufgrund seiner Positivstrang-Orientierung durch den zellulären Proteinsyntheseapparat direkt translatiert werden. Die Synthese des Polyproteins erfolgt an den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER) (Abb.5). Das wachsende Polyprotein wird in der ER-Membran verankert und dort ko- und posttranslational durch zelluläre Signalasen und die viruskodierten Proteasen NS2/3 und NS3/4A in funktionale virale Proteine gespalten (siehe auch Abb. 4) (Grakoui et al., 1993; Hijikata et al., 1993a/b; Bartenschlager et al., 2004). Der Großteil der reifen viralen Proteine verbleibt anschließend integriert oder assoziiert an der ER-Membran (Moradpour et al., 2007). Ihre wichtigsten bekannten Eigenschaften und Funktionen im Vermehrungszyklus des HCV sind in Tabelle 1 zusammengefasst (siehe auch Bartenschlager et al., 2004; Moradpour et al., 2007; Tang & Grisé 2009).

**Tabelle 1: Zusammenfassung der Eigenschaften und Funktionen der HCV-Proteine**

Proteine	Funktion
Core	Hauptbestandteil Kapsid, Bindung der viralen RNA und Verpackung in Viruspartikel
E1	Glykosyliertes Hüllprotein, Fusionsprotein (Entlassung des viralen Genoms ins Zytoplasma)
E2	Glykosyliertes Hüllprotein, Rezeptorbindung, Fusionsprotein
p7	Ionenkanal (?) (Reifung und Entlassung neuer Virionen)
NS2	Bestandteil der viralen NS2/3-Protease (Spaltung des Polyproteins)
NS3	Bestandteil der viralen NS2/3- und NS3/4A-Protease (Spaltung des Polyproteins) Bestandteil des Replikationskomplexes: NTPase/Helikase-Aktivität
NS4A	Kofaktor für NS3/4A-Protease (Spaltung des viralen Polyproteins)
NS4B	Induktion der Bildung eines membranösen Netzwerks für die Replikation
NS5A	Bildung des Replikationskomplexes
NS5B	RNA-abhängige RNA-Polymerase

### Replikation des RNA-Genoms

Für die Amplifikation des viralen Genoms werden die Nicht-Strukturproteine 3 und 4B bis 5B benötigt, die mit der HCV-RNA stabile Replikationskomplexe bilden (Egger et al., 2002; Gosert et al., 2003; Moradpour et al., 2003). Die Bildung dieser Replikationskomplexe erfolgt wie bei anderen Positivstrang-RNA Viren membranassoziiert an einem sogenannten membranösen Netzwerk (engl. *membranous web*), dessen Bildung durch das virale NS4B-Protein induziert wird (Abb. 5) (Egger et al., 2002; Moradpour et al., 2003). Das Schlüsselprotein der Replikation des HCV-Genoms ist die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B, die nach Kenntnissen aus *in vitro* Studien die Replikation am 3'-Ende der HCV-RNA de novo initiiert (Lohmann et al., 1997; Oh et al., 1999; Luo et al., 2000).

Die einzelnen Schritte der Replikation des HCV sind weitestgehend unbekannt. In Analogie zu anderen Flaviviren wird angenommen, dass die genomische RNA als Matrize für die Synthese eines

RNA-Moleküls mit Negativstrang-Orientierung (Antigenom) dient, welches mit der Positivstrang-RNA Basenpaarungen eingeht (Abb. 5). Diese replikative Form doppelsträngiger RNA dient dann als Matrize für die semikonservative Synthese neuer einzelsträngiger Positivstrang-RNA, die erneut translatiert, repliziert oder in neue Viruspartikel verpackt werden kann (Bartenschlager et al., 2004).

#### Zusammenbau und Freisetzung neuer Viruspartikel

Die Verpackung der viralen RNA in neue Viruspartikel wird durch die Interaktion des Core-Proteins mit dem RNA-Genom initiiert, welches im Folgenden das virale Kapsid bildet (Kunkel et al., 2001; Miyanari et al., 2007). Die Kapside werden wahrscheinlich durch Knospung am endoplasmatischen Retikulum von der zellulären Membran umhüllt und als reife HCV-Partikel über den konstitutiven sekretorischen Weg aus der Zelle ausgeschleust (Abb. 5) (Roingeard et al., 2004). Wie bei der Aufnahme der HCV-Partikel in Hepatozyten gibt es auch bei der Reifung und Freisetzung infektiöser Virionen Hinweise auf eine Beteiligung von Lipoproteinen (Chang et al., 2007; Miyanari et al., 2007; Gastaminza et al., 2008).

## **2 Molekulare Mechanismen der Translation**

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den molekularen Mechanismen der Translation des HCV-RNA-Genoms und deren Regulation durch leberspezifische Faktoren. Im nächsten Kapitel sollen daher die Grundlagen der bisher bekannten Mechanismen der Translation eukaryotischer mRNAs und der HCV-RNA erläutert werden.

Der Mechanismus der Translation kann generell in drei Phasen gegliedert werden: die Initiation, Elongation und Termination. Die Reaktionen jeder Phase werden durch unterschiedliche zelluläre Translationsfaktoren vermittelt. Die molekularen Mechanismen der Translation zellulärer mRNAs und des HCV-RNA-Genoms unterscheiden sich im Wesentlichen bei der Initiation der Translation, die bei mRNAs durch ein Cap-Nukleotid am 5'-Ende vermittelt wird, während die Translation der HCV-RNA Cap-unabhängig an der IRES initiiert wird (zusammengefasst in Lukavsky, 2009; Niepmann, 2009b; Jackson et al., 2010). Der Ablauf der Translationselongation und Termination ist nach bisherigen Kenntnissen identisch.

### **2.1 Die Cap-Nukleotid-abhängige Translation eukaryotischer mRNAs**

In eukaryotischen Zellen ist die Translation räumlich und zeitlich von der Transkription getrennt. Nach der Synthese der mRNA-Vorläufer erfolgt noch im Zellkern die Reifung der mRNA durch das Entfernen der Introns (Spleißen), Anheftung eines Cap-Nukleotids an das 5'-Ende der RNA und Synthese eines Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der RNA, bevor diese für die Translation in das Zytoplasma transportiert wird.

Die reife monocistronische mRNA im Zytoplasma (Abb. 6) enthält am 5'-Ende das Cap-Nukleotid ( $m^7Gppp$ ), ein 7-Methylguanosin, das über eine 5'-5'-Triphosphat-Brücke mit dem ersten Nukleotid der mRNA verknüpft ist. Das Cap-Nukleotid vermittelt den Transport der mRNA ins Zytoplasma, dient als Schutz vor Abbau durch Phosphatasen und Nukleasen und ist essentiell für die Initiation der Translation (Hershey & Merrick, 2000). Zwischen dem Cap-Nukleotid und dem Start-Codon (AUG) für die Translation befindet sich eine 5'-nicht-translatierte Region (5'-NTR). Dem anschließenden offenen Leserahmen folgt eine 3'-nicht-translatierte Region (3'-NTR), die am Ende einen homopolymeren Poly(A)-Trakt von bis zu 300 Nukleotiden besitzt. Der Poly(A)-Schwanz beeinflusst die Stabilität der mRNA und deren Translationseffizienz (Gallie, 1991; Jacobson, 1996).

In der Initiationsphase der Translation (Abb. 6) kommt es zur Bildung eines ribosomalen 80S-Initiationskomplexes am Start-Codon der mRNA. Dieser Prozess ist der limitierende Faktor der Translation und wird von zellulären Proteinen, den eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIFs), vermittelt. Eine Übersicht über die gängigen eIFs und deren Funktion ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Eukaryotische Initiationsfaktoren (eIFs) der Translation und ihre Funktion**

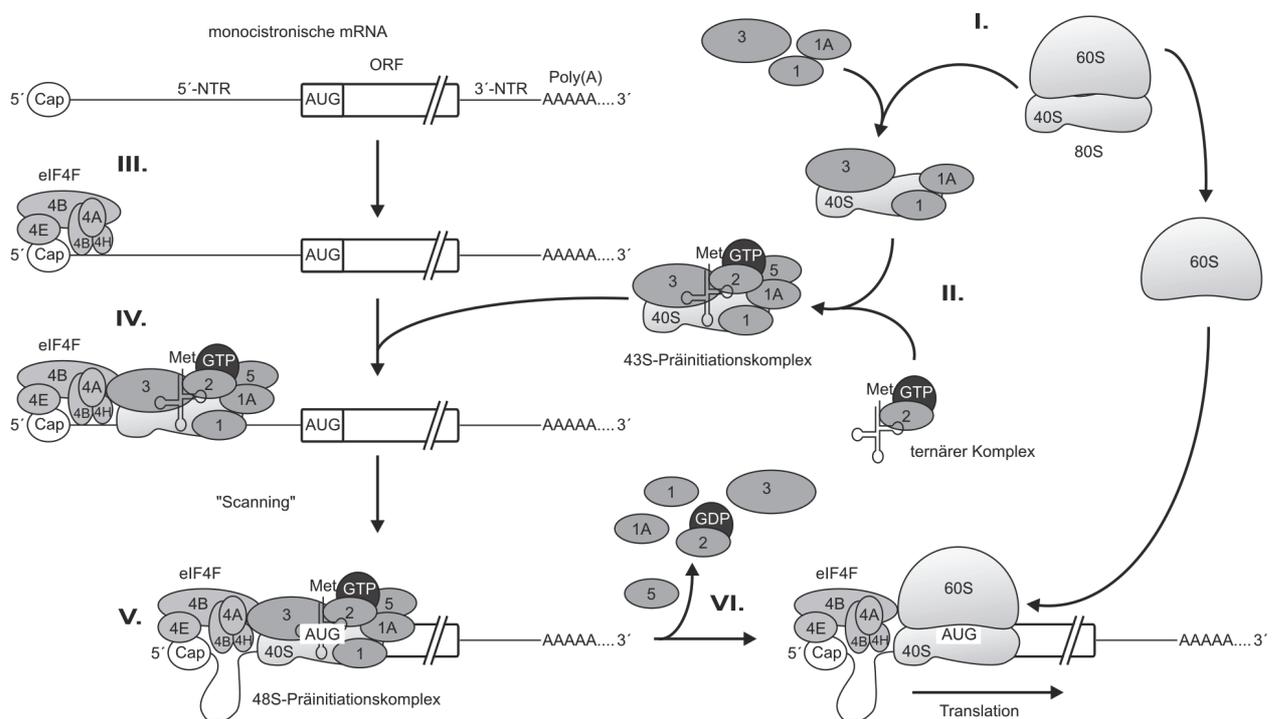
eukaryotische Initiationsfaktoren	Funktion
eIF1 und eIF1A	Dissoziation der 80S-Komplexe in 40S- und 60S-Untereinheiten, Rekrutierung des ternären Komplexes an die 40S-Untereinheit, Selektion des Start-Codons (AUG)
eIF2	Formation des ternären Komplexes mit GTP und Met-tRNA <sub>i</sub> <sup>Met</sup> und Rekrutierung der Initiator-tRNA an die 40S-ribosomale Untereinheit
eIF3	Dissoziation der 80S-Komplexe in 40S- und 60S-Untereinheiten, Rekrutierung des ternären Komplexes an die 40S-Untereinheit, Rekrutierung der 43S-Präinitiationskomplexe durch Interaktion mit eIF4G
eIF4F (Untereinheiten: eIF4A, eIF4B, eIF4G, eIF4H)	eIF4E: Erkennung des Cap-Nukleotids und Rekrutierung von eIF4F eIF4A: ATP-abhängige RNA-Helikase eIFB,H: RNA-Bindung und Förderung der Helikase-Aktivität von eIF4A eIF4G: Rekrutierung der 43S-Präinitiationskomplexe durch Interaktion mit eIF3, Zirkularisierung der mRNA durch Interaktion mit PABP)
eIF5	stimuliert GTPase-Aktivität von eIF2
eIF5B	Bildung des 80S-Komplexes

Die Voraussetzung für die Initiation der Translation ist die Dissoziation der 80S-Ribosomen in die 40S- und 60S-Untereinheiten (Abb.6/I.). Der dissoziierte Zustand wird durch die Bindung von eIF1, eIF1A und eIF3 an die ribosomale 40S-Untereinheit stabilisiert (Pisarev et al., 2007).

Der erste Schritt der Translationsinitiation ist die Bildung eines 43S-Präinitiationskomplexes (Abb.6/II.). Dazu bindet der „ternäre Komplex“, bestehend aus einer Methionyl-beladenen Initiator-tRNA (Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>) und dem GTP-gekoppelten eIF2 an die 40S-Untereinheit des Ribosoms (Peterson et al., 1979a; Olsen et al., 2003; Jackson et al., 2010).

Anschließend erfolgt die Rekrutierung dieses 43S-Präinitiationskomplexes an das 5'-Ende der mRNA (Abb.6/III., IV.). Dieser Schritt erfordert die Erkennung des Cap-Nukleotids und die Entwindung der

Sekundärstrukturen am 5'-Ende der RNA. Die Cap-Erkennung erfolgt durch Bindung des Proteinkomplex eIF4F (bestehend aus den Untereinheiten eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4G und eIF4H), vermittelt durch die Untereinheit eIF4E (Gingras et al., 1999; Jackson et al., 2010). Es folgt die Entwindung der Sekundärstrukturen durch die ATP-abhängige Helikase-Aktivität der Untereinheit eIF4A und deren Ko-Faktoren eIF4B und H (Rogers et al., 1999; Marintchev et al., 2009). Die Anlagerung des 43S-Komplexes an das 5'-Ende der mRNA wird hauptsächlich durch die Untereinheit eIF4G vermittelt, die mit eIF3 des Präinitiationskomplexes interagiert (Gingras et al., 1999; Le Febvre et al., 2006). eIF4G interagiert zusätzlich mit dem Poly(A) bindenden Protein (PABP) am 3'-Ende der mRNA, wodurch es zu einer Zirkularisation der mRNA kommt, die die Translationseffizienz der mRNA fördert (Gingras et al., 1999; Borman et al., 2000; Kahvejian et al., 2005).



**Abbildung 6: Die Cap-Nukleotid-abhängige Translationsinitiation an einer zellulären mRNA** (zusammengefasst aus Hershey & Merrick, 2000; Jackson et al., 2010). Die römischen Ziffern I bis VI bezeichnen die Schritte der Initiation der Translation an einer mRNA, die im Text beschrieben sind. **I.** Dissoziation der 80S-Ribosomen, **II.** Bildung des 43S-Präinitiationskomplexes, **III.** Erkennung des Cap-Nukleotids (Cap) durch eIF4F, **IV.** Rekrutierung des 43S-Präinitiationskomplexes an die mRNA, **V.** Bildung des 48S-Präinitiationskomplexes durch „Scanning“ und Erkennung des Start-Codons (AUG), **VI.** Dissoziation der eIFs durch GTP-Hydrolyse und Anlagerung der 60S-Ribosomenuntereinheit. NTR, nicht-translatierte Region; ORF, offener Leserahmen; Met, Methionyl-beladene Initiator-tRNA.

Nach der Rekrutierung der 43S-Komplexe erfolgt ein Prozess, der als „Scanning“ bezeichnet wird und bei dem die ribosomale 40S-Untereinheit mit den assoziierten Initiationsfaktoren unter ATP-Verbrauch an der 5'-nicht-translatierten Region der mRNA in 5'-3'-Richtung bis zum Start-Codon AUG entlang gleitet (Abb. 6/IV., V.) (Pestova & Kolupaeva, 2002). Das „Scanning“ wird durch die Initiationsfaktoren 1 und 1A unterstützt, die eine „offene“ Konformation des ribosomalen Komplexes begünstigen, bis das Start-Codon erreicht ist (Pestova et al., 1998a; Lomakin et al., 2003). Die Erkennung eines AUG-Triplets als Start-Codon wird gefördert, wenn sich dieses innerhalb einer

bestimmten Konsensus-Sequenz (Kozak-Sequenz) befindet (Kozak, 1989a/b; Pisarev et al., 2006). In diesem Fall erfolgt die Bildung des 48S-Präinitiationskomplexes durch die Basenpaarung des AUG-Tripletts mit dem Anticodon der Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>.

Im letzten Schritt der Translationsinitiation erfolgt die Bildung des 80S-Komplexes durch Dissoziation der eIFs und Anlagerung der ribosomalen 60S-Untereinheit (Abb.6/V., VI.). Dabei katalysiert eIF5 die Hydrolyse des eIF2-gebundenen GTP, woraufhin die Initiationsfaktoren entlassen werden (Paulin et al., 2001; Unbehaun et al., 2004). Die freiwerdenden Initiationsfaktoren stehen für eine erneute Translationsrunde zur Verfügung. Unter Beteiligung von eIF5B erfolgt die Anlagerung der 60S-Untereinheit und Positionierung des Start-Codons mit der hybridisierten Initiator-tRNA in der P-Stelle des Ribosoms, an der das Start-Methionin nun für die Verknüpfung mit der folgenden Aminosäure bereitsteht (Hershey and Merrick 2000; Pestova et al., 2000).

Es folgt die Elongationsphase der Translation, in der der ribosomale 80S-Komplex unter Energieverbrauch und Beteiligung von Elongationsfaktoren den Code der mRNA in Tripletteinheiten abliest und in die Aminosäureabfolge der synthetisierten Polypeptidkette umsetzt. Die Termination der Translation wird durch die Erkennung eines Stop-Codons (UAG, UAA oder UGA) eingeleitet. Durch die eukaryotischen Terminations- oder Release-Faktoren (eRF1 und eRF3) wird die synthetisierte Polypeptidkette von der Peptidyl-tRNA freigesetzt und gleichzeitig die Dissoziation des Translationskomplexes induziert (Kisselev et al., 2003).

## 2.2 Die IRES-vermittelte Translation des HCV-RNA-Genoms

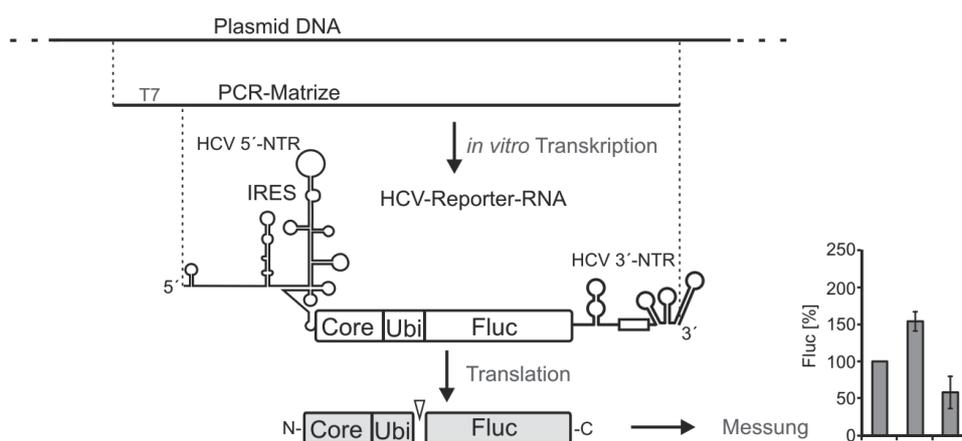
Die Translation ist für viele Viren, besonders für Positivstrang-RNA-Viren wie das HCV, neben dem Eintritt in die Wirtszelle einer der wichtigsten regulierenden Schritte des Vermehrungszyklus, bei dem sie auf den zellulären Syntheseapparat angewiesen sind. Die virale RNA konkurriert folglich mit der zellulären mRNA um die Rekrutierung der zellulären Translationsmaschinerie. Die Nutzung eines alternativen Mechanismus zur Translationsinitiation vermittelt durch eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) bietet dabei einen Selektionsvorteil, da dies unabhängig vom Cap-Nukleotid und je nach Konstitution der IRES unabhängig von den meisten zellulären eIFs stattfindet (zusammengefasst in Balvay et al., 2009).

IRES-Elemente wurden 1988 bei den Positivstrang-RNA-Viren EMCV (Encephalomyocarditis Virus) und Poliovirus, die zur Familie *Picornaviridae* gehören, entdeckt und charakterisiert (Jang et al., 1988; Pelletier and Sonenberg, 1988). Seitdem erfolgte der Nachweis von IRES-Elementen bei zahlreichen weiteren Positivstrang-RNA-Viren wie Picornaviren und Flaviviren sowie auch DNA-Viren wie Herpesviren (für eine Übersicht siehe Doudna & Sarnow, 2007). Des Weiteren wurde auch für eine Vielzahl von zellulären mRNAs, die unter anderem in Phasen zellulären Stresses sowie während der Zellteilung translatiert werden, eine IRES-vermittelte Translation beschrieben (Komar et al., 2005).



### 3 Ein monocistronisches HCV-Reporter-System zur Untersuchung der HCV-Translation

Die Untersuchung des Einflusses leberspezifischer Faktoren auf die Translation der HCV-RNA erfolgte aufgrund der Infektiösität der HCV-RNA und Einstufung des Virus in die Laborsicherheitsstufe 3 (S3) hauptsächlich mittels eines monocistronischen HCV-Reporter-Systems (Abb. 8) (Song et al., 2006). Dieses Reporter-System erlaubt die Simulation der Translation der HCV-RNA in Abhängigkeit der viralen cis-regulatorischen Elemente und die Bestimmung der Translationseffizienz durch Messung der Reporter-Aktivität.



**Abbildung 8: Das HCV-Reporter-System.** Schema zur Herstellung der HCV-Reporter-RNA und Bestimmung der Translationseffizienz durch Messung der Aktivität des exprimierten Reporter-Proteins *Firefly*-Luziferase (Fluc).

Ausgehend von einer Plasmid-DNA werden dazu über PCR DNA-Matrizen hergestellt, von denen HCV-Reporter-RNAs *in vitro* transkribiert werden. Die HCV-Reporter-RNAs enthalten am 5'-Ende die HCV-5'-NTR, gefolgt von den ersten 264 Nukleotiden der Core-kodierenden Sequenz, um die Funktionalität der IRES sicher zu stellen (Reynolds et al., 1995; Honda et al., 1999a). Am 3'-Ende ist die HCV-3'-NTR enthalten, deren exaktes Ende durch die Transkription der Reporter-RNA von PCR-Matrizen gewährleistet ist (Song et al., 2006). Statt der Protein-kodierenden Sequenz des HCV enthält die HCV-Reporter-RNA eine Sequenz kodierend für das Reporter-Protein *Firefly*-Luziferase (Fluc), welches bei Transfektion in Zellen oder Translation *in vitro* unter Kontrolle der viralen cis-regulatorischen Elemente exprimiert wird. Die anschließend messbare enzymatische Aktivität des Reporter-Proteins ist daher ein Maß für die Effizienz der HCV-IRES-vermittelten Translation der Reporter-RNA. Um eine korrekte Prozessierung des Reporter-Proteins zu gewährleisten, enthält die HCV-Reporter-RNA eine Ubiquitin-Sequenz, die die kotranslationale Abspaltung des unvollständigen Core-Proteins am N-Terminus der *Firefly*-Luziferase vermittelt.

## 4 Einfluss einer leberspezifischen microRNA auf den Vermehrungszyklus des HCV

Der Lebertropismus des HCV deutet auf eine Abhängigkeit des Vermehrungszyklus von leberspezifischen Faktoren hin. Neben der Identifizierung von meist ubiquitär exprimierten zellulären Proteinen, die an der Translation und Replikation des HCV beteiligt sind (zusammengefasst in Moriishi & Matsuura, 2007; Randall et al., 2007; Niepmann, 2009a/b), beschrieben Jopling et al. (2005), dass die leberspezifische microRNA-122 die Replikation des HCV-Genoms fördert. Weiterführende Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die microRNA-122 einen stimulierenden Einfluss auf die IRES-vermittelte Translation der HCV-RNA hat (Henke, Goergen et al., 2008).

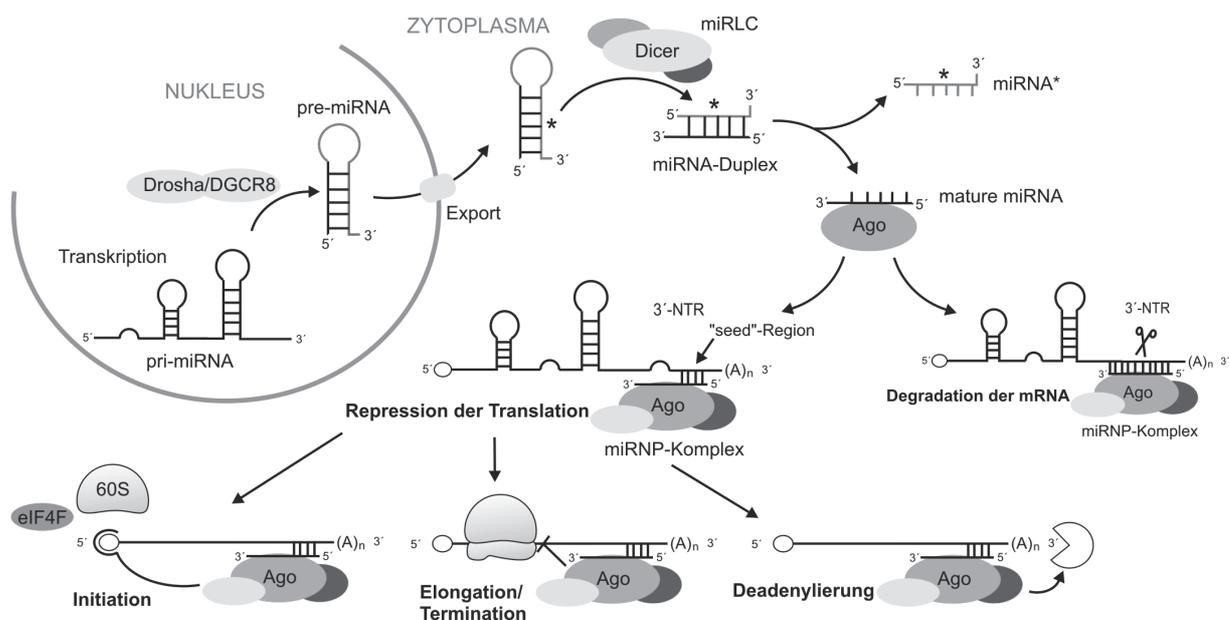
### 4.1 microRNAs - Regulatoren der Translation

MicroRNAs (miRNAs, miRs) bilden eine Klasse von einzelsträngigen nicht-kodierenden RNAs mit einer Länge von 21 - 25 Nukleotiden. Als Bestandteil von microRNA-Protein-Komplexen (miRNP-Komplexen) fungieren sie im Zytoplasma humaner Zellen als Regulatoren der posttranskriptionellen Genexpression. Die Regulation der Translation durch microRNAs erfolgt nach bisherigen Kenntnissen hauptsächlich durch Interaktion der miRNP-Komplexe mit der 3'-NTR der Ziel-mRNA, was im Allgemeinen zu einer Inhibition der Proteinsynthese führt (zusammengefasst in Liu et al., 2008; Chekulaeva & Filipowicz et al., 2009).

#### 4.1.1 Biogenese und Funktion von microRNAs

Die Generierung von microRNAs erfolgt hauptsächlich aus Primärtranskripten der Polymerase II (Lee et al., 2004) (Abb. 9). Der erste Schritt der microRNA-Reifung erfolgt im Nukleus. Die primären Transkripte der microRNAs (engl. *primary microRNAs*, pri-miRNAs) bilden eine distinkte Sekundärstruktur aus, die durch das Enzym Drosha der RNase III-Familie und das dsRNA-Bindeprotein DGCR8 erkannt wird (Han et al., 2006). Diese bilden mit anderen accessorischen Proteinen einen Mikroprozessor-Komplex und prozessieren die pri-miRNA zu kleineren Haarnadelstrukturen von etwa 70 - 80 Nukleotiden mit einem 3'-Überhang (Denli et al., 2004). Diese Vorläufer-microRNAs (engl. *precursor microRNAs*, pre-miRNAs) werden anschließend durch Exportin-5 in Anwesenheit von Ran-GTP über die Poren der Kernmembran aktiv in das Zytoplasma transportiert (Bohnsack et al., 2004).

Im Zytoplasma erfolgt die Prozessierung der pre-miRNAs durch das Enzym Dicer zu 21 - 25 Nukleotide langen doppelsträngigen microRNAs mit 3'-Überhängen, auch microRNA-Duplexe (miRNA-Duplexe, miR dupl) genannt. Das Enzym Dicer enthält neben einer dsRNA-Bindedomäne (dsRBD) eine Domäne, die die durch Drosha generierten 3'-Überhänge der pre-miRNA erkennt (PAZ-Domäne), und zwei RNase III-Domänen, die die pre-miRNA ausgehend vom 3'-Überhang nach etwa 22 Nukleotiden schneiden (Zhang et al., 2004).



**Abbildung 9: Biogenese und Funktion von microRNAs.** Die Primärtranskripte (pri-miRNA) werden durch Enzyme der RNase III Familie Drosha und Dicer zu reifen, einzelsträngigen microRNAs (mature miRNA) prozessiert, die mit Ago-Proteinen im Zytoplasma in microRNA-Effektor-Komplexe (miRNP-Komplexe) eingebaut werden. miRLC, microRNA-Lade-Komplex. Durch Interaktion der miRNP-Komplexe mit der 3'-NTR einer Ziel-RNA kommt es basierend auf verschiedenen Mechanismen zur Inhibition der Translation.

Die produzierten miRNA-Duplexe werden im Folgenden entwunden (Tomari et al., 2005). Dabei wird an dem Ende mit der geringeren thermodynamischen Stabilität begonnen. Der Strang, dessen 5'-Ende zuerst entwunden wird, bildet die reife einzelsträngige microRNA (engl. *mature miRNA*, miR mat), die anschließend an ein Ago-Protein (Ago) gebunden in microRNA-Effektor-Komplexe eingebaut wird, während der Gegenstrang (miRNA\*) abgebaut wird (Tomari et al., 2005). Die reife microRNA gebunden an ein Ago-Protein stellt die Kern-Komponente eines Effektor-Komplexes dar, der mit anderen assoziierten zellulären Proteinen modulierend auf die Translation der Ziel-mRNAs wirkt und als miRNP-Komplex bezeichnet wird.

Die genauen molekularen Mechanismen und die Reihenfolge der Protein-miRNA-Interaktionen bei der Bildung der miRNP-Komplexe in humanen Zellen sind noch nicht vollständig bekannt. Es wird vermutet, dass die Prozessierung der microRNAs im Zytoplasma und der Einbau in Effektor-Komplexe an einem miRNA-Lade-Komplex (miRLC) stattfindet, der sowohl Dicer und Ago als auch andere an der Reifung der microRNAs beteiligte Proteine enthält (Maniataki & Mourelatos, 2005).

Die Ago-Proteine sind die Schlüssel-Proteine der miRNA-vermittelten Translationsregulation und gehören zur Familie der Argonaute-Proteine. Sie kommen in fast allen Organismen vor und sind evolutionär stark konserviert. Die etwa 100 kDa großen Ago-Proteine enthalten wie Dicer eine PAZ-Domäne, die die 3'-Überhänge der miRNA bindet (Lingel et al., 2004; Lingel & Sattler 2005), und eine PIWI-Domäne mit einer Bindestelle für die 5'-Phosphat-Enden der miRNAs (Ma et al., 2005). Die PIWI-Domäne vieler Ago-Proteine zeigt außerdem Endonukleaseaktivität ähnlich der RNase H, die RNA-Doppelstränge schneidet (Song et al., 2004). In humanen Zellen wurden die Ago-Proteine 1 - 4 als Bestandteile von miRNP-Komplexen identifiziert (Meister et al., 2004). In der Literatur ist

jedoch eine Beteiligung von Ago2, welches als einziges humanes Ago-Protein Endonukleaseaktivität zeigt, an der Translationsregulation am häufigsten beschrieben (zusammengefasst in Liu et al., 2008; Chekulaeva & Filipowicz, 2009).

Die Funktion der miRNAs in den miRNP-Komplexen ist die Identifizierung der Ziel-RNA durch Hybridisierung mit komplementären Sequenzen in der 3'-NTR der mRNA. Das wichtigste Ereignis für die Spezifität der Ziel-Erkennung ist hierbei die Paarung des 5'-Endes der miRNA, der sogenannten „seed“-Sequenz (Nukleotide 2 - 8), mit der mRNA (Abb. 9) (Doench & Sharp, 2004; Brennecke et al., 2005; Lewis et al., 2005). Die Wirkung der miRNP-Komplexe auf die Translation ist weiterhin vom Grad der Basenpaarung der kompletten miRNA mit der 3'-NTR der mRNA abhängig. Bei einer vollständig komplementären miRNA im Komplex mit Ago2 kommt es durch die endonukleolytische Aktivität von Ago2 zur direkten Degradation der mRNA (Hutvanger & Zamore, 2002; Meister & Tuschl, 2004; Yekta et al., 2004). In Säugerzellen wurde dies allerdings bisher selten beobachtet. Die meisten miRNAs weisen eine imperfekte Komplementarität zur mRNA auf, was zu einer Repression der Translation durch andere Mechanismen führt. Hierbei werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert (Abb. 9).

Die meisten Studien deuten auf eine Inhibition der Translationsinitiation hin, indem Proteine des miRNP-Komplexes die Bindung des Cap-Nukleotids durch eIF4F oder die Anlagerung der ribosomalen 60S-Untereinheit blockieren (Humphreys et al., 2005; Chendrimada et al., 2007; Kirakidou et al., 2007; Mahonnet et al., 2007). Andere Studien geben Hinweise auf eine Degradation des wachsenden Polypeptids (Nottrott et al., 2006) oder eine verlangsamte Elongation und frühzeitige Termination der Translation durch Interaktion der miRNP-Komplexe mit der 3'-NTR der mRNA (Petersen et al., 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Ago-Proteine Deadenylase-Komplexe rekrutieren, was zu Deadenylierung und anschließendem Abbau der mRNAs führt (Rehwinkel et al., 2005; Wu et al., 2006; Eulalio et al., 2009).

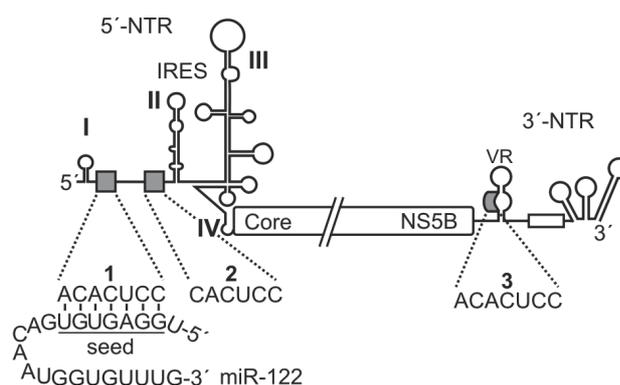
#### **4.2 Die leberspezifische microRNA-122**

Das Expressionsmuster und der Expressionsgrad der miRNAs sind gewebespezifisch, abhängig vom Entwicklungsstadium und dem Status physiologischer Prozesse. Die microRNA-122 (miR-122) wird spezifisch und mit hohem Gehalt in primären Leberzellen sowie in der humanen Hepatoma-Zelllinie Huh7 exprimiert (Lagos-Quintana et al., 2002; Sempere et al., 2004; Landgraf et al., 2007). Knockdown-Studien der miR-122 in Leberzellen weisen auf eine Beteiligung der miR-122 bei der Zelldifferenzierung zu adulten Hepatozyten hin sowie auf eine Funktion bei der Regulation des Lipidmetabolismus (Krützfeld et al., 2005; Esau et al., 2006). In manchen Studien wird zudem beschrieben, dass die maligne Transformation von Hepatozyten mit einer verringerten miR-122-Expression einhergeht, was zur Entstehung von Leberzellkarzinomen beitragen könnte, wobei die Datenlage hier nicht eindeutig ist (Girard et al., 2008; Niepmann 2009a).

### 4.3 Einfluss der leberspezifischen microRNA-122 auf die Translation der HCV-RNA

Vorangehende Untersuchungen des Einflusses der leberspezifischen microRNA-122 auf die Translation der HCV-RNA mittels des in Kapitel 3 beschriebenen HCV-Reporter-Systems zeigten, dass die miR-122 die Translation der HCV-RNA stimuliert. Studien in der humanen Hepatoma-Zelllinie Huh7 zeigten, dass ein Abfangen der endogenen miR-122 durch Kotransfektion von 2'-O-methylierten antisense-Oligonukleotiden zu einer Repression der Reporter-Expression führt, während eine zusätzliche Zugabe synthetischer miR-122 die Translationseffizienz der HCV-Reporter-RNAs in Huh7-Zellen steigert. Des Weiteren konnte auch durch Kotransfektion synthetischer miR-122 in HeLa-Zellen, die keine miR-122 exprimieren, eine Stimulation der Translation der HCV-Reporter-RNA detektiert werden.

Dieses Ergebnis steht in Kontrast zu der allgemeinen Annahme, dass microRNAs einen inhibierenden Effekt auf die Translation zellulärer mRNAs haben und ist mit zwei anderen Studien (Vasudevan et al., 2007; Orom et al., 2008) einer der ersten Befunde über eine positive Regulation der Translation durch microRNAs.



**Abbildung 10: Die NTRs der HCV-RNA enthalten drei potentielle Ziel-Sequenzen der microRNA-122.** Das HCV-RNA-Genom mit drei potentiellen Ziel-Sequenzen (markiert durch graue Kästen und Zahlen) für die microRNA-122 (miR-122) in den nicht-translatierten Regionen (NTRs). Die Bindung der miR-122 mit der „seed“-Region ist für die erste Zielsequenz exemplarisch dargestellt.

Sequenzanalysen zeigten, dass die HCV-RNA in den nicht-translatierten Regionen (NTRs) drei potentielle Ziel-Sequenzen für die miR-122 enthält. Zwei komplementäre Sequenzen zur „seed“-Region der miR-122 sind in der HCV-5'-NTR zwischen der Domäne I und II lokalisiert (Abb. 10). Die erste Sequenz (5'-ACACUCC-3') hat eine Länge von 7 Nukleotiden, die zweite (5'-CACUCC-3') ist 6 Nukleotide lang. Eine dritte potentielle Ziel-Sequenz (5'-ACACUCC-3') von 7 Nukleotiden befindet sich in der variablen Region (VR) der HCV-3'-NTR. Trotz der Lokalisierung der dritten Ziel-Sequenz in der „variablen“ Region ist diese, wie auch die Ziel-Sequenzen in der 5'-NTR, unter den HCV-Genotypen konserviert (siehe Anhang), was generell auf eine Funktion dieser Sequenzen im Vermehrungszyklus des HCV hinweist.

## 5 Ziel dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte der molekulare Mechanismus der Stimulation der HCV-Translation durch die leberspezifische microRNA-122 untersucht und charakterisiert werden.

Da die vorangehenden Untersuchungen ausschließlich mit HCV-Reporter-RNAs durchgeführt wurden, sollte zuerst die biologische Relevanz des stimulatorischen Effektes der miR-122 auf die HCV-Translation durch Versuche mit genomischer HCV-RNA bestätigt werden.

Des Weiteren wurde festgestellt, dass sowohl die HCV-5'-NTR als auch die HCV-3'-NTR, die beide an der Regulation der Translation der HCV-RNA beteiligt sind, komplementäre Sequenzen zur „seed“-Region der miR-122 enthalten. Im ersten Schritt zur Analyse des Mechanismus der Translationsstimulation durch miR-122 sollten daher die funktionellen Ziel-Sequenzen der miR-122 in der HCV-RNA identifiziert werden.

Für die repressorische Wirkung von microRNAs auf die Translation zellulärer mRNAs werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wobei sowohl eine Inhibition der Translationsinitiation als auch ein Einfluss auf die Elongation der Translation beschrieben wurde. Daher sollte im nächsten Schritt der Frage nachgegangen werden, in welchem Stadium der HCV-Translation die positive Regulation durch die miR-122 erfolgt.

Nach bisherigen Kenntnissen sind funktionelle microRNAs Bestandteile von Effektor-Komplexen (miRNP-Komplexen). Die Funktion der miRNAs innerhalb der miRNP-Komplexe ist die Identifizierung der Ziel-RNA durch Hybridisierung mit komplementären Sequenzen. Der Effekt auf die Translation wird nach bisherigem Verständnis im Wesentlichen durch die Protein-Komponenten der miRNP-Komplexe vermittelt. Zur Aufklärung des Mechanismus der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 sollte daher weiterhin untersucht werden, ob die alleinige Bindung der miR-122 an die HCV-RNA den positiven Effekt auf die virale Translation vermittelt, oder ob auch Proteine wie Ago2, ein Schlüssel-Protein der miRNP-Komplexe, an der Translationsstimulation beteiligt sind.

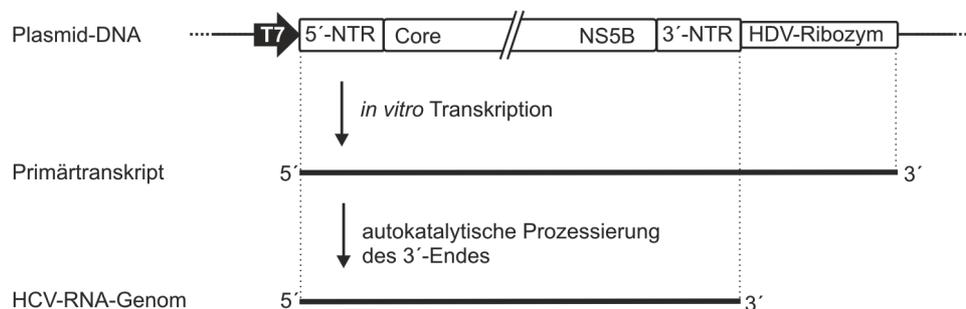
## II ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 1 Die biologische Relevanz der Stimulation der HCV-Translation durch die leberspezifische microRNA-122

Bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit wurde der stimulatorische Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation ausschließlich an HCV-Reporter-Konstrukten beobachtet und untersucht, die statt der Protein-kodierenden Sequenz von HCV eine Reporter-Sequenz enthalten (Henke, Goergen et al., 2008). Daher war es wichtig, die Relevanz des Effektes für die Translation des authentischen Virus-Genoms zu prüfen.

#### 1.1 miR-122 stimuliert die Translation des authentischen HCV-Genoms

Zur Bestätigung der biologischen Relevanz des microRNA-Effektes auf die HCV-Translation wurden Translationsstudien mit vollständigen HCV RNA-Genomen des Con1-Isolates des Genotyps 1 (Abb. 12A) in humanen Hepatoma-Zellen Huh7 durchgeführt. Die genomische HCV-RNA wurde mittels T7-Polymerase *in vitro* durch eine *run-off* Transkription hergestellt (Abb. 11). Als Matrize diente eine Plasmid-DNA (pHCVFL-12868), die einen T7-Promotor, die Sequenz des vollständigen HCV-Genoms und direkt anschließend die Sequenz für ein Ribozym des Hepatitis Delta Virus (HDV) enthält.

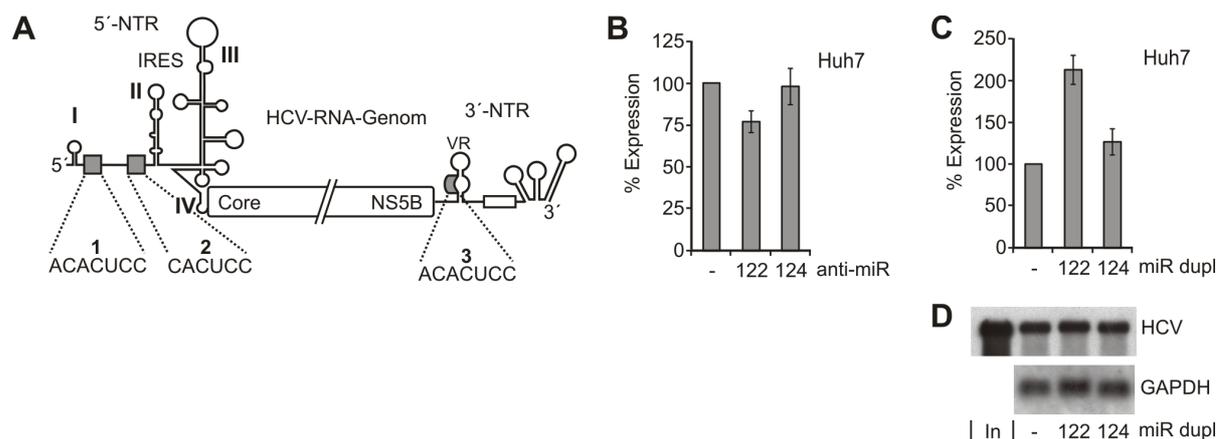


**Abbildung 11: Herstellung vollständiger genomischer HCV-RNA mit exakten Enden *in vitro*.** Als Matrize für die *in vitro* Transkription dient eine Plasmid-DNA, die einen T7-Promotor, die vollständige Sequenz des HCV-Genoms (5'-NTR, Core – NS5B, 3'-NTR) und die Sequenz für ein Ribozym des Hepatitis Delta Virus (HDV) enthält. Das Primärtranskript besteht aus der genomischen HCV-RNA mit einem HDV-Ribozym am 3'-Ende. Durch die Abspaltung des Ribozyms entsteht ein exaktes 3'-Ende der HCV-RNA.

Das Primärtranskript von dieser Matrize bestand folglich aus der genomischen HCV-RNA mit einem HDV-Ribozym am 3'-Ende. Durch die autokatalytische Aktivität des Ribozyms wurde dieses anschließend von der HCV-RNA abgespalten. Dadurch wurde ein vollständiges HCV-RNA-Genom mit exaktem 3'-Ende freigesetzt, welches essentiell für eine effiziente Translation ist (Song et al., 2006). Die Translationsstudien mit vollständigen RNA-Genomen wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe 3 durchgeführt. Nach Transfektion der genomischen HCV-RNA in Zellen wurde die Translationseffizienz durch Messung der Expression des Core-Proteins mittels eines speziellen Core-

ELISAs der Firma Abbott bestimmt. Die Messungen wurden von der Diagnostik-Abteilung des Instituts für medizinische Virologie Gießen (Dr. C.G. Schüttler) durchgeführt. Um Unterschiede der Messwerte durch Differenzen der Zelldichte, Zellviabilität oder Transfektionseffizienz auszugleichen, wurden die Werte durch Kotransfektion einer für die *Renilla*-Luziferase kodierenden Reporter-RNA (phRLnull, Promega) normalisiert.

In den ersten Experimenten wurde der Einfluss der endogen in Huh7-Zellen exprimierten miR-122 auf die Translation der HCV-RNA analysiert. Dazu wurden 2'-O-methylierte antisense-Oligoribonukleotide (anti-miR) kotransfiziert, die sequenzspezifisch an die microRNA binden und sie inaktivieren (siehe auch Jopling et al., 2005; Henke, Goergen et al., 2008). Abbildung 12B zeigt, dass ein Abfangen der endogenen miR-122 durch die anti-miR-122 die Expression des Core-Proteins und damit die Translation der viralen RNA reprimiert. Um zu zeigen, dass dieser Effekt spezifisch für die anti-miR-122 ist, wurde als Kontrolle eine anti-miR-124 verwendet, die gegen die gehirnspezifische, nicht in Huh7-Zellen exprimierte miR-124 gerichtet ist. Die anti-miR-124 zeigte keinen Effekt auf die HCV-Translation.



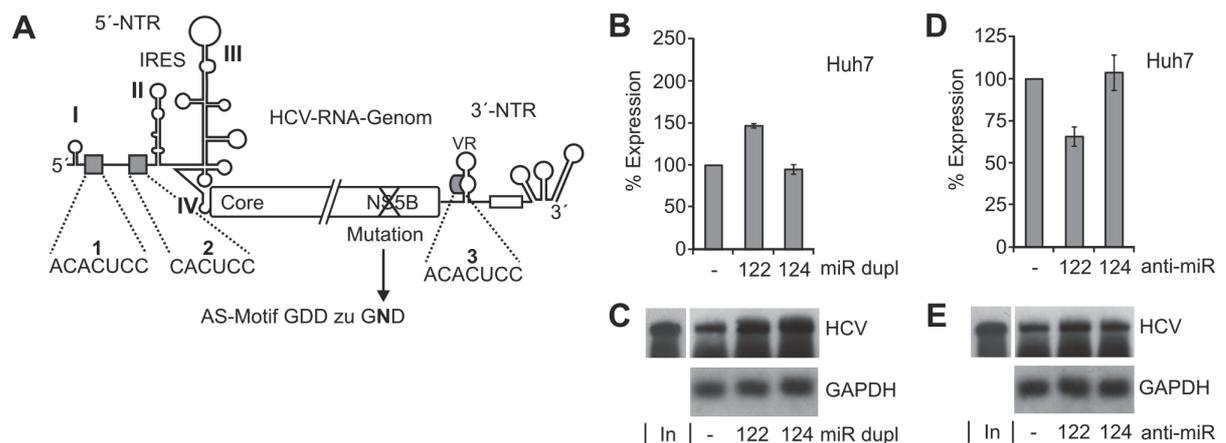
**Abbildung 12: miR-122 stimuliert die Translation des vollständigen HCV-Genoms.** (A) Das HCV-RNA-Genom mit drei potentiellen Bindestellen für miR-122 (graue Kästen) in den nicht-translatierten Regionen (NTRs); IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; VR, variable Region. (B) Expression des Core-Proteins in % 6 h nach Transfektion der HCV-RNA in Huh7-Zellen in An- oder Abwesenheit von 2'-O-methylierten antisense-Oligoribonukleotiden (anti-miR) gegen miR-122 oder miR-124; n=4. Die Messwerte wurden durch Kotransfektion von einer Reporter-RNA kodierend für *Renilla*-Luziferase normalisiert. Messwerte ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt. (C) Wie (B), nur in An- oder Abwesenheit von micro-RNA-Duplexen (miR dupl) der miR-122 oder miR-124; n=4. (D) Kontrolle der RNA-Stabilität durch Northern Blot mit einer DIG-markierten antisense-Sonde gegen die NS5B-kodierende Region der HCV-RNA (HCV) und gegen die interne Auftragskontrolle Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

In weiteren Experimenten wurde getestet, ob die zusätzliche Zugabe von miR-122 die Translation der HCV-RNA in Huh7-Zellen stimulieren kann. Dazu wurden synthetische micro-RNA-Duplexe (miR dupl), welche doppelsträngige Vorläufer der reifen microRNA darstellen und in Zellen für den Einbau in microRNA-Effektor-Komplexe verwendet werden, kotransfiziert (Sequenzen siehe Anhang). Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass die Transfektion von miR-122dupl die Translationseffizienz des HCV-Genoms auf mehr als 200 % erhöht, während die Zugabe der

gehirnspezifischen miR-124dupl keinen wesentlichen Einfluss hat (Abb. 12C, siehe auch Henke, Goergen et al., 2008). Ein anschließender Nachweis der HCV-RNA nach Reextraktion aus den transfizierten Huh7-Zellen durch Northern Blot zeigte, dass die beobachteten Effekte nicht durch Degradation der HCV-RNA sondern durch den Einfluss der miR-122 auf die Translation des viralen Genoms zustande kommen (Abb. 12D). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die leberspezifische miR-122 die Protein-Expression des authentischen HCV-Genoms fördert.

## 1.2 Die Translationsstimulation durch miR-122 ist unabhängig von der Replikation des HCV-Genoms

2005 beobachteten Jopling et al., dass eine Inaktivierung der miR-122 in Huh7-Zellen durch 2'-O-methylierte antisense-Oligoribonukleotide die Anreicherung von replikations-kompetenter HCV-RNA in den Zellen verhindert. Sie kamen zu dem Schluss, dass die microRNA-122 die Replikation des Virus-Genoms stimuliert. Verminderte HCV-Protein-Expression bei Inaktivierung der miR-122 wurde hier durch verminderte Produktion translations-kompetenter HCV-Genome erklärt.



**Abbildung 13: Die Translationsstimulation durch miR-122 ist unabhängig von der Replikation des HCV-Genoms.** (A) Replikations-defizientes HCV-RNA-Genom mit Mutation in der NS5B-kodierenden Region und potentiellen miR-122 Bindestellen in den NTRs. (B) Expression des Core-Proteins in % 6 h nach Transfektion der HCV-RNA in Huh7-Zellen in An- oder Abwesenheit von microRNA-Duplexen (miR dupl) der miR-122 oder miR-124; n=3. Die Messwerte wurden durch Kotransfektion von einer Reporter-RNA kodierend für *Renilla*-Luziferase normalisiert. Messwerte ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt. (C) Kontrolle der RNA-Stabilität für (B) durch Northern Blot mit einer DIG-markierten antisense-Sonde gegen die NS5B-kodierende Region der HCV-RNA (HCV) und gegen die interne Auftragskontrolle Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). (D) Wie (B), nur in An- oder Abwesenheit von 2'-O-methylierten antisense-Oligoribonukleotiden (anti-miR) gegen miR-122 oder miR-124; n=4. (E) Kontrolle der RNA-Stabilität für (D) wie in (C).

Um klar zu zeigen, dass die in den obigen Experimenten beschriebene Veränderung der Core-Protein-Expression unabhängig von der Replikation der HCV-RNA auf einen Einfluss der miR-122 auf die Translation des HCV-Genoms zurückzuführen sind, wurden entsprechende Versuche mit replikations-defizienter HCV-RNA durchgeführt. Wie in Abbildung 13A dargestellt enthält die dazu verwendete genomische HCV-RNA eine Mutation in der für die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B

kodierenden Sequenz. Die Mutation liegt in der für das für Polymerasen charakteristische Aminosäure-Motif GDD kodierenden Sequenz (Aminosäuren 317 - 319), welches die Nukleotid-Bindung vermittelt (Poch et al., 1989). Die in der HCV-RNA eingefügte Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch der ersten Asparaginsäure (D) des Motifs zu Asparagin (N). Das resultierende Motif GND führt zu Verlust der Polymerase-Aktivität des Enzyms und damit zu Verlust der Replikationsfähigkeit der viralen RNA (Lohmann et al., 1997).

Die Ergebnisse der Experimente mit replikations-defizienter genomischer HCV-RNA zeigen, dass die Expression des Core-Proteins durch Kotransfektion von miR-122-Duplexen in Huh7 Zellen gesteigert werden kann (Abb. 13B). Des Weiteren führt eine Sequestrierung der miR-122 mit anti-miR-122 zu einer Repression der Core-Expression. Die miR-124-Duplexe sowie die entsprechende anti-miR zeigen wie in vorigen Experimenten keinen Effekt (Abb. 13B,D). Northern Blot-Analysen (Abb. 13C,E) bestätigen, dass die beobachteten Effekte nicht durch Degradation der transfizierten HCV-RNA hervorgerufen wurden. Folglich ist die durch miR-122 gesteigerte Expression des Core-Proteins unabhängig von der Replikation des viralen Genoms und resultiert aus einer Stimulation der Translationseffizienz der HCV-RNA.

### 1.3 Diskussion

Die Ergebnisse der Experimente mit genomischer HCV-RNA zeigten, dass die miR-122 unabhängig von der Replikation der HCV-RNA die Translation des Virus-Genoms stimuliert. Ein zusätzlicher Einfluss der miR-122 auf die Replikation der viralen RNA (Jopling et al., 2005) wurde hier nicht weiter untersucht und kann daher nicht ausgeschlossen werden. Die Regionen der HCV-NTRs, die die potentiell funktionellen Zielsequenzen für die miR-122 enthalten, sind wichtig für die Regulation der Translation und Replikation (Friebe et al., 2001; Friebe & Bartenschlager, 2002; Bradrick et al., 2006; Song et al., 2006), so dass ein Einfluss der miR-122 auf die Effizienz beider Vorgänge durchaus denkbar wäre.

Bei einem Vergleich der Experimente mit dem vollständigen HCV-Genom und der HCV-Reporter-RNA (siehe auch Henke, Goergen et al. 2008) fällt auf, dass der Effekt der miR-122 auf die Translation des kompletten HCV-Genoms sowohl bei der Sequestrierung der miR-122 als auch bei Zugabe der miR-122 schwächer ist als bei Verwendung der kürzeren Reporter-RNAs. Dies kann möglicherweise durch eine verringerte Transfektionseffizienz aufgrund der Kotransfektion einer wesentlich längeren HCV-RNA mit miR-Duplexen und anti-miR verursacht werden.

Des Weiteren wurde bei der Analyse der vollständigen Sequenz des HCV-Genoms auf potentielle Ziel-Sequenzen der miR-122 mittels des Programms RNA22 (Miranda et al., 2006) festgestellt, dass nicht nur die NTRs der HCV-RNA potentielle Interaktions-Sequenzen für die miR-122 enthalten. Auch in der Protein-kodierenden Region des HCV-Genoms befinden sich einige zur miR-122 komplementäre Sequenzabschnitte (siehe Anhang). Nach dem bisherigen Kenntnisstand wird die Regulation der Translation durch microRNAs in tierischen Zellen im Allgemeinen durch Interaktion

der microRNA mit der 3'-NTR der mRNA vermittelt (Eulalio et al., 2008; Filipowicz et al., 2008). Nur vereinzelte Studien beschreiben einen Effekt von microRNAs auf die Translation durch Bindung der microRNA an Protein-kodierende Sequenzen der mRNA (Forman et al., 2008; Tay et al., 2008). Gu et al. (2009) zeigten, dass dies eine verstärkte Interaktion der microRNA mit der Ziel-mRNA erfordert, da translatierende Ribosomen die Bindung und Wirkung von microRNAs im Protein-kodierenden Bereich stören.

Da die Translation einer HCV-Reporter-RNA, die von den HCV-Sequenzen nur die 5'-NTR, einen Abschnitt der Core-kodierenden Sequenz und die 3'-NTR enthält, von der miR-122 stimuliert wird, kann man annehmen, dass die potentiellen Ziel-Sequenzen der miR-122 im offenen Leserahmen des HCV-Genoms für den stimulatorischen Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation nicht relevant sind. Außerdem sind die zur miR-122 komplementären Sequenzen im Protein-kodierenden Bereich, im Gegensatz zu denen in den HCV-NTRs, zwischen den HCV-Genotypen nicht konserviert (siehe Anhang), was weiterhin auch gegen eine generelle Funktionalität spricht.

Denkbar wäre aber, dass die miR-122 mit den zusätzlichen Bindestellen im HCV-Genom interagiert und abgefangen wird, so dass sie nicht mehr für die Interaktion mit den funktionellen Ziel-Sequenzen in den HCV-NTRs zur Verfügung steht. Dies würde den verminderten Effekt der miR-122 auf das vollständige HCV-Genom im Gegensatz zur HCV-Reporter-RNA erklären. Um diese Annahme zu prüfen, müssten Mutagenesestudien der einzelnen potentiellen miR-122-Bindestellen in der Protein-kodierenden Region des HCV-Genoms durchgeführt werden. Aufgrund der Anzahl der möglichen Bindestellen der miR-122, und da es an einigen Stellen nicht möglich ist stille Mutationen einzufügen, die eine unveränderte Aminosäuresequenz des translatierten Polyproteins gewährleisten, wurde dieser Ansatz experimentell nicht weiter verfolgt. Vielmehr lag der Fokus auf der Identifizierung der funktionellen Ziel-Sequenzen der miR-122 in den HCV-NTRs und der Analyse des Mechanismus der Translationstimulation.

#### **1.4 Fazit**

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Core-Proteins eines authentischen HCV RNA-Genoms in miR-122 exprimierenden humanen Hepatoma-Zellen Huh7 durch Sequestrierung der miR-122 reprimiert und durch Zugabe synthetischer miR-122 gesteigert werden kann. Weiterhin zeigten die Transfektionen mit einem replikations-defizienten HCV-Genom, dass die miR-122 unabhängig von einem Einfluss auf die Replikation des Virus-Genoms die Translationseffizienz der HCV-RNA stimuliert. Damit wurde die biologische Relevanz der HCV-Translationsstimulation durch die leberspezifische miR-122 bestätigt.

## **2 microRNA-122 stimuliert die HCV-Translation in einem nicht-hepatozellulären *in vitro* Translationssystem**

Neben Experimenten zur Identifizierung der funktionellen miR-122 Zielsequenzen in den HCV-NTRs wurde nach einem geeigneten zellulären Translationssystem gesucht, um den molekularen Mechanismus des stimulatorischen Effektes der miR-122 auf die HCV-Translation aufzuklären.

In dem Translationssystem sollte eine effiziente HCV-IRES vermittelte Translation stattfinden. Des Weiteren sollte dieses System möglichst keine endogene miR-122 enthalten, um eine kontrollierte Untersuchung des miR-Effektes durch Zugabe der miR-122 zu ermöglichen. Zusätzlich sollte ein vielfältiger Einsatz von Methoden zur Analyse der Translation möglich sein. Für einige mechanistische Studien wie z.B. die Auftrennung von Translationskomplexen in Sucrose-Gradienten ist eine Transfektion von Zellen aufgrund der schwankenden und oft geringen Transfektionseffizienz, unterschiedlicher Zellzyklusprogression und ungleicher Viabilität der Zellen nicht gut geeignet. Daher wurde die Untersuchung des Mechanismus der Translationsstimulation durch miR-122 in einem zellfreien System wie translations-kompetentem Zellextrakt bevorzugt. Voraussetzung für die Verwendung eines solchen *in vitro* Systems waren dabei weiterhin die Übereinstimmung und Vergleichbarkeit des Effektes der miR-122 auf die HCV-Translation mit den bisherigen Kenntnissen aus Versuchen in Zellkultur.

In den folgenden Experimenten wurde daher die HCV-Translationsstimulation durch miR-122 in verschiedenen Zellextrakten untersucht und charakterisiert. Die Bestätigung der biologischen Relevanz der mit einer HCV-Reporter-RNA beobachteten Effekte erlaubte dabei die weitere Verwendung des in der Einleitung beschriebenen Reporter-Systems (siehe auch Kapitel I.3).

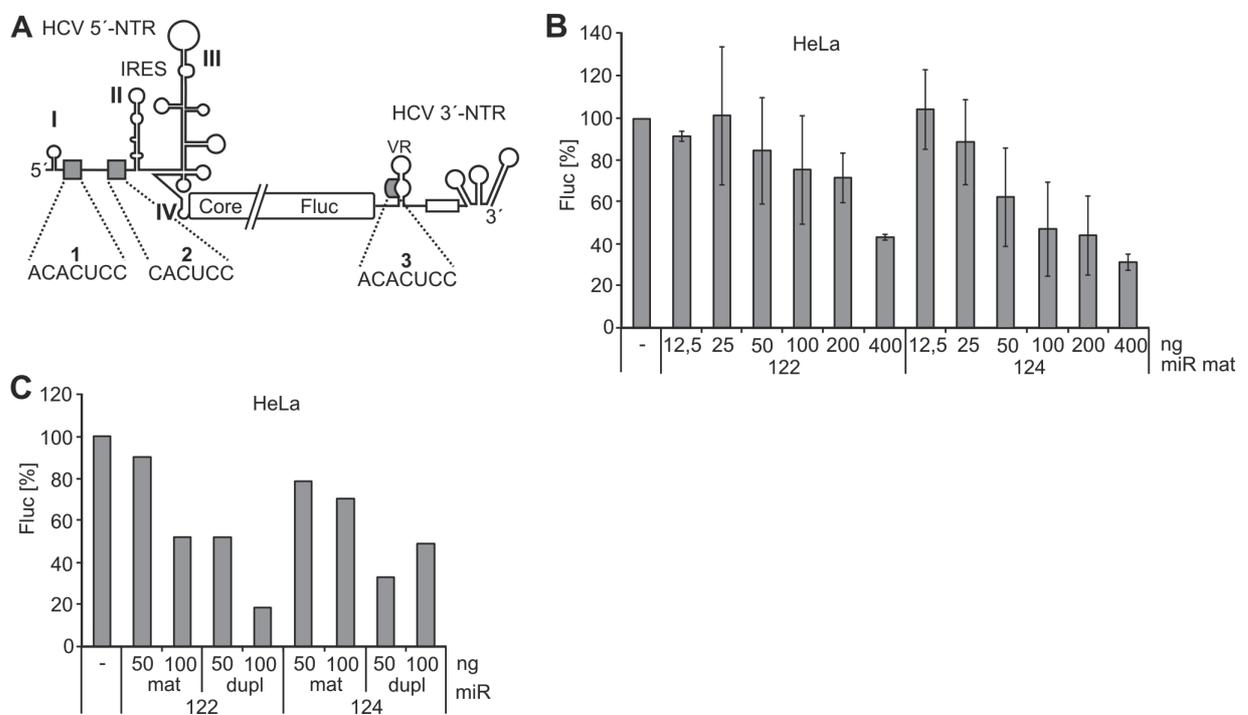
### **2.1 Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation in HeLa-Extrakt**

Neben dem stimulierenden Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation in Huh7-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Kotransfektion von miR-122-Duplexen auch in der nicht-hepatozellulären Zelllinie HeLa, die keine miR-122 exprimiert, die Translation der HCV-Reporter-RNA steigert (Henke, Goergen et al., 2008). Da es bis dahin nicht möglich war translationskompetenten Extrakt aus Huh7-Zellen herzustellen und ein System ohne endogene miR-122 bevorzugt wurde, wurde im Folgenden zunächst ein zytoplasmatischer Extrakt aus HeLa-Zellen (Thoma et al., 2004) auf den microRNA-Effekt getestet. Dieser Extrakt wurde freundlicherweise von Berthold Kastner (Göttingen) zur Verfügung gestellt.

In anderen Studien von microRNA-Effekten in *in vitro* Translationssystemen wurde beschrieben, dass die für Transfektionen in Zellen verwendeten microRNA-Duplexe, welche doppelsträngige Vorläufer der reifen microRNA sind, durch bloße Zugabe zu *in vitro* Translationsreaktionen keinen Effekt zeigen (Wang et al., 2006). Es wird vermutet, dass in Zellextrakten ein Faktor fehlt oder inaktiv vorliegt, der die Entwindung der miR-Duplexe in einzelsträngige reife microRNAs katalysiert. Daher

wurden in den folgenden Experimenten sowohl microRNA-Duplexe (miR dupl) als auch reife einzelsträngige microRNAs (miR mat) verwendet.

Zur Analyse des Einflusses der miR-122 auf die HCV-Translation in HeLa-Extrakt wurde die HCV-Reporter-RNA zunächst in An- oder Abwesenheit steigender Mengen einzelsträngiger microRNA (miR mat) *in vitro* translatiert. Die Bestimmung der Translationseffizienz der HCV-Reporter-RNA erfolgte durch anschließende Messung der Substratumsetzung des gebildeten Reporter-Proteins *Firefly*-Luziferase (Fluc). Abbildung 14B zeigt, dass die miR-122mat in diesem Zellextrakt keinen stimulierenden Einfluss auf die HCV-Translation hat, sondern diese dosisabhängig reprimiert. Dieser inhibierende Effekt konnte auch mit steigenden Mengen der Kontroll-miR-124mat beobachtet werden (Abb. 14B). Die Abnahme der Translationseffizienz unabhängig von der Sequenz der microRNA deutete auf einen generellen inhibierenden Effekt der RNA-Oligonukleotide auf die Translation in diesem System hin.



**Abbildung 14: Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation in HeLa-Extrakt.** (A) HCV-Reporter-RNA mit HCV-5'-NTR, Teil der Core-Sequenz, Ubiquitin-Sequenz (nicht dargestellt), *Firefly*-Luziferase-Sequenz (Fluc) und HCV-3'-NTR. Potentielle Bindestellen der miR-122 sind durch graue Kästen dargestellt. (B) Aktivität der *Firefly*-Luziferase in % nach *in vitro* Translation der HCV-Reporter-RNA in HeLa-Extrakt in An- oder Abwesenheit steigender Mengen einzelsträngiger microRNA (miR mat) 122 und 124. Die Messwerte der Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt; n=4 (davon zwei durchgeführt von Christiane Jünemann). (C) Aktivität der *Firefly*-Luziferase nach *in vitro* Translation der HCV-Reporter-RNA in HeLa-Extrakt in An- oder Abwesenheit verschiedener Mengen von Einzelsträngen (miR mat) oder Duplexen (miR dupl) der miR-122 oder miR-124. Die Messwerte der Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt.

Um zu prüfen, ob in diesem Zellextrakt möglicherweise wie in intakten Zellen microRNA-Duplexe für eine Stimulation der HCV-RNA benötigt werden, wurde zusätzlich ein vergleichendes Experiment mit einzelsträngigen microRNAs und microRNA-Duplexen durchgeführt. Das Ergebnis in Abbildung 14C

zeigt, dass weder miR-122mat noch miR-122dupl die HCV-Translation steigern sondern bei steigenden Konzentrationen inhibieren. Da dies auch bei Zugabe von miR-124mat und miR-124dupl der Fall ist, kann auch hier von einer allgemeinen Translationsrepression durch Zugabe von RNA-Oligonukleotiden ausgegangen werden.

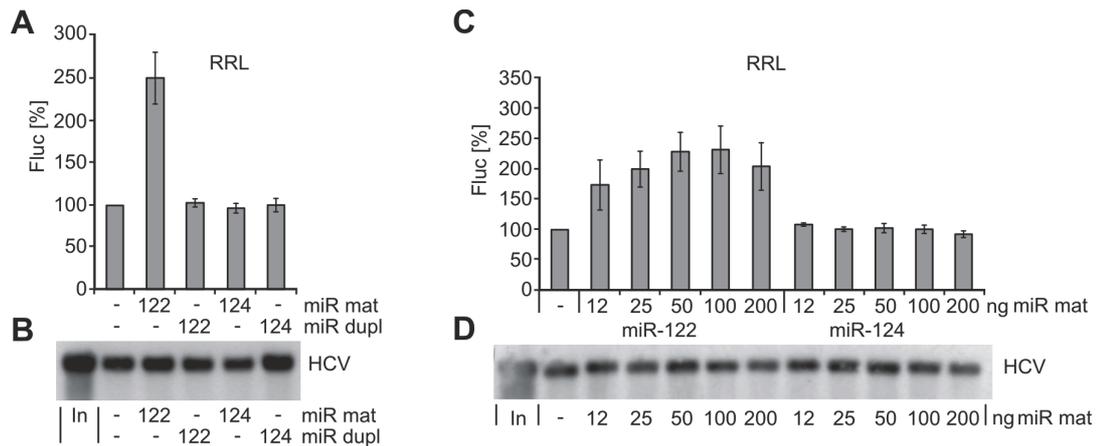
In zytoplasmatischem translationskompetentem HeLa-Extrakt konnte im Gegensatz zu Experimenten in HeLa-Zellen kein stimulierender Einfluss der miR-122 auf die HCV-Translation beobachtet werden.

## 2.2 miR-122 stimuliert die HCV-Translation in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat

Das Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (engl. *rabbit reticulocyte lysate*, RRL) der Firma Promega ist ein für viele Translationsstudien verwendetes *in vitro* System. Retikulozyten sind Vorläuferzellen der Erythrozyten, die nach Verlust des Zellkerns auf die Translation von Globinketten für die Bildung von Hämoglobin spezialisiert sind. Sie enthalten keine microRNA-122 (Henke, Goergen et al., 2008). Lysate dieser Zellen stellen aufgrund der Anreicherung von Ribosomen und Translationsfaktoren ein kompetentes und höchst effizientes *in vitro* Translationssystem dar (Pelham & Jackson, 1976). Das Retikulozyten-Lysat wird weiterhin vom Hersteller mit Nuklease behandelt, so dass nur noch geringfügig translationsfähige zelluläre mRNAs enthalten sind. Dies ermöglicht eine bevorzugte und effiziente Translation der zu untersuchenden zugesetzten RNA (Jackson & Hunt, 1983).

In vorangehenden Studien diente das Kaninchen-Retikulozyten-Lysat der Identifizierung und Aufreinigung der eukaryotischen Translationsfaktoren und hatte große Bedeutung bei der Aufklärung des allgemeinen Mechanismus der Cap-Nukleotid-abhängigen Translation (Schreier et al., 1977; Trachsel et al., 1977; Benne et al., 1979; Peterson et al., 1979a/b; Merrick, 2007). Weiterhin wurde dieses Lysat für die Untersuchung der Eigenschaften der IRES-abhängigen Translation verwendet (Pestova et al., 1998b, Paulous et al., 2003; Poyry et al., 2004). In weiteren Studien wurden verschiedene Zellextrakte sowie das Retikulozyten-Lysat als geeignetes *in vitro* System zur Aufklärung der Wirkungsweise von microRNAs auf zelluläre mRNAs beschrieben (Wang et al., 2006; Standart & Jackson, 2007). Dies stellte eine gute Voraussetzung für eine Untersuchung der Translationsstimulation von HCV durch miR-122 in diesem Lysat dar.

Zuerst wurde geprüft, ob die miR-122 die Translation der HCV-RNA in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (RRL) stimuliert (siehe auch Henke, Goergen et al., 2008). *In vitro* Translationen mit der HCV-Reporter-RNA in An- oder Abwesenheit der microRNA zeigten, dass wie in der Literatur beschrieben die Zugabe von miR-122-Duplexen keine Veränderung des Expressionslevels der *Firefly*-Luziferase hervorruft (Abb. 15A). Durch Zugabe von einzelsträngiger, reifer microRNA-122 (miR-122mat) konnte jedoch eine starke Steigerung der Translationseffizienz der HCV-Reporter-RNA auf etwa 250 % beobachtet werden (Abb. 15A). Durch Zugabe von miR-124 Einzelsträngen oder Duplexen wurde keine Veränderung der Luziferase-Aktivität im Vergleich zu Reaktionen ohne microRNA gemessen, was die Spezifität des stimulierenden Effektes für die miR-122mat in RRL bestätigt.



**Abbildung 15: miR-122 stimuliert die HCV-Translation in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (RRL).** (A) Aktivität der *Firefly*-Luziferase (Fluc) in % nach *in vitro* Translation der HCV-Reporter-RNA in RRL in An- oder Abwesenheit von Einzelsträngen (miR mat) oder Duplexen (miR dupl) der miR-122 oder miR-124. Die Messwerte der Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt; n=7. (B) Kontrolle der RNA-Stabilität für (A) durch Northern Blot mit einer DIG-markierten antisense-Sonde gegen einen Teil der Luziferase-Sequenz in der HCV-Reporter-RNA (HCV) und gegen die interne Auftragskontrolle Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), In, Input. (C) Aktivität der *Firefly*-Luziferase nach *in vitro* Translation der HCV-Reporter-RNA in RRL in An- oder Abwesenheit steigender Mengen miR-122mat oder miR-124mat. Die Messwerte der Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt; n=4. (D) Kontrolle der RNA-Stabilität für (C) wie in (B).

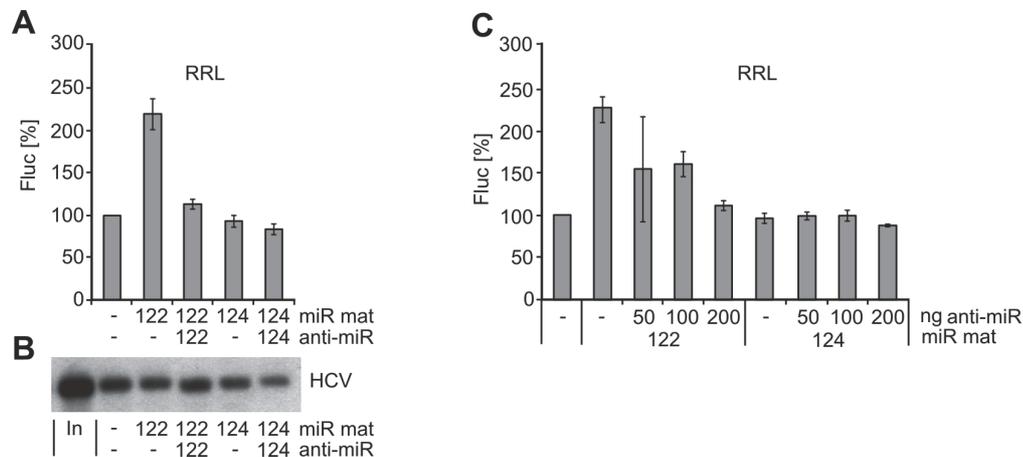
Obwohl das für diese Versuche verwendete Retikulozyten-Lysat laut Hersteller keine RNase-Aktivität zeigt, wurde die Stabilität der translatierten HCV-Reporter-RNA mittels Northern Blot geprüft. Abbildung 15B zeigt, dass die unterschiedlichen Translationseffizienzen in den *in vitro* Translationsreaktionen nicht durch Einsatz unterschiedlicher Mengen oder Degradation der HCV-Reporter-RNA zustande kommen. Die Versuche zeigten, dass die miR-122mat die HCV-Translation in dem *in vitro* Translationssystem RRL stimuliert.

In weiteren Experimenten wurde das Potential der Translationsstimulation durch Zugabe der miR-122mat in diesem System getestet. Dazu wurden Translationsreaktionen mit steigenden Mengen microRNA durchgeführt. Abbildung 15C zeigt, dass die miR-122mat die HCV-Translation in RRL dosisabhängig stimuliert, während die Kontroll-miR-124 keinen Effekt hat. Die maximale Translationsstimulation durch miR-122 auf etwa 250 % kann bei einem Einsatz von 200 ng Reporter-RNA und 50-100 ng einzelsträngiger microRNA erreicht werden. Folglich wurden diese Konzentrationen als Standard für weitere Experimente verwendet. Auch für diese Experimente wurden Northern Blots durchgeführt, die keine Veränderung der RNA-Stabilität bei Zugabe steigender Mengen microRNA zeigten (Abb. 15D).

Vergleichbar mit Resultaten aus Zellkultur stimuliert die miR-122 die HCV-Translation in dem *in vitro* Translationssystem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat.

### 2.3 Sequestrierung der miR-122 inhibiert die Stimulation der HCV-Translation in RRL

Um die Vergleichbarkeit des microRNA-Effektes in Zellkultur und in RRL weiterhin zu prüfen, wurde die Wirkung der anti-miR-122 auf die Translationsstimulation durch miR-122mat untersucht.



**Abbildung 16: Sequestrierung der miR-122 inhibiert die Translationsstimulation in RRL.** (A) Aktivität der *Firefly*-Luziferase (Fluc) in % nach *in vitro* Translation der HCV-Reporter-RNA in RRL in An- oder Abwesenheit von Einzelsträngen (miR mat) und 2-O-methylierten antisense-Oligoribonukleotiden (anti-miR) der miR-122 oder miR-124; n=3. Die Messwerte der Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt. (B) Kontrolle der RNA-Stabilität für (A) durch Northern Blot mit einer DIG-markierten antisense-Sonde gegen einen Teil der Luziferase-Sequenz in der HCV-Reporter-RNA (HCV) und gegen die interne Auftragskontrolle Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). (C) Aktivität der *Firefly*-Luziferase (Fluc) nach *in vitro* Translation der HCV-Reporter-RNA in RRL in An- oder Abwesenheit von miR mat und steigenden Mengen anti-miR der miR-122 oder miR-124; n=2. Die Messwerte der Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt.

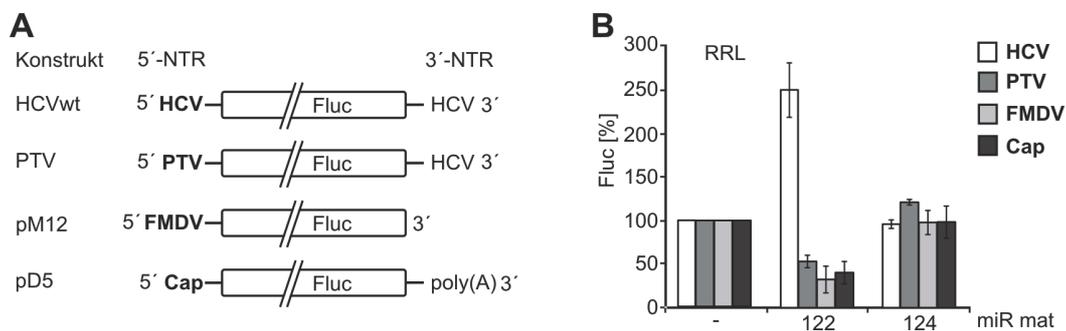
Die Ergebnisse zeigen, dass die miR-122mat wie in vorherigen Experimenten die Translationseffizienz der HCV-RNA auf etwa 225 % steigert (Abb. 16A). Ein Abfangen der miR-122mat durch zusätzliche Zugabe von anti-miR-122 dagegen verhindert die Translationsstimulation (siehe auch Henke, Goergen et al., 2008). Dass dieser Effekt nicht durch unspezifische Inhibition des Translationsapparates bei Zugabe weiterer RNA-Oligonukleotide hervorgerufen wurde, zeigen die gleich bleibenden Luziferase-Werte bei Zugabe der miR-124mat und anti-miR-124. Northern Blot-Analysen bestätigten zusätzlich, dass die anti-miR keinen Effekt auf die Stabilität der HCV-Reporter-RNA in RRL hat (Abb. 16B).

Weiterhin zeigte eine Titration der anti-miR (Abb. 16C), dass die Translationsstimulation durch miR-122 mit anti-miR-122 dosisabhängig reduziert werden kann. Die Reduktion des miR-Effektes ist bei einem Einsatz von 200 ng anti-miR-122 maximal, was für weitere Experimente als Standard verwendet wurde. Die Ergebnisse bestätigen erneut die Spezifität des Effektes für miR-122 in RRL und weisen auf eine Vergleichbarkeit des microRNA-Effektes in RRL und Zellkultur hin.

## 2.4 Die Stimulation durch miR-122 in RRL ist spezifisch für die IRES-vermittelte Translation der HCV-RNA

Vorangehende Experimente bestätigten, dass eine Translationsstimulation in RRL spezifisch durch die miR-122 vermittelt wird. Um zu zeigen, dass die miR-122 auch spezifisch auf die nicht-translatierten Elemente der HCV-RNA wirkt und keinen allgemeinen stimulatorischen Effekt auf die Translation in RRL hat wurden vergleichende Analysen mit Reporter-RNAs mit unterschiedlichen 5'- und 3'-Enden durchgeführt (Abb. 17A).

Die PTV-Reporter-RNA beinhaltet am 5'-Ende die Sequenz der internen Ribosomen-Eintrittsstelle des Porzinen Teschovirus (PTV), das der Familie *Picornaviridae* zugeordnet wird. Der Aufbau der PTV-IRES ähnelt jedoch stark dem der HCV-IRES, und es wird vermutet, dass auch der Ablauf der Translationsinitiation dem bei HCV entspricht (Belsham, 2009; Niepmann, 2009b; Bung, Bochkaeva et al., 2010). Des Weiteren hat die in der PTV-Reporter-RNA enthaltene HCV-3'-NTR wie bei der Translation vermittelt durch die HCV-IRES (Song et al., 2006) eine stimulierende Wirkung auf die PTV-Translation (Bung, Bochkaeva et al., 2010). Die FMDV-Reporter-RNA enthält am 5'-Ende das picornvirale IRES-Element des Maul- und Klauenseuche-Virus (engl. *foot and mouth disease virus*, FMDV) und endet mit der Sequenz des Reporters. Als weitere Referenz diente eine gecappte und polyadenylierte Reporter-RNA, vergleichbar mit einer zellulären mRNA (Abb 17A).



**Abbildung 17: Die Stimulation durch miR-122 in RRL ist spezifisch für die IRES-vermittelte Translation des HCV.** (A) Reporter-RNAs mit verschiedenen Sequenzen an den 5'- und 3'-Enden. HCV, HCV-5'-NTR oder HCV-3'-NTR; PTV, PTV-IRES; FMDV, FMDV-IRES; Cap, Cap-Nukleotid. (B) *Firefly*-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % nach *in vitro* Translation der verschiedenen Reporter-RNAs in RRL in An- oder Abwesenheit von miR-122mat oder miR-124mat. Die Luziferase-Werte der Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100% gesetzt.

*In vitro* Translationen der verschiedenen Reporter-RNAs in Anwesenheit von miR-122mat zeigten deutlich, dass ausschließlich die Translation der HCV-Reporter-RNA, die beide nicht-translatierten Regionen des HCV enthält, stimuliert wird (Abb. 17B). Die Translationseffizienz aller anderen Reporter-RNAs, unabhängig ob durch eine virale IRES oder ein Cap-Nukleotid initiiert, konnte nicht durch miR-122mat gesteigert werden. Auch konnte keine bestimmte Konstitution des 3'-Endes der Reporter RNAs einen stimulatorischen Effekt der miR-122 vermitteln. Sogar das Vorhandensein der HCV-3'-NTR am 3'-Ende der PTV-Reporter-RNA führte bei Zugabe der miR-122mat nicht zu einer Steigerung der Translationseffizienz. Dies lässt vermuten, dass die HCV-3'-NTR nicht an der

Stimulation der Translation durch miR-122 beteiligt ist. Auffällig war weiterhin, dass die Luziferase-Aktivität bei der Translation der Reporter-RNAs, die nicht beide HCV-NTRs enthalten, durch Zugabe von miR-122mat sogar um bis zu 60 % verringert war. Im Gegensatz dazu blieben die Luziferase-Werte bei Translation aller Reporter-RNAs in Anwesenheit von miR-124mat konstant. Dies deutet auf einen weiteren miR-122mat spezifischen Effekt auf die Translation der Reporter-RNAs ohne HCV 5'-NTR in RRL hin, der wie in Kapitel *Exkurs* beschrieben näher untersucht wurde. Es stellte sich heraus, dass dieser Effekt für die HCV-IRES-vermittelte Translation in RRL nicht relevant ist.

Die Resultate zeigen, dass ausschließlich die Translation der HCV-Reporter-RNA, die beide HCV-NTRs enthält, durch die miR-122 in RRL stimuliert wird, was die Spezifität der Stimulation für die HCV-Translation bestätigt und auf eine Interaktion der miR-122 mit den HCV nicht-translatierten Elementen hinweist.

## 2.5 Diskussion

Obwohl zuvor gezeigt wurde, dass die HCV-Translation in HeLa-Zellen, die keine miR-122 enthalten, durch Kotransfektion von miR-122 stimuliert werden kann (Henke, Goergen et al., 2008), konnte dieser Effekt in translations-kompetentem HeLa-Extrakt nicht reproduziert werden. Das HeLa-Zellextrakt eignet sich daher nicht für weitere Translationsstudien zur Analyse des stimulierenden Effektes der miR-122 auf die HCV-Translation.

Im Gegensatz dazu erfüllt das Kaninchen-Retikulozyten-Lysat die Voraussetzungen für eine detaillierte Untersuchung der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122. Dieses *in vitro* System ermöglicht, wie auch in anderen Studien bestätigt (Bergamini et al., 2000; Michel et al., 2001; Paulous et al., 2003), eine effiziente Translation der Reporter-RNA vermittelt durch die HCV-IRES. Außerdem enthält RRL keine miR-122 (Henke, Goergen et al., 2008), wodurch nicht beeinflussbare Effekte einer endogenen miR-122 auf die HCV-Translation wegfallen und eine präzise und kontrollierte Untersuchung des miR-Effektes ermöglicht wird. Weiterhin zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Translation der HCV-Reporter-RNA in RRL durch Zugabe reifer miR-122 vergleichbar mit Resultaten aus Zellkultur stimuliert wird.

In Übereinstimmung mit der Literatur hatte die Zugabe von microRNA-Duplexen keinen Effekt auf die HCV-Translation in RRL (Wang et al., 2006). Dies spricht dafür, dass in RRL wie in anderen Publikationen beschrieben ein noch unbekannter Faktor für die Entwindung des microRNA-Duplexes zu Einzelsträngen fehlt oder inaktiv vorliegt (Wang et al., 2006). In der Literatur wurde auch eine Notwendigkeit der Vorinkubation der reifen microRNA mit der Ziel-RNA beschrieben (Wang et al., 2006), was aber wahrscheinlich nicht die natürliche Bindung des microRNA-Effektor-Komplexes an die Ziel-RNA widerspiegelt und möglicherweise sogar den Einbau der microRNA in Effektor-Komplex stört. Im Gegensatz dazu war in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten die bloße Zugabe der microRNA zu den Translationsreaktionen ausreichend für die Detektion eines Effektes.

Dies ermöglicht theoretisch die korrekte Assoziation der miR-122 mit Komponenten des Effektor-Komplexes und anderen an der Translationsstimulation beteiligten Faktoren.

Die beobachtete Reduktion der Translationsstimulation durch Abfangen der miR-122mat mit 2'-O-methylierten anti-miR-122-Oligoribonukleotiden in RRL zeigt weiterhin die Spezifität des Effektes für die miR-122 und bekräftigt die Vergleichbarkeit mit den Beobachtungen in Zellkultur. Vergleichende Analysen des Einflusses der miR-122mat auf die Translation verschiedener Reporter RNAs ergaben, dass die miR-122 ausschließlich die Translation der HCV-Reporter-RNA stimuliert. Dies weist auf eine spezifische Interaktion der microRNA mit den nicht-translatierten Regionen der HCV-RNA hin und schließt eine allgemeine translationssteigernde Wirkung der miR-122mat in RRL aus. Aufgrund der Spezifität des Effektes der Translationsstimulation für die miR-122 und HCV-Reporter-RNA, der Übereinstimmung mit den Beobachtungen in Zellkultur und hohen Reproduzierbarkeit der Resultate wurde das Retikulozyten-Lysat als *in vitro* System für die weitere Untersuchung des Mechanismus des microRNA-Effektes verwendet.

## 2.6 Fazit

Der stimulatorische Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation konnte, im Gegensatz zu Daten aus Translationsexperimenten in HeLa-Zellen, in translationskompetentem zytoplasmatischen HeLa-Extrakt nicht reproduziert werden. Daher ist dieser Extrakt als *in vitro* Translationsystem für die weitere Untersuchung des miR-Effektes ungeeignet. Die Resultate der Translationsstudien in dem nicht-hepatozellulären *in vitro* Translationsystem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (RRL) hingegen zeigten, dass spezifisch die HCV-Translation durch Zugabe der miR-122 vergleichbar wie in Zellen gesteigert werden kann. Das Kaninchen-Retikulozyten-Lysat wurde daher als *in vitro* System zur weiteren Analyse des Mechanismus der Translationsstimulation von HCV durch miR-122 verwendet.

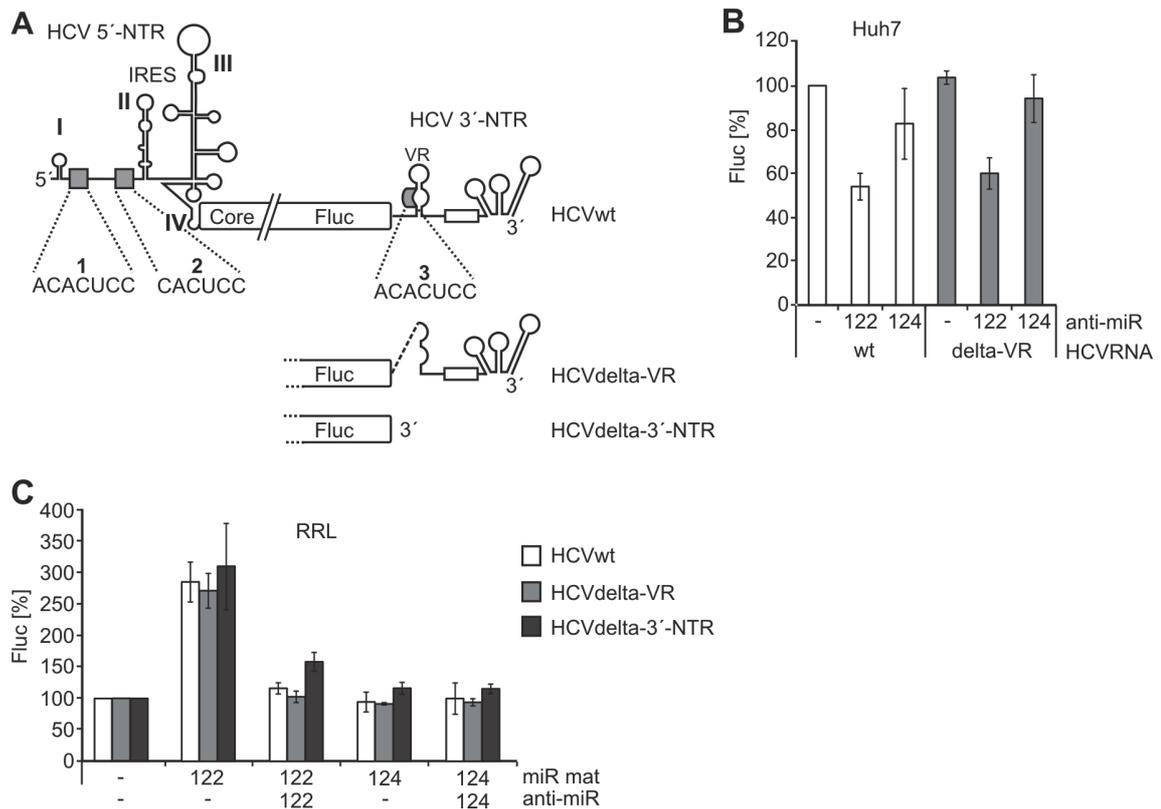
### 3 Identifizierung der funktionellen Ziel-Sequenzen der microRNA-122 in der HCV-RNA

Die nicht-translatierten Regionen der HCV-RNA enthalten wie in der Einleitung beschrieben cis-regulatorische Elemente der Translation und Replikation (zusammengefasst in Bartenschlager et al., 2004; Moradpour et al., 2007). Ebenso enthalten die HCV-NTRs drei potentielle Ziel-Sequenzen der miR-122 (siehe auch Abb. 18A). Zwei Sequenzen komplementär zur „seed“-Region der miR-122 liegen in der HCV-5'-NTR zwischen Domäne I und II. Die dritte potentielle Bindestelle befindet sich in der HCV-3'-NTR in einem Abschnitt, der als variable Region (VR) bezeichnet wird. Alle drei Ziel-Sequenzen sind zwischen den bekannten HCV-Genotypen konserviert (siehe Anhang) und haben daher hohes funktionelles Potential. In diesem Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, welche der potentiellen Ziel-Sequenzen die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 vermitteln.

#### 3.1 Die HCV-3'-NTR hat keinen Einfluss auf die Translationsstimulation durch miR-122

In früheren Untersuchungen zur Bedeutung der variablen Region der HCV-3'-NTR für die HCV-Translation wurde festgestellt, dass weniger die Sequenz als die Sekundärstruktur dieser Region eine Rolle bei der Translation der HCV-RNA in Huh7-Zellen spielt (Goergen, Diplomarbeit 2006). Mutationen im Bereich der Ziel-Sequenz der miR-122, die nicht zu einer veränderten Sekundärstruktur der RNA führten, hatten keinen wesentlichen Einfluss auf die Translationseffizienz der HCV-Reporter-RNA (Goergen, Diplomarbeit 2006). Dies deutet bereits darauf hin, dass die Stimulation der Translation nicht durch die Interaktion der miR-122 mit der HCV-3'-NTR vermittelt wird. Um dies zu bestätigen, wurde der Einfluss der miR-122 auf die Translation von HCV-RNAs ohne Ziel-Sequenz in der 3'-NTR untersucht.

In der dazu verwendeten HCV-Reporter-RNA HCVdelta-VR (Abb. 18A) wurde ein Teil der variablen Region, der die Ziel-Sequenz 5'-ACACUCC-3' der miR-122 enthält, deletiert (genaue Mutation siehe Anhang). Die HCVdelta-VR-RNA wurde anschließend parallel mit der Wildtyp-HCV-RNA (HCVwt) in Huh7-Zellen transfiziert. Wie in Abbildung 18B dargestellt, war die Translationseffizienz der RNA HCVdelta-VR vergleichbar mit der der HCVwt-RNA. Dies weist darauf hin, dass die deletierte Sequenz keine Funktion bei der HCV-Translation hat. Des Weiteren führte die Sequestrierung der miR-122 durch Koftransfektion von anti-miR-122 bei der HCVdelta-VR-RNA in gleichem Maße wie bei der HCVwt-RNA zu einer Repression der Translation von etwa 40 – 50 %. Die Koftransfektion der anti-miR124 hatte dagegen keinen wesentlichen Effekt auf die Translationseffizienz der HCV-RNAs. Die Deletion der potentiellen Ziel-Sequenz in der HCV-3'-NTR hat folglich keinen Einfluss auf die Wirkung der miR-122 auf die HCV-Translation in Huh7-Zellen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die zur „seed“-Region komplementäre Sequenz in der HCV-3'-NTR keine funktionelle Ziel-Sequenz der miR-122 ist.

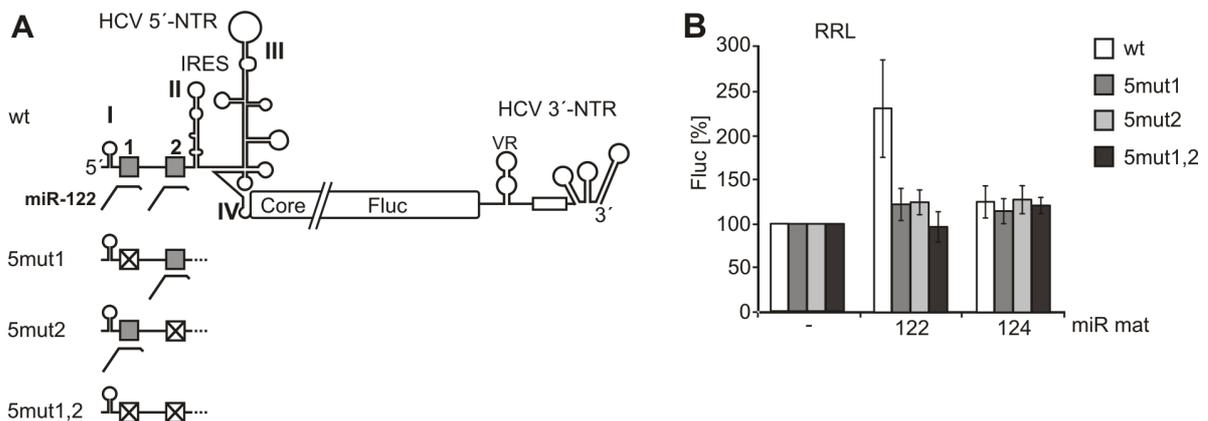


**Abbildung 18: Die HCV-3'-NTR hat keinen Einfluss auf die Translationsstimulation durch miR-122.** (A) HCV-Reporter-RNA mit Ziel-Sequenzen der miR-122 in den HCV-NTRs. 3'-Enden der HCV-Reporter-RNAs delta-VR mit Deletion der 3. Ziel-Sequenz der miR-122 und delta-3'-NTR ohne HCV-3'-NTR. (B) *Firefly*-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % 4 h nach Transfektion der HCV-Reporter-RNAs in Huh7-Zellen in An- oder Abwesenheit von 2'-O-methylierten antisense-Oligoribonukleotiden (anti-miR) gegen miR-122 oder miR-124. Die Messwerte wurden mittels Koftransfektion der Reporter-RNA kodierend für *Renilla*-Luziferase normalisiert; n=3. Die Translationseffizienz der Wildtyp-HCV-RNA ohne Zugabe von anti-miR wurde gleich 100 % gesetzt. (C) *Firefly*-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % nach Translation der HCV-Reporter-RNAs in RRL in An- oder Abwesenheit von einzelsträngiger microRNA miR-122mat oder miR-124mat und entsprechenden anti-miRs; n=3. Die Translationseffizienzen der HCV-RNAs ohne Zugabe von miR mat oder anti-miR wurden gleich 100 % gesetzt.

Dieses Resultat wurde durch Versuche in RRL bestätigt. Neben der mutierten HCVdelta-VR-RNA wurde hier zusätzlich die RNA HCVdelta-3'-NTR, bei der die komplette HCV-3'-NTR fehlt (Abb. 18A), auf den miR-Effekt geprüft. Die Ergebnisse in Abbildung 18C zeigen, dass eine Zugabe der miR-122mat zu den Translationsreaktionen die Translationseffizienz der mutierten und Wildtyp-HCV-Reporter-RNA gleichermaßen auf etwa 275 % steigert. Übereinstimmend kann die Stimulation der Translation durch zusätzliche Zugabe der anti-miR-122 bei allen RNAs fast vollständig aufgehoben werden. Die unveränderten Luziferase-Werte bei Zugabe von miR-124 und anti-miR-124 bei der Translation aller verwendeten RNAs schließen unspezifische Effekte aus. Dies zeigt, dass die HCV-3'-NTR und die enthaltene potentielle Bindestelle für die Wirkung der miR-122 auf die HCV-Translation in RRL wie in humanen Zellen nicht benötigt werden (siehe auch Henke, Goergen et al., 2008).

### 3.2 miR-122 stimuliert die HCV-Translation durch Interaktion mit der HCV-5'-NTR

Die vorangehenden Experimente deuteten darauf hin, dass die funktionelle Ziel-Sequenz der miR-122 in der HCV-5'-NTR liegt. Die miR-122 könnte dort theoretisch, wie in Abbildung 19A für die Wildtyp-HCV-Reporter-RNA schematisch dargestellt, an zwei zur „seed“-Region komplementäre Sequenzen binden. Um die Funktionalität der miR-Bindestellen in der HCV-5'-NTR zu bestätigen und die funktionelle Ziel-Sequenz zu definieren, wurden die potentiellen Bindestellen in der HCV-5'-NTR mutiert (Abb. 19A). In der resultierenden 5mut1-RNA wurde die erste Ziel-Sequenz von 5'-ACACUCC-3' zu 5'-CGCGGAA-3' mutiert, was eine Interaktion der miR-122 mit dieser Bindestelle verhindert. Es bleibt die Möglichkeit einer Interaktion der miR-122 mit der zweiten Ziel-Sequenz in der HCV-5'-NTR (Abb. 19A). In der RNA 5mut2 ist die Interaktion der miR-122 mit der zweiten Bindestelle durch Mutation der Sequenz 5'-CACUCC-3' zu 5'-GCGGAA-3' gestört. Hier kann nur eine Paarung mit der ersten Ziel-Sequenz stattfinden. Die 5mut1,2-RNA enthält Mutationen in beiden Ziel-Sequenzen, was theoretisch die Interaktion der miR-122 mit der 5'-NTR vollständig inhibiert.



**Abbildung 19: miR-122 stimuliert die HCV-Translation durch Interaktion mit der HCV-5'-NTR.** (A) Wildtyp-HCV-Reporter-RNA mit zwei potentiellen miR-Bindestellen in der HCV-5'-UTR (graue Kästen). Die Reporter-RNAs 5mut1, 5mut2 und 5mut1,2 mit Mutationen in den potentiellen Ziel-Sequenzen der miR-122 (weiße, gekreuzte Kästen). Mögliche Interaktionen der „seed“-Region der miR-122 mit der 5'-NTR sind schematisch dargestellt. (B) *Firefly*-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % nach Translation der HCV-Reporter-RNAs in RRL in An- oder Abwesenheit von miR-122mat oder miR-124mat; n=4. Die Translationseffizienzen der HCV-RNAs ohne Zugabe von miR mat wurden gleich 100 % gesetzt.

Anschließende Translationsstudien in RRL zeigten, dass die Translation von HCV-Reporter-RNAs mit einer Mutation in den miR-122-Bindestellen in der 5'-NTR im Gegensatz zur Wildtyp-HCV-RNA durch Zugabe von miR-122mat nicht gesteigert werden kann (Abb. 19B). Auffällig ist, dass schon die Mutation einer der beiden Sequenzen zu einem vollständigen Verlust der Stimulation durch miR-122mat führt. Dies bestätigt, dass die Stimulation der HCV-Translation durch Interaktion der miR-122 mit der HCV-5'-NTR vermittelt wird. Die Resultate zeigen zudem, dass beide Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR essentiell für die Wirkung der miR-122 auf die Translation der HCV-RNA sind.

### 3.3 Diskussion

Experimente zur Identifizierung der funktionellen Zielsequenzen der miR-122 in der HCV-RNA ergaben, dass die Stimulation der HCV-Translation in RRL wie in humanen Zellen durch Interaktion der miR-122 mit Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR vermittelt wird (siehe auch Henke, Goergen et al., 2008). Dies steht in Kontrast zu einer Vielzahl von Studien, die beschreiben, dass microRNAs die Translation zellulärer mRNAs durch Interaktion mit Ziel-Sequenzen in der 3'-NTR der mRNA regulieren (zusammengefasst in Eulalio et al., 2008; Filipowicz et al., 2008, Chekulaeva & Filipowicz 2009).

Die HCV-3'-NTR hat sowohl regulatorische Funktion bei der Replikation des HCV-Genoms (Kolykhalov et al., 2000; Friebe & Bartenschlager, 2002; Yi & Lemon, 2003a/b) als auch bei der Translation der viralen RNA (Bradrick et al., 2006; Song et al., 2006). Die HCV-3'-NTR mit einem exakten 3'-Ende steigert die Effizienz der HCV-Translation (Bradrick et al., 2006; Song et al., 2006). Speziell in Leberzelllinien wie Huh7 führt laut früheren Studien ein Fehlen der HCV-3'-NTR zu einem drastischen Verlust der Translationseffizienz von 80 - 90 % (Goergen, Diplomarbeit 2006; Song et al., 2006). Dagegen ist die translationsfördernde Wirkung der HCV-3'-NTR in RRL gering (Song et al., 2006). Es wurde angenommen, dass leberspezifische Faktoren an der translationsfördernden Wirkung der HCV-3'-NTR beteiligt sind. Da die potentielle Ziel-Sequenz der leberspezifischen miR-122 in der HCV-3'-NTR, trotzdem sie in der variablen Region der 3'-NTR lokalisiert ist, bei allen HCV-Genotypen konserviert vorliegt, konnte zunächst eine Beteiligung der miR-122 an der fördernden Wirkung der 3'-NTR auf die HCV-Translation vermutet werden.

Erste Hinweise auf eine Unabhängigkeit der beiden Effekte gaben jedoch schon die Resultate, dass die HCV-3'-NTR die HCV-Translation auch in der Leberzelllinie HepG2 fördert (Song et al., 2006), in der keine miR-122 nachgewiesen werden konnte (Jopling et al., 2005). Neuere Untersuchungen zeigten außerdem, dass auch in Zelllinien wie HeLa und HEK293, die nicht hepatozellulären Ursprungs sind, die Translationseffizienz der HCV-RNA durch Anwesenheit der 3'-NTR gesteigert wird (Bung, Bochkaeva et al., 2010). Diese Daten lassen eher auf einen Zelltyp-unabhängigen Effekt schließen. Des Weiteren wurde bei der Analyse der Bedeutung der variablen Region für die HCV-Translation festgestellt, dass Mutationen in der Ziel-Sequenz der miR-122, die nicht zu einer Veränderung der Sekundärstruktur führen, keinen wesentlichen Effekt auf die Translationseffizienz der HCV-Reporter-RNA in Huh7-Zellen haben (Goergen, Diplomarbeit 2006). Die Resultate aus Experimenten dieser Arbeit bestätigten, dass die Translationsförderung der HCV-3'-NTR und die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 nicht in Zusammenhang stehen. Weder die Deletion der potentiellen miR-122-Bindestelle in der variablen Region noch die Deletion der kompletten 3'-NTR hatten einen Einfluss auf den stimulatorischen Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation in Huh7-Zellen und in RRL (siehe auch Henke, Goergen et al., 2008). Die HCV-3'-NTR ist für die Translationsstimulation durch miR-122 folglich nicht relevant.

Dagegen zeigten die Translationsstudien in RRL wie auch in humanen Hepatoma-Zellen Huh7 (Henke, Goergen et al., 2008), dass die Stimulation der HCV-Translation durch die Interaktion der miR-122 mit Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR vermittelt wird. Übereinstimmend wurde auch in der Studie von Jopling et al. (2005), die eine Stimulation der Replikation der viralen RNA beschrieben, eine Interaktion der miR-122 mit der HCV-5'-NTR nachgewiesen.

Über die Regulation der Translation durch Interaktion von microRNAs mit der 5'-NTR ist bisher wenig bekannt. Außer dieser Studie gibt es bisher nur einen weiteren Bericht, der eine Stimulation der Translation durch direkte Interaktion einer microRNA mit der 5'-NTR einer mRNA beschreibt. Orom et al. (2008) zeigten, dass die miR-10a die Translation der für ribosomale Proteine kodierenden mRNA durch Bindung an die 5'-NTR fördert, wobei der Mechanismus der Translationsstimulation nicht genau untersucht wurde.

### **3.4 Fazit**

Durch Mutagenese der potentiellen miR-122 Bindestellen in den HCV nicht-translatierten Regionen und anschließenden Translationsstudien in Huh7-Zellen und RRL konnten die funktionellen Ziel-Sequenzen der miR-122 in der HCV-RNA identifiziert werden. Die Mutation der potentiellen Bindestelle in der HCV-3'-NTR sowie die Deletion der kompletten 3'-NTR hatte keinen Einfluss auf den stimulierenden Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation. Die HCV-3'-NTR ist also für die Translationsstimulation durch miR-122 nicht relevant. Mutationen in jeder der beiden Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR dagegen führten zu einem Verlust der Translationsstimulation. Beide Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR sind folglich *in vitro* in RRL wie in lebenden Zellen essentiell für die Vermittlung der fördernden Wirkung der miR-122 auf die HCV-Translation.

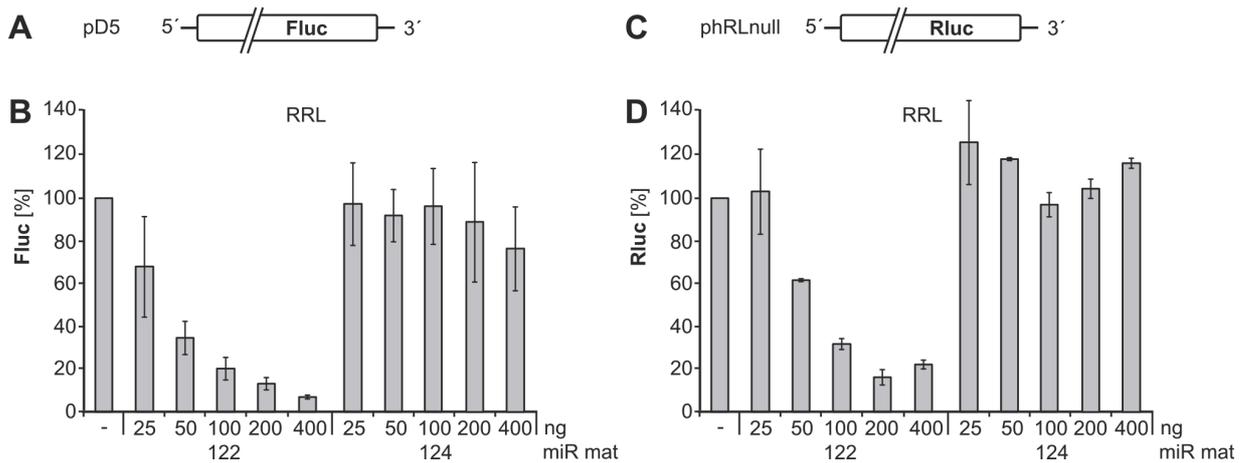
**Exkurs Einfluss der microRNA-122 auf die Reporter-Expression in RRL**

In Kapitel II.2.4 wurde die Spezifität der Translationsstimulation durch miR-122 für die HCV-Reporter-RNA in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (RRL) untersucht, um eine allgemeine stimulatorische Wirkung der miR-122 auf die Translation in diesem *in vitro* Translationssystem auszuschließen. Dabei wurde bestätigt, dass nur die Translation der Reporter-RNAs, die die HCV-IRES inklusive der miR-Bindestellen enthalten, durch die miR-122 stimuliert wird. Unerwartet war das Resultat, dass die gemessene Luziferase-Aktivität bei der Translation aller anderen verwendeten Reporter-RNAs bei Zugabe der miR-122 stark verringert war. Die Repression durch miR-122 erfolgte bei einer IRES-vermittelten Translationsinitiation durch die PTV- oder FMDV-IRES, die beide keine potentiellen Ziel-Sequenzen für die miR-122 enthalten, sowie bei einer durch ein Cap-Nukleotid initiierten Translation (siehe auch Kapitel II.2.4). Auch die unterschiedliche Konstitution 3'-Endes der Referenz-RNAs hatte keinen Einfluss auf den reprimierenden Effekt der miR-122. Bei der Translation von Reporter-RNAs, die mit der HCV-3'-NTR, einem Poly(A)-Schwanz oder der Luziferase-Sequenz selbst endeten, wurde in Anwesenheit von miR-122 übereinstimmend eine verringerte Luziferase-Aktivität gemessen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die miR-122 die in allen Reporter-RNAs enthaltene *Firefly*-Luziferase beeinflusst. Da dies möglicherweise auch Auswirkungen auf die Untersuchung des stimulatorischen Effektes der miR-122 auf die HCV-Translation mittels der HCV-Reporter-RNA haben könnte, wurde der Effekt im Folgenden näher analysiert.

**E1 miR-122 reprimiert die Expression der *Firefly*- und *Renilla*-Luziferase**

Vorangehende Experimente ließen vermuten, dass die miR-122 unabhängig von den cis-regulatorischen Elementen der Translation die Expression der *Firefly*-Luziferase in RRL reprimiert. Da in RRL auch eine Cap-unabhängige Translation von Reportern möglich ist (Svitkin et al., 1996) wurde diese Hypothese zunächst durch Translation von nicht gecappter und nicht polyadenylierter Reporter-RNA kodierend für die *Firefly*-Luziferase unter Zugabe von steigenden Mengen einzelsträngiger microRNA (miR mat) geprüft (Abb. 20A). Des Weiteren wurde das gleiche Experiment mit einer Reporter-RNA kodierend für die *Renilla*-Luziferase durchgeführt, um die Spezifität des beobachteten Effektes für die *Firefly*-Luziferase zu prüfen (Abb. 20C).

Die Resultate aus Translationsexperimenten mit *Firefly*-Luziferase-RNA zeigen eine dosisabhängige Verringerung der *Firefly*-Luziferase-Werte bei Zugabe steigender Mengen miR-122mat (Abb. 20B). Im Gegensatz dazu blieben die Messwerte bei Zugabe von miR-124mat konstant. Dies bestätigt die Hypothese, dass die Expression der *Firefly*-Luziferase unabhängig von den cis-regulatorischen Elementen der Translation durch miR-122 inhibiert wird.



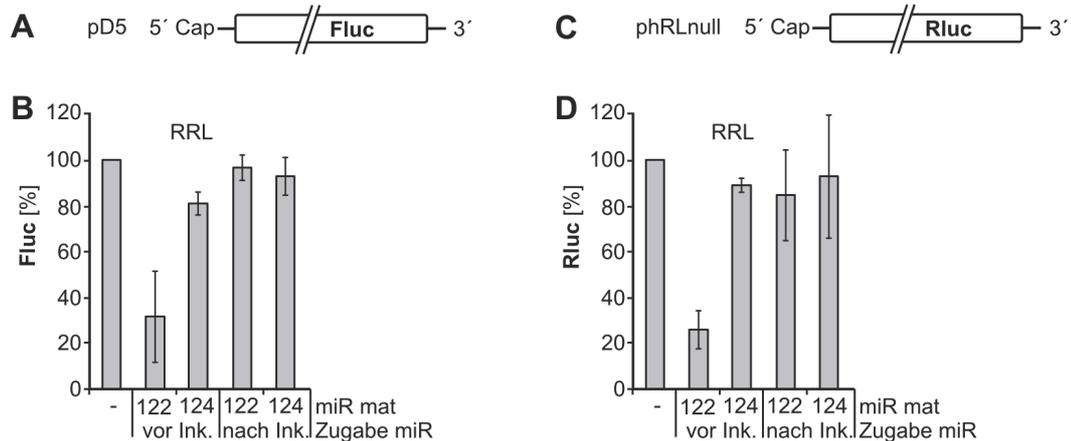
**Abbildung 20: microRNA-122 reprimiert in RRL die Expression der *Firefly*- und *Renilla*-Luziferase.** (A) Reporter-RNA pD5 kodierend für die *Firefly*-Luziferase (Fluc) verwendet in (B). (B) Fluc-Aktivität in % nach *in vitro* Translation der *Firefly*-Reporter-RNA pD5 in RRL in An- oder Abwesenheit steigender Mengen einzelsträngiger microRNA (miR mat) 122 oder 124; n=3. Die Messwerte aus Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt. (C) Reporter-RNA phRLnull kodierend für die *Renilla*-Luziferase (Rluc) verwendet in (D). (D) Wie (B), nur mit *Renilla*-Reporter-RNA phRLnull aus (C); n=2.

Die Experimente mit kodierenden RNAs für die *Renilla*-Luziferase zeigten, dass auch die Expression der *Renilla*-Luziferase durch steigende Mengen miR-122mat reprimiert wird (Abb. 20D), wobei die Zugabe der miR-124mat auch bei größeren Mengen keine wesentlichen Veränderungen der *Renilla*-Luziferase-Aktivität hervorruft. Die Ergebnisse zeigen, dass neben der *Firefly*-Luziferase auch die *Renilla*-Luziferase in RRL durch die miR-122 beeinflusst wird und deuten auf einen allgemeineren Effekt der miR-122 auf die Expression von Reporter-Proteinen wie Luziferasen hin.

## E2 miR-122 hat keinen Einfluss auf die Enzymaktivität der *Firefly*- und *Renilla*-Luziferase

Um auszuschließen, dass die miR-122 einen allgemeinen reprimierenden Effekt auf die Enzymaktivität der *Firefly*- und *Renilla*-Luziferase hat, wurden weitere *in vitro* Translationsreaktionen durchgeführt, bei denen die Zugabe der microRNA vor oder nach Inkubation der Translationsreaktion erfolgte.

Aus Abbildung 21B geht hervor, dass die Zugabe der miR-122mat vor der Translationsreaktion wie schon in vorigen Experimenten gezeigt zu einer Verringerung der Messwerte für die *Firefly*-Luziferase führt. Dagegen waren die Luziferase-Werte bei Zugabe der miR-122mat nach der Translationsreaktion mit einer kurzen Inkubationszeit bei Raumtemperatur vor der Messung vergleichbar mit den Messwerten aus Reaktionen ohne microRNA. Die Zugabe der miR-124mat führte zu keinem Zeitpunkt zu einer wesentlichen Veränderung der Luziferase-Aktivität. Dieses Ergebnis zeigt, dass die miR-122 keinen Einfluss auf die Enzymaktivität der *Firefly*-Luziferase hat.



**Abbildung 21: microRNA-122 hat keinen Einfluss auf die Enzymaktivität der *Firefly*- und *Renilla*-Luziferase.** (A) Reporter-RNA pD5 kodierend für die *Firefly*-Luziferase (Fluc) mit 5'-Cap-Nukleotid verwendet in (B). (B) Fluc-Aktivität in % nach *in vitro* Translation der *Firefly*-Reporter-RNA pD5 in RRL in An- oder Abwesenheit von Einzelsträngen (miR mat) der miR-122 oder miR-124; n=3. Die Zugabe der microRNAs erfolgte entweder vor Inkubation der Translationsreaktion (vor Ink.) oder nach Inkubation der Reaktion kurz vor Messung der Luziferase-Aktivität (nach Ink.). Die Messwerte aus Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt. (C) Reporter-RNA phRLnull kodierend für die *Renilla*-Reporter-RNA (Rluc) mit 5'-Cap-Struktur verwendet in (D). (D) Wie (B), nur mit *Renilla*-Reporter-RNA phRLnull aus (C); n=3.

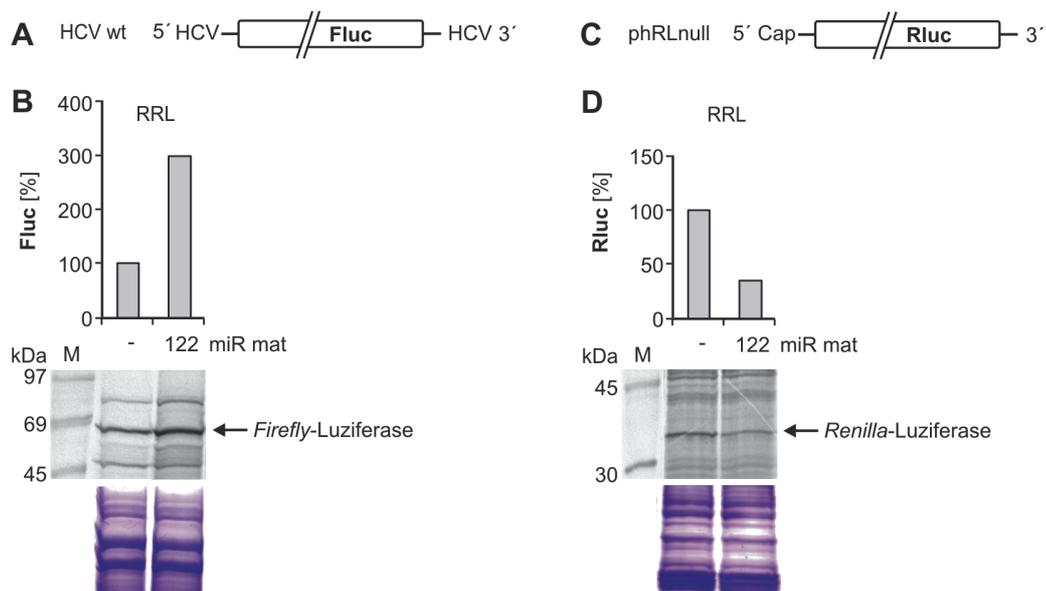
Entsprechende Translationsexperimente mit der Reporter-RNA kodierend für die *Renilla*-Luziferase (Abb. 21D) ergaben vergleichbare Resultate. Auch hier führte ausschließlich die Zugabe der miR-122mat vor Inkubation der Translationsreaktion zu einer Repression, während die Zugabe nach der Inkubation keinen Einfluss auf die *Renilla*-Luziferase-Aktivität hatte. Die Daten weisen darauf hin, dass die Reporter auf der Ebene der Translation durch die miR-122 beeinflusst werden.

### E3 miR-122 wirkt auf die Translation der Reporter-RNAs

Zur Bestätigung, dass die miR-122 die Expression der Reporter-Proteine auf der Ebene der Translation beeinflusst, wurden anschließend *in vitro* Translations-Experimente in Anwesenheit von L-[<sup>35</sup>S]-Methionin durchgeführt. Die radioaktiv markierte Aminosäure wird kotranslational in die exprimierten Proteine eingebaut, welche auf diese Weise markiert werden und anschließend durch Auftrennung über SDS-PAGE und Autoradiographie sichtbar gemacht werden können. Da das RRL aufgrund von Nuklease-Behandlung durch den Hersteller nur Bruchstücke translationsfähiger zellulärer mRNAs enthält, kann man davon ausgehen, dass die detektierten Proteine Produkte der Translation der zugegebenen Reporter-RNAs sind. Nach der *in vitro* Translation der Reporter-RNAs in RRL wurde im Folgenden ein Teil der Reaktion für die Messung der Luziferase-Aktivität verwendet. Der andere Teil der Reaktion wurde auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die translatierten Reporter-Proteine mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

Die Messung der Luziferase-Aktivität nach Translations-Reaktionen mit HCV-Reporter-RNA, die für die *Firefly*-Luziferase kodiert (Abb. 22A), ergab wie in vorangehenden Versuchen eine gesteigerte Luziferase-Aktivität in Anwesenheit der miR-122mat (Abb. 22B oben). Bei anschließendem Nachweis

der Translationsprodukte über SDS-PAGE und Autoradiographie (Abb. 22B mitte) konnte eine Bande im Größenbereich von 60 - 65 kDa detektiert werden, was der Größe der *Firefly*-Luziferase von 62 kDa entspricht. Ein Vergleich der Stärke der Banden aus den Reaktionen mit und ohne miR-122mat, zeigt eine deutliche Steigerung der Intensität in Anwesenheit der miR-122mat. Die Färbung des Gels mit Coomassie bestätigte, dass die unterschiedlichen Bandenstärken entsprechend der *Firefly*-Luziferase nicht durch Auftrag unterschiedlicher Proteinmengen hervorgerufen werden (Abb. 22B unten). Dieses Ergebnis zeigt, dass die gesteigerte Luziferase-Aktivität in Anwesenheit von miR-122 aus vermehrter Produktion von Luziferase-Proteinen resultiert. Damit wird die stimulatorische Wirkung der miR-122 auf die Translation der HCV-Reporter-RNA in RRL bestätigt.



**Abbildung 22: miR-122 wirkt auf die Translation der Reporter-RNAs.** (A) Reporter-RNA HCVwt mit HCV-5'-NTR, *Firefly*-Luziferase-Sequenz (Fluc) und HCV-3'-NTR verwendet in (B). (B) Oben: Fluc-Aktivität in % nach *in vitro* Translation der Reporter-RNA HCVwt aus (A) in RRL in Anwesenheit von L-[<sup>35</sup>S]-Methionin und in An- oder Abwesenheit von einzelsträngiger miR-122 (miR mat); exemplarisches Experiment aus n=3. Die Messwerte aus Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt. Mitte: Nachweis der *Firefly*-Luziferase aus der zuvor gemessenen Reaktion über SDS-PAGE und Autoradiographie; M= <sup>14</sup>C-Marker. Unten: Coomassie-Färbung des SDS-Polyacrylamidgels (C) Reporter-RNA kodierend für die *Renilla*-Luziferase (Rluc) mit 5'-Cap-Nukleotid verwendet in (D). (D) Wie (B), nur mit *Renilla*-Reporter-RNA phRLnull aus (C) und Nachweis der *Renilla*-Luziferase.

Entsprechende Experimente mit Reporter-RNA kodierend für die *Renilla*-Luziferase, die keine HCV-NTRs enthält (Abb. 22C), zeigten, dass die Zugabe der miR-122 zur Translations-Reaktion wie schon zuvor beobachtet zu einer verringerten Luziferase-Aktivität führt (Abb. 22D oben). Durch anschließende Analyse der Translationsprodukte über SDS-PAGE wurde in Reaktionen mit miR-122mat, übereinstimmend mit den Messwerten, weniger Protein in der Größe der *Renilla*-Luziferase von 36 kDa detektiert (Abb. 22D mitte). Die Coomassie-Färbung des Gels zeigte auch hier, dass die durch Autoradiographie detektierten unterschiedlichen Bandenstärken nicht durch verschiedene Auftragsmengen zustande kommen (Abb. 22D unten). Die Ergebnisse bestätigen, dass die verringerten Luziferase-Werte bei der Translation von Reporter-RNAs ohne HCV-NTRs durch verringerte Proteinproduktion hervorgerufen werden. Folglich reprimiert die miR-122 die Translation der

Reporter-RNAs, die keine HCV-NTRs und damit keine Ziel-Sequenzen der miR-122 in den nicht-translatierten Regionen enthalten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sowohl die gesteigerte Luziferase-Aktivität bei Translation der HCV-Reporter-RNA als auch die verringerte Luziferase-Aktivität bei Translation von Reporter-RNAs ohne HCV-NTRs durch Einfluss der miR-122 auf die Translationseffizienz der Reporter-RNAs hervorgerufen wird.

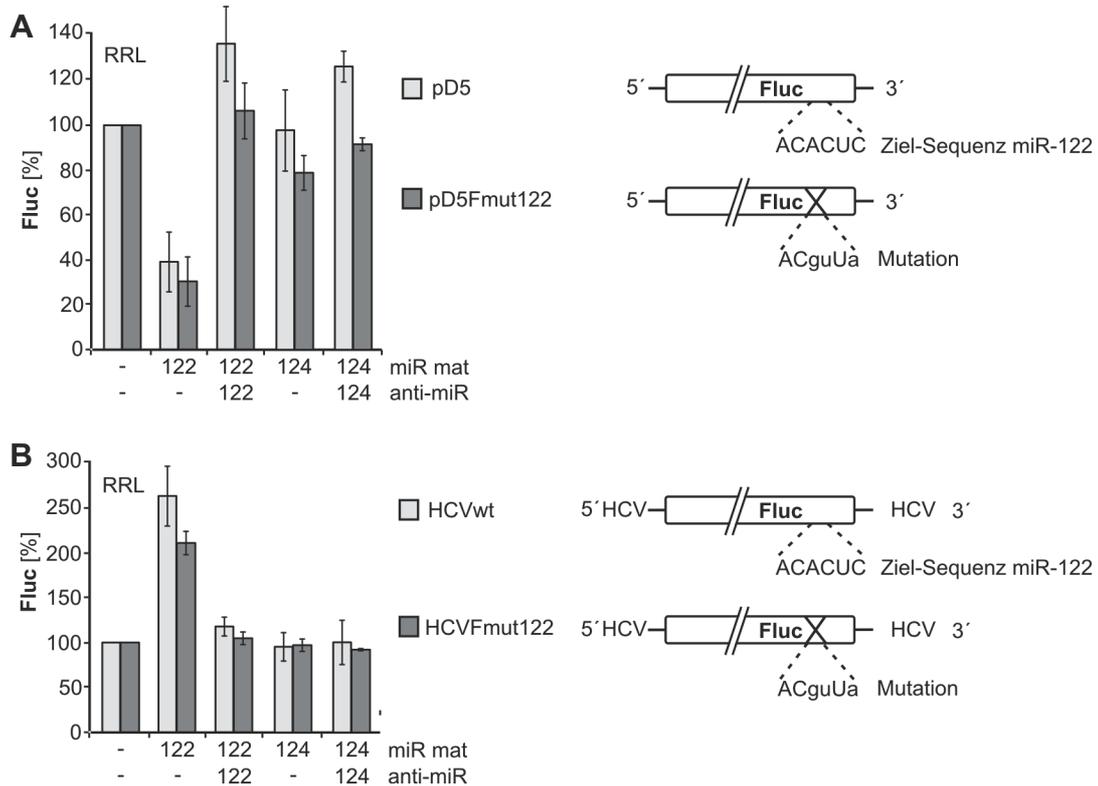
#### **E4 Die Mutation einer potentiellen Ziel-Sequenz in der *Firefly*-Luziferase-Sequenz hat keinen Einfluss auf den Effekt der miR-122 auf die Translation der Reporter-RNAs**

Die vorangehenden Experimente zeigten, dass die miR-122 die Translation der *Firefly*- und *Renilla*-Reporter-Sequenzen unabhängig von Ziel-Sequenzen der miR-122 in nicht-translatierten Regionen der Reporter-RNAs reprimiert. Dies lässt vermuten, dass der Effekt entgegen der bis dahin bekannten Translationsrepression durch Interaktion von microRNAs mit der 3'-NTR der Ziel-RNA möglicherweise durch funktionelle Zielsequenzen der miR-122 innerhalb der Protein-kodierenden Sequenzen der Reporter-RNAs vermittelt wird.

Die Analyse der *Firefly*-Luziferase-Sequenz unter Berücksichtigung der Watson-Crick-Basenpaarung ergab, dass sich im Protein-kodierenden Bereich der *Firefly*-Luziferase eine zur „seed“-Region der miR-122 komplementäre Sequenz 5'-ACACUC-3' mit einer Länge von 6 Nukleotiden befindet (Abb. 23A rechte Spalte, siehe auch Anhang). Diese wurde unter Erhalt des Leserahmens und der Aminosäuresequenz durch PCR-Mutagenese zu 5'-ACGUUA-3' mutiert. Anschließend wurde der Effekt der miR-122 auf die Translation der mutierten Reporter-RNA pD5Fmut122 im Vergleich zur Wildtyp-Reporter-RNA pD5 in RRL untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Translation der Reporter-RNA auch bei Mutation der möglichen Bindestelle der miR-122 in der Protein-kodierenden Sequenz der *Firefly*-Luziferase durch miR-122 in gleichem Maße wie die Wildtyp-Reporter-RNA pD5 reprimiert wird (Abb. 23A). Des Weiteren führte ein Abfangen der miR-122 durch Zugabe der anti-miR-122 bei der Translation beider Reporter-RNAs zu einer Aufhebung des inhibierenden Effektes der miR-122. Die Zugabe von miR-124 und entsprechender anti-miR hatte in beiden Fällen keinen Einfluss auf die Reporter-Expression. Diese Resultate bestätigen die Spezifität des beobachteten Effektes für die miR-122. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die Repression der Reporter-Expression nicht durch die Interaktion der miR-122 mit der hier mutierten potentiellen Bindestelle in der Protein-kodierenden Sequenz der *Firefly*-Luziferase vermittelt wird.

Zur Kontrolle, dass die potentielle Zielsequenz der miR-122 in der Sequenz der *Firefly*-Luziferase auch keinen Einfluss auf die Translation der HCV-Reporter-RNA hat, wurde auch hier die entsprechende Mutation eingefügt und vergleichende Translationsexperimente in RRL durchgeführt (Abb. 23B).



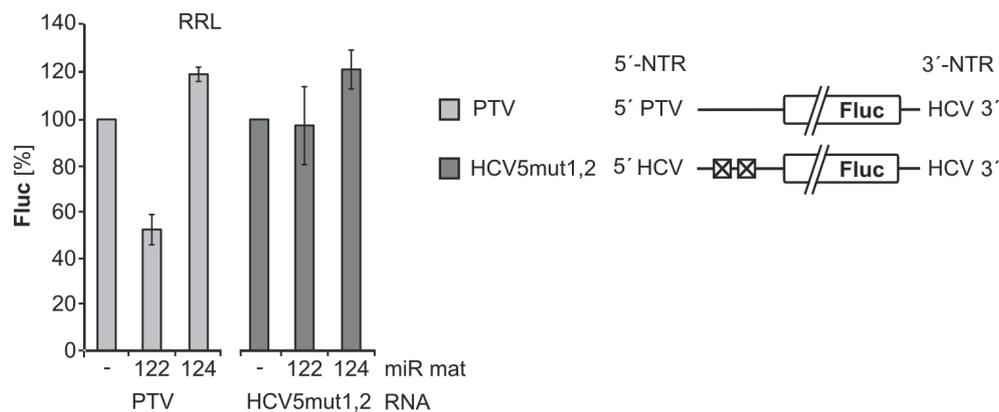
**Abbildung 23: Mutation einer potentiellen miR-Bindestelle in der *Firefly*-Luziferase-Sequenz hat keinen Einfluss auf den Effekt der miR-122 auf die Translation der Reporter-RNAs.** (A) Linke Spalte: Luziferase-Aktivität in % nach *in vitro* Translation der Reporter-RNA pD5 und pD5Fmut122 kodierend für die *Firefly*-Luziferase (Fluc) in RRL in An- oder Abwesenheit von Einzelsträngen (miR mat) der miR-122 oder miR-124 und entsprechenden 2'-O-methylierten antisense-Oligoribonukleotiden (anti-miR); n=3. Die Messwerte aus Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt. Rechte Spalte: Schematische Darstellung der Wildtyp-Reporter-RNA pD5 und RNA pD5Fmut122 mit Mutation (Kleinbuchstaben) in der potentiellen Ziel-Sequenz der miR-122 in der Protein-kodierenden Region. (B) Wie in (A), nur mit HCV-Reporter-RNA; n=3.

entsprechende Mutation eingefügt und vergleichende Translationsexperimente in RRL durchgeführt (Abb. 23B). Die Ergebnisse zeigen, dass die Translation der mutierten Reporter-RNA HCVFmut122 wie die Wildtyp HCV-RNA durch miR-122 stimuliert wird, was durch Abfangen der miR-122 bei Zugabe der entsprechenden anti-miR verhindert werden konnte. Die verwendeten Kontroll-Oligoribonukleotide hatten keinen Effekt. Dies bestätigt erneut, dass die zur „seed“-Region der miR-122 komplementäre Sequenz in der Protein-kodierenden Region der *Firefly*-Luziferase nicht als miR-122-Ziel-Sequenz fungiert.

### **E5 Der allgemeine inhibierende Effekt der miR-122 auf die Translation in RRL ist für die Translation der HCV-Reporter-RNA nicht relevant**

Es wurde festgestellt, dass die miR-122 in RRL einen allgemeinen inhibierenden Effekt auf die Translation von Reporter-RNAs hat. Im Fall der HCV-Reporter-RNA konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden, da die miR-122 die Translation der HCV-Reporter-RNA außerdem durch Bindung an Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR stimuliert. Es stellte sich daher die Frage, ob der allgemeine inhibierende Effekt der miR-122 bei der Translation der HCV-Reporter-RNA durch den zusätzlichen

stimulatorischen Effekt nicht detektiert werden kann, oder ob die Translation der HCV-Reporter-RNA von der Repression durch miR-122 nicht betroffen ist. Da davon die weitere Verwendbarkeit der HCV-Reporter-RNA für die Untersuchung der HCV-Translationsstimulation durch miR-122 in RRL abhing, wurde dies im Folgenden analysiert. Dazu wurde der Effekt der miR-122 auf die Translation der PTV-Reporter-RNA mit dem Effekt der miR-122 auf die HCV-Reporter-RNA HCV5mut1,2 verglichen (Abb. 24). In der HCV5mut1,2-RNA sind die Ziel-Sequenzen der miR-122 mutiert, was den stimulierenden Effekt der miR-122 auf die Translation der HCV-Reporter-RNA wie schon in Kapitel II.3.2 gezeigt vollständig ausschaltet. Dies ermöglicht die Untersuchung, ob die HCV-Reporter-RNA zusätzlich zu dem stimulierenden Effekt durch die miR-122 in RRL beeinflusst wird.



**Abbildung 24: Der allgemeine inhibierende Effekt der miR-122 auf die Translation in RRL ist für die Translation der HCV-Reporter-RNA nicht relevant.** Linke Spalte: Luziferase-Aktivität in % nach *in vitro* Translation der Reporter-RNA PTV und HCV5mut1,2 kodierend für die *Firefly*-Luziferase (Fluc) in RRL in An- oder Abwesenheit von Einzelsträngen (miR mat) der miR-122 oder miR-124. Die Messwerte aus Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt. Rechte Spalte: PTV-Reporter-RNA mit PTV-5'-NTR, *Firefly*-Luziferase (Fluc) und HCV-3'-NTR und HCV5mut1,2-Reporter-RNA mit HCV-5'-NTR mit mutierten Ziel-Sequenzen der miR-122 (weiße, gekreuzte Kästen), *Firefly*-Luziferase und HCV-3'-NTR.

Wie schon in vorangehenden Experimenten beobachtet wurde die Translation der PTV-Reporter-RNA durch Zugabe der miR-122mat zu den Translationsreaktionen reprimiert, während die Kontroll-miR-124mat keinen Effekt hatte (Abb. 24). Die Translationseffizienz der HCV5mut1,2-RNA war in Anwesenheit der miR-122mat dagegen vergleichbar mit der Translationseffizienz aus Reaktionen ohne microRNA. Dies bestätigt, dass die Mutation der Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR zu einem Verlust der Translationsstimulation durch miR-122 führt. Des Weiteren wird deutlich, dass die Translation der HCV-Reporter-RNA, obwohl sie wie die PTV-RNA die *Firefly*-Luziferase-Sequenz enthält, nicht durch die miR-122 reprimiert wird. Der allgemeine inhibierende Effekt der miR-122 in RRL auf die Translation von Reporter-RNAs ist folglich für die Translation der HCV-Reporter-RNA nicht relevant.

## E6 Diskussion

Vergleichende Translationsstudien in RRL mit Reporter-RNAs mit unterschiedlichem 5'- und 3'-Ende ließen zunächst vermuten, dass die miR-122 in RRL einen allgemeinen inhibierenden Effekt auf

die Expression der *Firefly*-Luziferase hat, der möglicherweise auch die Untersuchungen der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in RRL beeinflusst. Die weitere Untersuchung dieses Effektes ergab, dass auch die Expression der *Renilla*-Luziferase durch miR-122 in RRL reprimiert wird und dass die Repression auf der Ebene der Translation stattfindet. Die Experimente deuteten zunächst darauf hin, dass die Translationsrepression durch miR-122 unabhängig von cis-regulatorischen Elementen der Translation und darin enthaltenen miR-Bindestellen erfolgt. Es wurde vermutet, dass möglicherweise Ziel-Sequenzen in der Protein-kodierenden Region der Reporter-Sequenzen den inhibitorischen Effekt der miR-122 vermitteln.

Zur Zeit der Durchführung der Experimente war die Regulation der Translation durch Interaktion von microRNAs mit Protein-kodierenden Sequenzen noch unzureichend untersucht. Es war bekannt, dass in Säuger- und Insektzellen die wichtigste und ausreichende Determinante einer funktionellen miR-Bindestelle in den NTRs einer mRNA die Komplementarität der „seed“-Region der microRNA zur Ziel-RNA ist (Doench & Sharp, 2004; Brennecke et al., 2005; Lewis et al., 2005). Die Reporter-Sequenzen wurden in dieser Arbeit also zunächst auf komplementäre Sequenzabschnitte zur „seed“-Region der miR-122 untersucht. Nach diesen Kriterien konnte nur ein Sequenzabschnitt mit ausreichender Komplementarität von 6 Nukleotiden in der Sequenz der *Firefly*-Luziferase dokumentiert werden. Die Mutation dieser Region und anschließende Translationsstudien zeigten, dass dies keine funktionelle Ziel-Sequenz der miR-122 ist. Übereinstimmend mit diesem Befund zeigen neuere Publikationen, dass eine Repression der Translation durch Interaktion mit der Protein-kodierenden Sequenz auch in Säugerzellen stattfinden kann (zusammengefasst in Rigoutsos, 2009). Allerdings erfordert dies eine nahezu vollständige Paarung der microRNA mit der Ziel-mRNA, um eine Ablösung der miRNP-Komplexe von der mRNA durch translatierende Ribosomen zu verhindern (Duursma et al., 2008; Forman et al., 2008; Tay et al., 2008; Gu et al., 2009). Diese neuen Erkenntnisse zeigen, dass die untersuchte microRNA-Bindestelle in der *Firefly*-Luziferase-Sequenz nicht den Kriterien einer funktionellen miR-Bindestelle in Protein-kodierenden Sequenzabschnitten entspricht. Anhand der diesbezüglichen Ergebnisse kann folglich keine Aussage über eine mögliche Regulation der Translation der Reporter-RNAs durch Interaktion der miR-122 mit der Protein-kodierenden Region getroffen werden. Die erneute Analyse der Reporter-Sequenzen auf potentielle miR-122-Bindestellen nach neueren Kriterien mit dem Programm RNA22 (Miranda et al., 2006) zeigte jedoch, dass sowohl in der *Firefly*-Luziferase-Sequenz als auch in der *Renilla*-Luziferase-Sequenz maximal eine gleichzeitige Paarung von 16 Nukleotiden der 22 Nukleotide der miR-122 möglich ist (siehe Anhang). Ob der Grad der Basenpaarung ausreichend ist, um einen repressorischen Effekt zu vermitteln, kann nach Kenntnissen aus bisherigen Publikationen nicht eindeutig bestimmt werden (Duursma et al., 2008; Forman et al., 2008; Tay et al., 2008; Gu et al., 2009).

Einen entscheidenden Hinweis darauf, dass die Translationsrepression der Reporter-RNAs in RRL wahrscheinlich nicht durch Interaktion der miR-122 mit der Protein-kodierenden Sequenz vermittelt wird, geben die Resultate aus Translationsexperimenten mit der HCV-Reporter-RNA HCVmut1,2, bei

der der stimulatorische Effekt der miR-122 durch Mutation beider Ziel-Sequenzen in der 5'-NTR ausgeschaltet ist. Wäre eine Bindung der miR-122 an den offenen Leserahmen für die verringerte Translationsaktivität der Reporter-RNAs verantwortlich, würde man erwarten, dass nach Ausschalten der stimulatorischen Effektes der miR-122 auch die HCV-Reporter-RNA reprimiert wird, da sie wie die PTV-Reporter-RNA eine entsprechende Sequenz für die *Firefly*-Luziferase enthält. Entgegen der Erwartung bleibt jedoch die Translationseffizienz der HCVmut1,2-RNA in Anwesenheit der miR-122 konstant. Der einzige Unterschied zwischen der HCV- und PTV-Reporter-RNA ist die enthaltene IRES. Dies lässt vermuten, dass die miR-122 die Translationsinitiation der Reporter-RNAs mit Ausnahme der Initiation an der HCV-IRES reprimiert. Da vorangehende Versuche zeigten, dass verschiedene Formen der Translationsinitiation von der Repression durch miR-122 betroffen sind, die nach bisherigen Kenntnissen keine einheitliche Differenz zur Translationsinitiation an der HCV-IRES aufweisen, kann über einen möglichen Mechanismus nur spekuliert werden. Denkbar wäre eine generelle Interaktion der miR-122 mit Komponenten des Translationsapparates, die eine effiziente Bildung von ribosomalen Komplexen an den Reporter-RNAs außer an der HCV-Reporter-RNA stört. Dabei wäre sowohl eine Interaktion der miR-122 mit Translationsfaktoren als auch eine direkte Bindung an die ribosomale 40S-Untereinheit möglich. Übereinstimmend mit dieser Theorie wurde gezeigt, dass die miR-122 auch in Abwesenheit von Reporter-RNAs in RRL mit ribosomalen Komplexen in Sucrose-Dichtegradienten kosedimentiert (Henke, Goergen et al. 2008).

Ein wichtiges Ergebnis der Untersuchung des allgemeinen reprimierenden Einflusses der miR-122 auf die Translation in RRL ist, dass die Translation der HCV-Reporter-RNA nicht von diesem Effekt betroffen ist. Die vergleichenden Translationsexperimente mit der PTV-Reporter-RNA und der HCVmut1,2 zeigten eindeutig, dass die miR-122 neben dem stimulatorischen Effekt keinen weiteren Einfluss auf die Translation der HCV-Reporter-RNA hat. Damit wurde sichergestellt, dass die HCV-Reporter-RNA weiterhin für die Untersuchung der Stimulation der HCV-Translation verwendet werden kann.

Der genaue Mechanismus der allgemeinen Translationsrepression von Reporter-RNAs durch miR-122 in RRL konnte durch Untersuchungen in dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Da sich zeigte, dass dieser Effekt bei der Translationsstimulation der HCV-Translation durch miR-122 keine Rolle spielt, wurden diesbezügliche Analysen vorerst unterbrochen und sollen in weiterführenden Studien eingehender bearbeitet werden.

## **E7 Fazit**

Translationsstudien deuten darauf hin, dass die Zugabe der miR-122 in RRL einen allgemeinen reprimierenden Effekt auf die Translation hat. Weitere Untersuchungen lassen einen inhibierenden Einfluss der miR-122 auf die Translationsinitiation vermuten, von dem die HCV-IRES-vermittelte Translation der HCV-Reporter-RNA nicht betroffen ist. Folglich kann die HCV-Reporter-RNA weiterhin für die Untersuchung der Translationsstimulation durch miR-122 in RRL verwendet werden.

## **4 microRNA-122 stimuliert die HCV-Translation im Stadium der Initiation**

In der Literatur wird einheitlich beschrieben, dass die meisten bekannten microRNAs die Translation zellulärer RNAs reprimieren. Bis zu diesem Zeitpunkt gab es zusätzlich zu der hier beschriebenen Arbeit nur einen weiteren Bericht über eine direkte positive Regulation der Translation durch microRNAs (Orom et al., 2008). Über den Mechanismus der Repression der Translation und über die Frage, welches Stadium der Translation von microRNAs beeinflusst wird, wird kontrovers diskutiert (zusammengefasst in Pillai et al., 2007; Liu, 2008; Liu et al., 2008; Chekulaeva & Filipowicz, 2009). Einige Studien beschreiben eine Blockade der Translationsinitiation (Humphreys et al., 2005; Mathonnet et al., 2007), während andere eine Repression der Translationselongation (Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006) beobachten. Weitere beschreiben eine Inhibition der Translation durch Deadenylierung der Ziel-mRNA (Wu et al., 2006; Eulalio et al., 2009). Daher sollte im Folgenden untersucht werden, in welchem Stadium der HCV-Translation die miR-122 wirkt.

### **4.1 miR-122 steigert die Bildung der 48S-Translations-Initiationskomplexe**

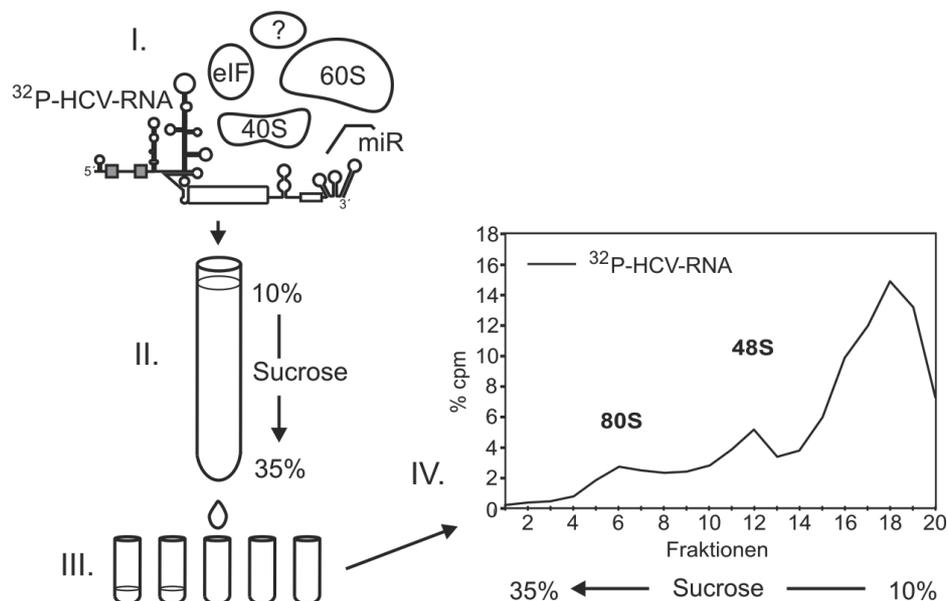
In vorangehenden Experimenten wurde gezeigt, dass die miR-122 die HCV-Translation durch Interaktion mit zwei Sequenzabschnitten in der HCV-5'-NTR stimuliert. Die HCV-5'-NTR ist aufgrund der enthaltenen internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) gleichzeitig der Ort der Translationsinitiation. Die lokale Nähe der funktionellen Ziel-Sequenzen für die miR-122 und der IRES ließ vermuten, dass möglicherweise die Initiation der HCV-Translation durch die miR-122 beeinflusst wird. Daher konzentrierten sich die ersten Untersuchungen auf den Einfluss der miR-122 auf die Bildung der Translationskomplexe an der HCV-RNA.

Der erste Schritt der Translationsinitiation an der HCV-IRES ist die Bildung der 48S-Präinitiationskomplexe (siehe auch Kapitel I.2.2). Diese entstehen durch direkte Interaktion der kleinen ribosomalen 40S-Untereinheit und des ternären-Komplexes mit der HCV-IRES. Danach erfolgt die Anlagerung der großen ribosomalen 60S-Untereinheit und Bildung der 80S-Translationskomplexe, die anschließend die HCV-RNA beginnend mit dem Start-Codon (AUG) translatieren.

Die Untersuchung des Einflusses der miR-122 auf die Bildung der Translationskomplexe an der HCV-RNA erfolgte durch Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation. Die Translationskomplexe haben aufgrund verschiedener Größe und Dichte unterschiedliche Sedimentationseigenschaften und können dadurch mittels Ultrazentrifugation in einem Sucrose-Gradienten aufgetrennt werden (Anthony & Merrick, 1992). Diese Methode wird häufig zur Analyse der Formation von Translationskomplexen verwendet und ermöglicht sowohl die Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Faktoren auf die Menge der gebildeten Translationskomplexe als auch auf den zeitlichen Ablauf der Komplexbildung (Arava et al., 2005; Kolupaeva et al., 2005; Merrick et al., 2007; Peng et al., 2008). Des Weiteren ermöglicht der Einsatz stadienspezifischer Translationsinhibitoren die getrennte Analyse der Initiation

und Elongation der Translation einer RNA. Abbildung 25 zeigt den prinzipiellen Ablauf der hier durchgeführten Experimente.

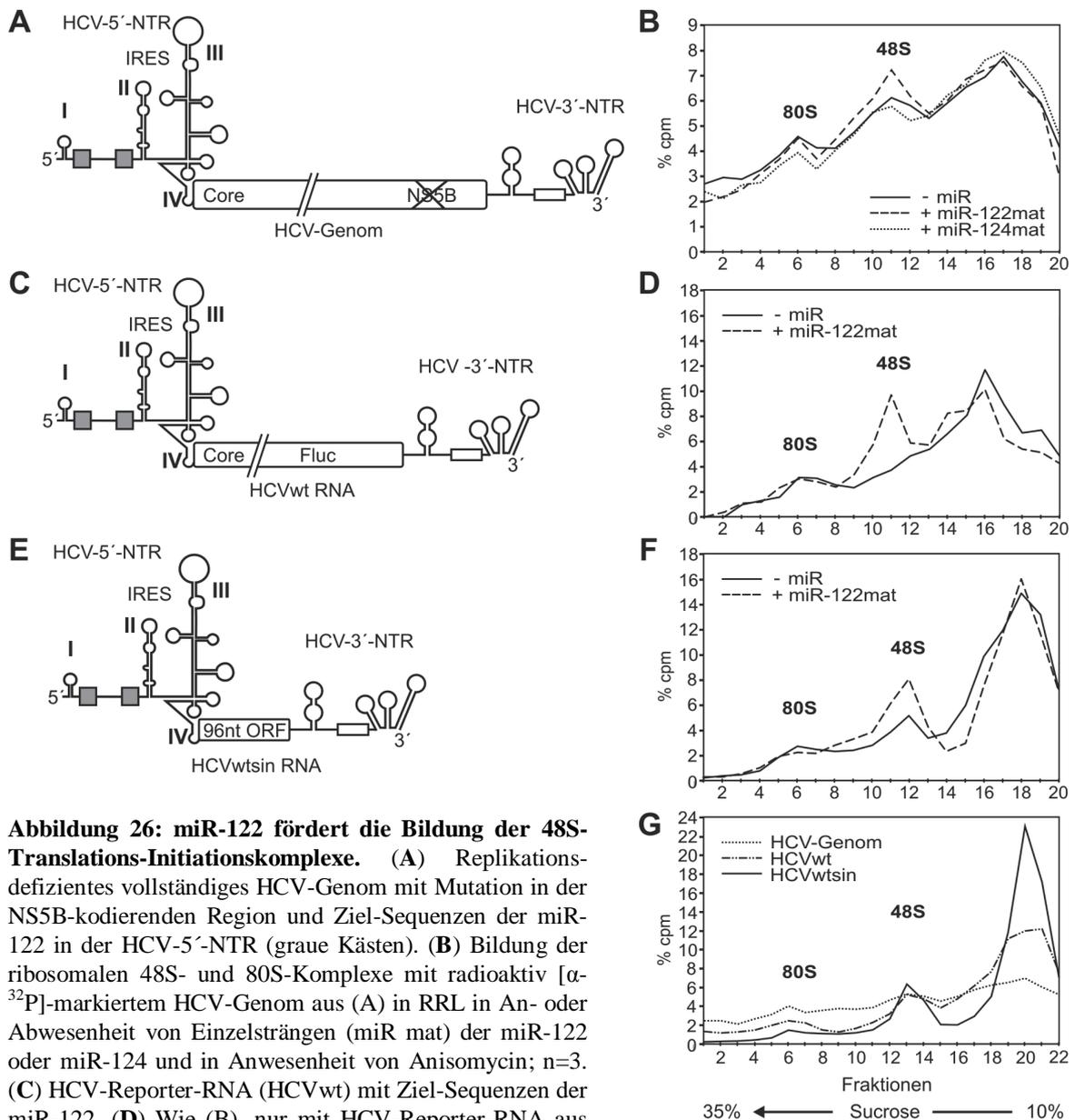
Für die Detektion der Translationskomplexe wurde die zu translatierende HCV-RNA durch *in vitro* Transkription in Anwesenheit von [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-markierten Nukleotiden radioaktiv markiert. Anschließend wurde die radioaktiv markierte HCV-RNA in einer Komplexbildungs-Reaktion in An- oder Abwesenheit von miR-122 in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (RRL) inkubiert (Abb. 25.I.). Zur Analyse der Bildung von Translations-Initiationskomplexen erfolgte die Inkubation in Anwesenheit des Inhibitors Anisomycin. Anisomycin inhibiert die Translationselongation, wodurch die Translations-Initiationskomplexe auf dem Stadium der 80S-Komplexe an der Position des Start-Codons mit der HCV-RNA komplexiert bleiben. Nach dem Stoppen der Komplexbildungs-Reaktion durch Kühlung auf Eis wurden diese auf einen Sucrose-Gradienten (35 - 10 % Sucrose) geladen, für 5,5 h bei 40.000 rpm (SW40-Rotor, Optima™LE-80K) ultrazentrifugiert und fraktioniert (Abb. 25.II. und III.).



**Abbildung 25: Analyse der Bildung von HCV-Translationskomplexen durch Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation.** I. Komplexbildungs-Reaktion mit radioaktiv markierter HCV-RNA ( $^{32}$ P-HCV-RNA) II. Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation. III. Fraktionierung der Gradienten und Messung der Radioaktivität (in *counts per minute*, cpm) in einzelnen Fraktionen. IV. Erstellung eines Gradientenprofils durch Ermittlung des Anteils der Radioaktivität jeder Gradientenfraktion an der Gesamtradioaktivität im Gradienten (% cpm).

Durch Messung der radioaktiven Strahlung der einzelnen Fraktionen (cpm, engl. *counts per minute*) wurden die HCV-RNA und damit auch die an der RNA gebildeten Translationskomplexe lokalisiert. Es folgte die Erstellung eines Gradientenprofils, in dem der Anteil der gemessenen Radioaktivität (% cpm) jeder Fraktion an der Gesamtradioaktivität im Gradienten dargestellt wird. Im Gradientenprofil ist die Menge der gemessenen Radioaktivität ein Maß für die Menge an gebildeten RNA-Protein-Komplexen und bestimmt die Höhe eines Peaks (Abb. 25.IV.). Die Fraktionsnummer, in der die Radioaktivität und damit die mit Proteinen komplexierte RNA detektiert wird, lässt Rückschlüsse auf die Größe der gebildeten RNA-Proteinkomplexe zu. Größere 80S-Komplexe sedimentieren schneller

und finden sich daher unter den oben genannten Reaktionsbedingungen in Fraktionen mit Sucrose-Konzentrationen von etwa 35 - 30 % wieder, während kleinere 48S-Komplexe bei einer Sucrose-Konzentration von etwa 25 - 20 % sedimentieren (Niepmann et al., 1997; Ochs et al., 2002). HCV-RNA, die nicht mit ribosomalen Untereinheiten assoziiert ist (freie RNA), lässt sich aufgrund der geringen Größe und Dichte bei geringen Sucrose-Konzentrationen von etwa 15 - 10 % nachweisen.



**Abbildung 26: miR-122 fördert die Bildung der 48S-Translations-Initiationskomplexe.** (A) Replikationsdefizientes vollständiges HCV-Genom mit Mutation in der NS5B-kodierenden Region und Ziel-Sequenzen der miR-122 in der HCV-5'-NTR (graue Kästen). (B) Bildung der ribosomalen 48S- und 80S-Komplexe mit radioaktiv [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-markiertem HCV-Genom aus (A) in RRL in An- oder Abwesenheit von Einzelsträngen (miR mat) der miR-122 oder miR-124 und in Anwesenheit von Anisomycin; n=3. (C) HCV-Reporter-RNA (HCVwt) mit Ziel-Sequenzen der miR-122. (D) Wie (B), nur mit HCV-Reporter-RNA aus (C) und in An- oder Abwesenheit von miR-122mat; n=2. (E) HCV-Reporter-RNA (HCVwt-sin) mit auf 96 Nukleotide (96nt) verkürztem offenen Leserahmen (ORF) und mit miR-122 Ziel-Sequenzen. (F) Wie (B), nur mit HCV-Reporter-RNA aus (E) und in An- oder Abwesenheit von miR-122mat; n=5. (G) Bildung der ribosomalen 48S- und 80S-Komplexe mit verschiedenen langen HCV-RNAs im Vergleich.

In den folgenden Experimenten wurde zunächst die Translationskomplex-Bildung an der replikationsdefizienten vollständigen genomischen HCV-RNA (Abb. 26A, siehe auch Kapitel II.1.2 und Henke, Goergen et al., 2008) in RRL in An- oder Abwesenheit von miR-122mat und miR-124mat untersucht (Abb. 26B). In allen Gradientenprofilen konnten die zuvor beschriebenen Peaks entsprechend der 80S- und 48S-Komplexe (Fraktion 6, bzw. 11) sowie ein Peak entsprechend der freien RNA (Fraktion 18) detektiert werden. In Reaktionen mit miR-122mat war der Peak entsprechend der 48S-Komplexe im Vergleich zu Reaktionen ohne microRNA erhöht, was auf eine vermehrte Bildung von 48-Komplexen in Anwesenheit der miR-122mat hinweist. In Anwesenheit der miR-124mat konnte dagegen keine verstärkte Bildung der 48S-Komplexe beobachtet werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die miR-122 die HCV-Translation in RRL in einem frühen Stadium der Translationsinitiation durch Stimulation der Bildung von 48S-Komplexen an der HCV-IRES fördert.

Im Vergleich zu Gradientenprofilen früherer Studien mit kürzeren Reporter-RNAs waren die Täler der Gradientenprofile mit der vollständigen genomischen HCV-RNA weniger tief und die Trennung der einzelnen Peaks weniger deutlich (vergleiche Niepmann et al., 1997; Ochs et al., 2002). Es wurde vermutet, dass sich durch die unterschiedliche Faltung der langen RNA und eine verstärkte Assoziation mit einer variierenden Anzahl von RNA-bindenden Proteinen eine heterogene Population von RNA-Protein-Komplexen bildet, die bei unterschiedlichen Sucrose-Konzentrationen über den Gradienten verteilt sedimentieren. Dadurch wird eine klare Identifizierung der Translations-Initiationskomplexe und möglicherweise auch die Detektion des Effektes der miR-122 erschwert.

Um dies zu überprüfen, wurde die Translationskomplex-Bildung an der für Translationsstudien verwendeten kürzeren HCV-Reporter-RNA (HCVwt) untersucht (Abb. 26C). Zusätzlich wurde eine HCV-RNA verwendet, bei der weiterhin der offene Leserahmen für die *Firefly*-Luziferase deletiert und auf 96 Nukleotide verkürzt wurde (HCVwtsin, Abb. 26E).

Die Gradientenprofile von Komplexbildungs-Reaktionen mit den kürzeren HCV-RNAs in RRL in An- oder Abwesenheit von miR-122mat (Abb. 26B,C) zeigten, dass der 48S-Peak bei Zugabe der miR-122mat stark erhöht ist. Diese Daten bestätigen die Resultate aus Analysen mit genomischer HCV-RNA, dass die miR-122 in RRL die Bildung der 48S-Komplexe und damit die Translationsinitiation an der HCV-IRES stimuliert. Zudem zeigten die Gradientenprofile, dass die Trennung der Peaks deutlicher wird, je kürzer die RNA ist.

In einem direkten Vergleich der Gradientenprofile verschieden langer RNAs (Abb. 26D) ist zu erkennen, dass mit steigender RNA-Länge weniger freie RNA nachgewiesen werden konnte (Fraktionen 18 - 22). Dafür konnte mit steigender Länge der HCV-RNA über den Gradienten verteilt mehr Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen gemessen werden. Dies bestätigt die Hypothese, dass sich mit steigender Länge der RNA verstärkt RNA-Protein-Komplexe unterschiedlicher Größe und Dichte bilden, die über den Gradienten verteilt sedimentieren und die Identifizierung der Peaks entsprechend der gebildeten Translationskomplexe erschweren.

Zusammenfassend wurde durch die Analyse der Bildung von Translations-Initiationskomplexen mit HCV-RNAs verschiedener Länge gezeigt, dass die miR-122 in RRL die Bildung der 48S-Komplexe an der IRES fördert und damit die HCV-Translation im Stadium der Initiation stimuliert.

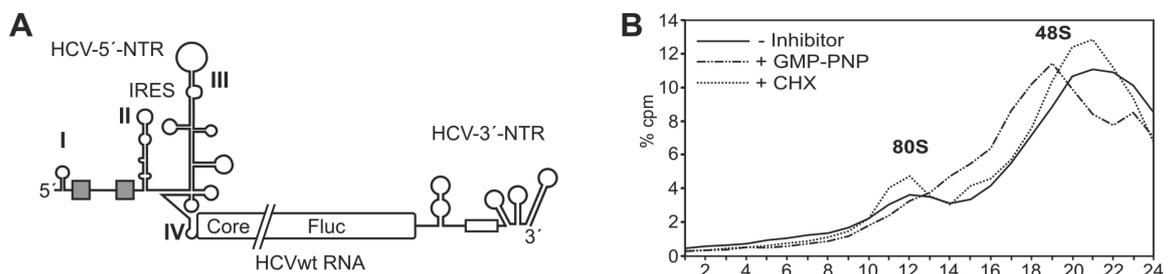
#### **4.2 Die Stimulation der 48S-Komplexbildung durch miR-122 resultiert in gesteigerter Polysomen-Bildung**

Im vorigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die miR-122 die HCV-Translation im Stadium der Initiation durch Förderung der 48S-Komplex-Bildung stimuliert. Im Folgenden sollte geprüft werden, ob die vermehrte Bildung von Initiationskomplexen durch Zugabe von miR-122 auch in eine gesteigerte Translationselongation übergeht. Dazu wurde die Polysomen-Bildung an der HCV-RNA in An- und Abwesenheit von miR-122 untersucht. Hierzu wurde die HCV-Reporter-RNA inklusive der *Firefly*-Luziferase-Sequenz verwendet (HCVwt, Abb. 27A). Mit dieser RNA konnte in vorherigen Versuchen im Gegensatz zu vollständiger genomischer HCV-RNA eine gute Trennung der Translations-Komplexe bei der Gradienten-Zentrifugation erzielt werden. Des Weiteren enthält diese RNA im Gegensatz zu der verkürzten HCVwt<sub>sin</sub>-RNA mit einem Leserahmen von nur 96 Nukleotiden einen ausreichend langen offenen Leserahmen, der eine Polysomen-Bildung ermöglicht.

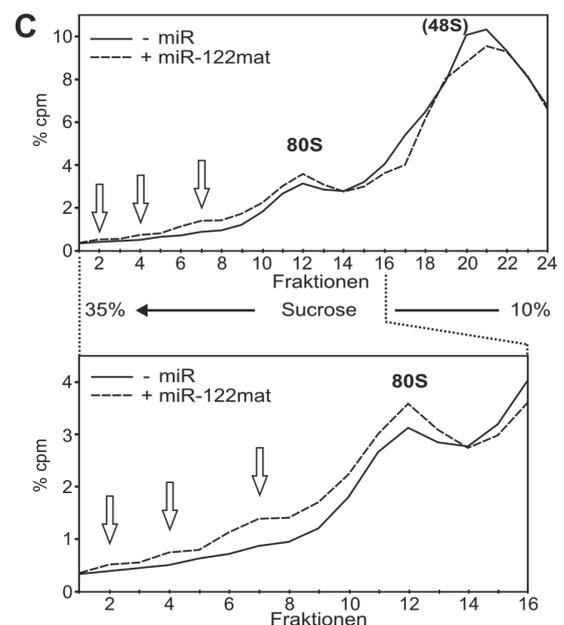
Zur Analyse der Polysomen-Bildung wurde die Komplexbildungs-Reaktionen im Gegensatz zu vorangehenden Experimenten in Abwesenheit des Elongationsinhibitors Anisomycin inkubiert. Die Arretierung der gebildeten Translationskomplexe erfolgte hier durch Zugabe von Magnesiumchlorid und Kühlung der Reaktionen auf Eis. Um eine bessere Auftrennung der 80S-Komplexe und Polysomen zu erzielen, wurden die Gradienten außerdem nur für 2,5 h ultrazentrifugiert und anschließend in kleinere Fraktionen aufgeteilt. Aufgrund der verkürzten Zentrifugationszeit sedimentieren die Translationskomplexe in Bereichen geringerer Sucrose-Konzentration. Größere Komplexe wie Polysomen, die sich unter den vorigen Reaktionsbedingungen am Boden des Gradienten-Röhrchens gesammelt haben, können dadurch im Gradienten getrennt werden.

Um die Peaks im Gradientenprofil später eindeutig den unterschiedlichen Translationskomplexen zuordnen zu können, erfolgte zunächst eine Positionsbestimmung der 48S- und 80S-Komplexe im Gradienten unter den veränderten Bedingungen. Dazu wurden stadienspezifische Translationsinhibitoren zur Komplexbildungs-Reaktion zugegeben. Die Identifizierung der 48S-Komplexe erfolgte durch Zugabe des Inhibitors GMP-PNP. Das nicht-hydrolysierbare GTP-Analog GMP-PNP bewirkt eine Anreicherung der 48S-Komplexe, indem es mit GTP um die Bindung an eIF2 konkurriert. Es inhibiert so die Ablösung von eIF2 von der kleinen ribosomalen Untereinheit und verhindert dadurch die Anlagerung der ribosomalen 60S-Untereinheit. Im Gradientenprofil kann folglich ein erhöhter Peak an der Position der 48S-Komplexe aber kein Peak entsprechend der 80S-Komplexe detektiert werden. Die Überprüfung der Lokalisation der 80S-Translationskomplexe erfolgte mittels des Elongationsinhibitors Cycloheximid (CHX), der die Peptidyltransferase an der ribosomalen 60S-Untereinheit inhibiert und daher eine Anreicherung der 80S-Komplexe bewirkt.

Unter veränderten Versuchsbedingungen konnten im Gradientenprofil ohne Inhibitor statt drei Peaks nur zwei breitere Peaks in den Fraktionen 11 - 13 und 19 - 23 mit geringerer Sucrose-Konzentration detektiert werden (Abb. 27B). In Anwesenheit des Translationsinhibitors GMP-PNP wurde im Bereich von Fraktion 19 ein großer und in Fraktion 23 ein etwas kleinerer Peak nachgewiesen. Der Peak in Fraktion 19 entspricht folglich den angereicherten 48S-Komplexen, der Peak in Fraktion 23 der nicht mit ribosomalen Untereinheiten assoziierten, freien RNA. Dies weist darauf hin, dass die 48S-Komplexe und die freie RNA in Gradienten ohne GMP-PNP durch die geringe Zentrifugationsdauer nicht vollständig getrennt werden und nur ein breiter Peak in Fraktionen 19 - 23 nachgewiesen werden kann. Des Weiteren fehlte in Reaktionen mit GMP-PNP im Vergleich zu Reaktionen ohne Inhibitor ein klar abgegrenzter Peak in den Fraktionen 11 - 13, was auf eine Sedimentation der 80S-Komplexe in diesen Fraktionen hinweist. Dies wurde durch Reaktionen mit Cycloheximid (CHX) bestätigt, in denen ein Anstieg des Peaks in Fraktionen 11 - 13 im Vergleich zu Reaktionen ohne Inhibitor detektiert wurde. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass der Peak in Fraktion 11 - 13 unter veränderten Reaktionsbedingungen den 80S-Komplexen entspricht, während die 48S-Komplexe und die freie HCV-RNA aufgrund der verkürzten Zentrifugationszeit nicht vollständig getrennt werden und in Fraktionen 19 - 23 sedimentieren. Die größeren Komplexe wie Polysomen sollten demnach in Fraktionen 1 - 9 sedimentieren, in denen aber zunächst keine entsprechenden Peaks nachgewiesen werden konnten.



**Abbildung 27: Die Stimulation der 48S-Komplex-Bildung durch miR-122 resultiert in gesteigerter Polysomen-Bildung.** (A) HCV-Reporter-RNA (HCVwt) mit Ziel-Sequenzen der miR-122 in der HCV-5'-NTR (graue Kästen). (B) Bildung der Translationskomplexe mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-markierter HCVwt RNA aus (A) in RRL in An- oder Abwesenheit der Translationsinhibitoren GMP-PNP oder Cycloheximid (CHX); n=1 (von 2 gleichwertigen durchgeführten Experimenten). (C) Bildung der Translations-Komplexe mit radioaktiv markierter HCVwt RNA aus (A) in RRL in An- oder Abwesenheit von einzelsträngiger miR-122 (miR-122mat) in Abwesenheit von Translationsinhibitoren. Pfeile kennzeichnen Polysomen-Peaks. Zur Verdeutlichung der Polysomen-Bildung sind Fraktionen 1 - 16 vergrößert dargestellt; n=3.



Bei der folgenden Analyse der Polysomen-Bildung in An- oder Abwesenheit von miR-122mat (Abb. 27C) konnte in allen Gradienten übereinstimmend ein 80S-Peak in Fraktion 11 - 13 als auch ein breiter Peak in den Fraktionen 19 - 23 entsprechend 48S-Komplexen und freier RNA nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Gradientenprofile von Reaktionen mit und ohne miR-122mat zeigt, dass der Peak entsprechend der 80S-Komplexe in Anwesenheit von miR-122mat leicht erhöht ist. Des Weiteren konnten in Reaktionen mit miR-122mat zusätzlich Peaks in Fraktionen 2, 4 und 7 entsprechend größerer Translationskomplexe wie Polysomen detektiert werden (Abb. 27C, Pfeile). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass an der HCV-Reporter-RNA während der Komplexbildungs-Reaktion ohne microRNA nicht ausreichend Polysomen gebildet werden, um diese als eindeutige Peaks im Gradientenprofil nachweisen zu können. Durch Zugabe der miR-122mat kommt es jedoch zu einer gesteigerten Polysomen-Bildung, die im Gradientenprofil detektiert werden kann. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass in Anwesenheit von miR-122 vermehrt HCV-Translationskomplexe in Form von 80S-Komplexen und Polysomen gebildet werden, was zeigt, dass die durch miR-122 geförderte Bildung der 48S-Translations-Initiationskomplexe auch eine gesteigerte Translationselongation zur Folge hat.

### 4.3 Diskussion

Schon die Identifizierung der funktionellen Ziel-Sequenzen der miR-122 in der HCV-5'-NTR in kurzer Distanz zur Sequenz der internen Ribosomen-Eintrittsstelle deutet auf einen direkten Einfluss der miR-122 auf die Initiation der HCV-Translation hin. Übereinstimmend zeigen die Resultate der vorliegenden Arbeit, dass die miR-122 in RRL die Bildung der 48S-Initiationskomplexen an der HCV-IRES fördert. In einer Analyse der Kinetik der Translationsinitiation an der HCV-IRES in RRL konnten zudem in Anwesenheit von miR-122 schon nach 30 Sekunden 48S-Komplexe detektiert werden, während in Reaktionen ohne miR-122 erst nach 1 - 2 Minuten 48S-Komplexen nachgewiesen werden konnten (Henke, Goergen et al., 2008). Dies deutet auf eine Beschleunigung der Assoziation der ribosomalen 40S-Untereinheit mit der HCV-IRES in Anwesenheit von miR-122 hin. Zudem zeigte die Untersuchung der Polysomen-Bildung, dass in Anwesenheit von miR-122 auch vermehrt elongierende Translationskomplexe gebildet werden, was mit gesteigerten Luziferase-Werten nach der Translation der HCV-Reporter-RNA in Anwesenheit von miR-122 korreliert. Die Ergebnisse weisen folglich darauf hin, dass die Interaktion der miR-122 mit der HCV-5'-NTR die Zugänglichkeit der HCV-IRES für Translationsfaktoren und/oder ribosomale Untereinheiten erhöht, was zu einer vermehrten Bildung von Translations-Initiationskomplexen führt und in einer gesteigerten Translationseffizienz resultiert.

Die erhöhte Zugänglichkeit der HCV-IRES für ribosomale Untereinheiten könnte einerseits dadurch erreicht werden, dass die Interaktion der miR-122 oder die Anlagerung von miRNP-Komplexen die Struktur der IRES stabilisiert. Andererseits wäre denkbar, dass es durch die Hybridisierung der miR-122 und Bindung von microRNA-assoziierten Faktoren zu einer Verdrängung von

translationsreprimierenden RNA-bindenden Proteinen kommt (George & Tenenbaum 2006). Es wäre auch möglich, dass die miR-122 translationsstimulierende Faktoren rekrutiert, die eine verstärkte Anlagerung der ribosomalen Untereinheit an die HCV-IRES vermitteln. Diese Faktoren könnten unter anderem Bestandteile der miRNP-Komplexe sein. Im Folgenden sollte daher die Beteiligung von miR-122-assoziierten Proteinen an der Stimulation der HCV-Translation untersucht werden.

#### **4.4 Fazit**

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Translationskomplex-Bildung an der vollständigen genomischen HCV-RNA sowie an verschiedenen langen HCV-Reporter-RNAs durch Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation zeigen, dass die miR-122 in RRL die Initiation der HCV-Translation durch Stimulation der Bildung von 48S-Komplexen an der HCV-IRES fördert. Weiterhin bestätigt die Analyse der Polysomen-Bildung, dass die vermehrte Bildung der 48S-Komplexe an der HCV-Reporter-RNA eine gesteigerte Translationselongation zur Folge hat.

## 5 Untersuchung der Beteiligung von Ago2-Proteinen an der Stimulation der HCV-Translation durch microRNA-122 in RRL

In vorangehenden Experimenten wurde gezeigt, dass die leberspezifische microRNA-122 die Translation der HCV-RNA in der Hepatoma-Zelllinie Huh7 sowie in einem *in vitro* Translationsystem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (RRL) stimuliert. Durch Mutagenese-Studien wurde festgestellt, dass der stimulatorische Effekt durch Interaktion der miR-122 mit der HCV-5'-NTR vermittelt wird. Die Analyse der Bildung von Translationskomplexen mittels Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation ergab, dass die miR-122 die HCV-Translation in RRL in einem frühen Stadium der Translationsinitiation durch Förderung der Bildung von 48S-Komplexen steigert.

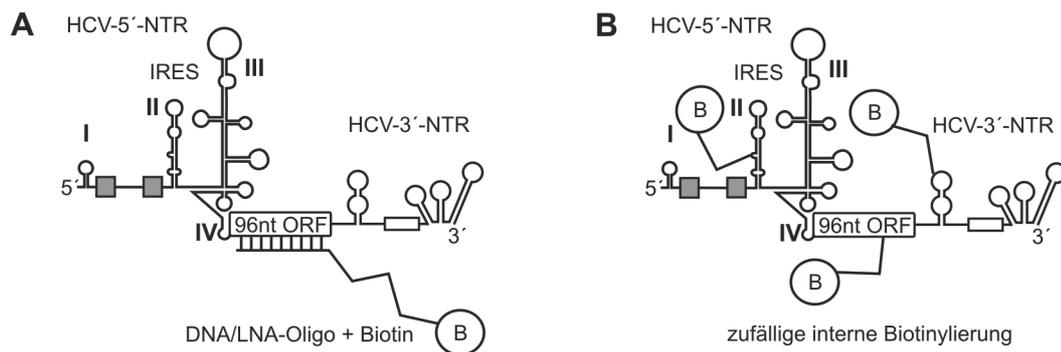
Nach bisherigen Kenntnissen sind funktionelle microRNAs Bestandteile von microRNA-Protein-Komplexen (miRNP-Komplexen) (Liu et al., 2008). Die Funktion der miRNAs in den Effektor-Komplexen ist die Identifizierung der Ziel-RNA durch unvollständige Hybridisierung mit komplementären Sequenzen in den NTRs der RNA. Der Effekt auf die Translation wird wie bis dahin angenommen im Wesentlichen durch die Proteinkomponenten der miRNP-Komplexe und den damit assoziierten Faktoren vermittelt (zusammengefasst in Liu et al., 2008; Chekulaeva & Filipowicz, 2009).

Die Schlüssel-Proteine der Effektor-Komplexe sind Proteine der Argonaute-Familie, wobei die Beteiligung von Ago2 an der Translationsregulation am häufigsten untersucht und beschrieben wurde (Pillai, 2005; Liu et al., 2008; Chekulaeva & Filipowicz, 2009; Iwasaki & Tomari, 2009). Neben einer Funktion bei der Repression der Translation beschrieben Vasudevan & Steitz (2007), dass Ago2-Proteine unter Zellzyklus-Arrest auch eine Stimulation der Translation eukaryotischer mRNAs vermitteln können. Des Weiteren wurde Ago2 (auch eIF2C2 oder Co-eIF2-A genannt) ursprünglich als Translationsinitiations-Faktor identifiziert (Roy et al., 1988; Zou et al., 1998) und Untersuchungen in RRL zeigten, dass Co-eIF2-A die Translation durch Förderung und Stabilisierung der Bildung des ternären Komplexes stimuliert (Roy et al., 1988; Zou et al., 1998). Diese Kenntnisse unterstützten die Hypothese, dass möglicherweise Ago2-Proteine an der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 beteiligt sind. Im nächsten Schritt sollte daher die Beteiligung von Proteinen wie Ago2 an der Translationsstimulation der HCV-RNA durch miR-122 analysiert werden.

### 5.1 Isolierung von HCV-Translations-Initiationskomplexen aus RRL mittels Streptavidin-Beads und Nachweis von Ago2-Proteinen

Zur Untersuchung der Beteiligung von Proteinen an dem stimulierenden Effekt der miR-122 wurde ein System zum Isolieren von HCV-Translations-Initiationskomplexen und assoziierten Faktoren aus RRL entwickelt („Fisch-Methode“). Dazu wurden Biotin-gekoppelte HCV-RNAs in An- oder Abwesenheit von miR-122 zur Bildung von HCV-Translationskomplexen in RRL inkubiert und anschließend mittels Streptavidin-Beads aufgereinigt. Diese Fisch-Methode sollte im Folgenden den

Nachweis von Ago2 in HCV-Translations-Initiationskomplexen in Anwesenheit von miR-122 mittels Western Blot ermöglichen. Des Weiteren wurde die Methode etabliert, um im Anschluss möglicherweise noch unbekannte, am Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation beteiligte Faktoren in RRL mittels 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie zu identifizieren. Obwohl sich letztlich herausstellte, dass sich diese Fisch-Methode für den Nachweis der Beteiligung von Ago-Proteinen am Effekt der miR-122 in RRL auf die HCV-Translation nicht eignet, soll die Etablierung und Optimierung hier dokumentiert werden, da die Methode nach einigen Modifikationen für die Isolierung von HCV-Translationskomplexen aus anderen Extrakten angewendet werden kann.



**Abbildung 28: Indirekt oder direkt biotinylierte HCV-RNA.** (A) HCVwt sin-RNA mit HCV-5'-NTR inklusive der Ziel-Sequenzen der miR-122 (graue Kästen), auf 96 Nucleotide verkürztem offenen Leserahmen (ORF) und HCV-3'-NTR. Biotinylierung durch Hybridisierung eines Biotin-gekoppelten DNA/LNA-Oligonukleotids an den ORF. (B) HCVwt sin-RNA wie in (A). Interne Biotinylierung durch Einbau von Biotin-gekoppelten Nucleotiden bei der Transkription der RNA.

Die Kopplung von Affinitäts-Tags an Nucleinsäuren, die nach einer Reaktion die spezifische Aufreinigung durch Bindung an eine Liganden gekoppelte Matrix oder Beads ermöglichen, ist eine häufig verwendete Methode zur Identifizierung von Interaktionspartnern und Komplex-Komponenten mittels Western Blot, Massenspektrometrie oder Real-Time-PCR (Gadgil et al., 2001; Hegarat et al., 2008; Walker et al., 2008). Sie bietet den Vorteil, die Beteiligung von bekannten Bindungspartnern als auch noch unbekannter Faktoren nachweisen zu können. Auch für die Untersuchung der Bindung von Translationsfaktoren und anderen zellulären Proteinen an die HCV-RNA wurden in vorangehenden Studien verschiedene Affinitäts-Aufreinigungs-Systeme verwendet (Lu et al., 2004; Ji et al., 2004; Harris et al., 2006; Locker et al., 2006; Pacheco et al., 2008). In den hier genannten Studien wurden allerdings nur einzelne Sequenzabschnitte des HCV-Genoms wie die HCV-5'-NTR eingesetzt, um bei der Translationsinitiation beteiligte Faktoren zu identifizieren. Für eine effiziente Translation der HCV-RNA ist jedoch nicht nur die HCV-5'-NTR inklusive der IRES von Bedeutung, sondern auch die gleichzeitige Präsenz einer vollständigen HCV-3'-NTR mit exaktem 3'-Ende (Song et al., 2006). Nachteilig war in vorangehenden Studien auch die Kopplung der Affinitäts-Tags an das 5'-Ende der HCV-RNA, was in den meisten Fällen die Interaktion der miR-122 mit den nahe am 5'-Ende der HCV-NTR gelegenen Ziel-Sequenzen behinderte (Ji et al., 2004; Lu et al., 2004). Um den authentischen Ablauf der Bildung von Translationskomplexen zu gewährleisten, wurde in dieser Arbeit eine HCV-RNA verwendet, die die HCV-5'-NTR, einen verkürzten offenen Leserahmen von

96 Nukleotiden und die HCV-3'-NTR mit exaktem 3'-Ende enthält (Abb. 28A, vergleiche auch Kapitel II.4.1 Abb. 26E).

Die Biotinylierung der HCV-RNA erfolgte intern durch Zugabe von Biotin-gekoppelten Nukleotiden (Abb. 28B) oder durch Hybridisierung eines Biotin-gekoppelten DNA-Oligonukleotids an den verkürzten Leserahmen (Nukleotide 397 - 416) zwischen den HCV-NTRs (Abb. 28A), um eine mögliche Störung der Translation durch ein Affinitäts-Tag am 5'- oder 3'-Ende der HCV-RNA auszuschließen. Um die Bindung des DNA-Oligonukleotids an die HCV-RNA zu verstärken und die Spezifität der Hybridisierung für die Sequenz des Leserahmens zu erhöhen, wurden bei der Synthese des Biotin-gekoppelten Oligonukleotids neben Desoxyribonukleotiden auch vereinzelt sogenannte „locked nucleic acids“ (LNAs) eingebaut (Sequenz des DNA/LNA-Oligonukleotids siehe Kapitel V.3.2.1). LNAs sind Nukleotide, bei denen die C2- und C4-Atome der Ribose durch eine Sauerstoff-Methylen-Brücke verbunden sind. Die Nukleotide sind dadurch in der C3'-endo-Konformation arretiert und strukturell weniger flexibel und paaren mit RNA oder DNA mit erhöhtem Schmelzpunkt (Vester & Wengel, 2004; Grünweller & Hartmann, 2007).

Für die spätere Affinitäts-Reinigung der HCV-Translationskomplexe wurde das Biotin-Streptavidin-System verwendet (Diamandis & Christopoulos, 1991). Biotin (Vitamin H) kommt in geringen Mengen in allen Zellen vor und dient natürlicherweise als Kofaktor für die Enzyme der Fettsäuresynthese. Streptavidin, ein aus *Streptomyces avidinii* isoliertes Protein, hat vier hochaffine Bindestellen für Biotin. Die Bindung von Biotin und Streptavidin ist spezifisch, sensitiv und mit einer der höchsten Bindungskonstanten in der Natur sehr stabil, wodurch sich dieses System für Affinitäts-Reinigungen und Nachweisreaktionen gut eignet (Diamandis & Christopoulos, 1991; Holmberg et al., 2005).

### **5.1.1 Optimierung der Hybridisierung der HCV-RNA mit Biotin-gekoppelten DNA/LNA-Oligonukleotiden und Bindung biotinylierter HCV-RNA an Streptavidin-Beads**

Vor dem Einsatz des hier verwendeten Fisch-Systems für den Nachweis der Beteiligung von Proteinen an der HCV-Translationsstimulation durch miR-122 wurden verschiedene Versuche zur Optimierung der Hybridisierung der HCV-RNA mit Biotin-gekoppelten DNA/LNA-Oligonukleotiden (im weiteren zur vereinfachten Darstellung LNA-Oligonukleotide genannt) und der Bindung biotinylierter HCV-RNA an Streptavidin-Beads durchgeführt.

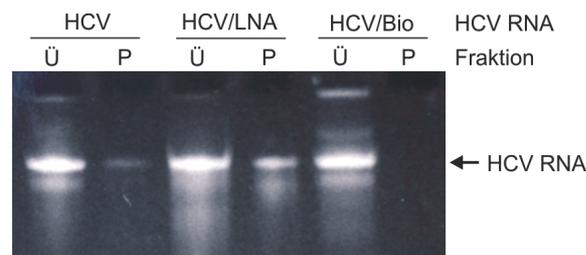
#### **5.1.1.1 Bindung von Biotin-gekoppelter und intern biotinylierter HCV-RNA an Streptavidin-Beads**

Die Herstellung biotinylierter HCV-RNA erfolgte zunächst durch Hybridisierung der HCV-RNA mit Biotin-gekoppelten LNA-Oligonukleotiden in einem molekularen Verhältnis von 1 : 1. Die intern biotinylierte HCV-RNA wurde durch Zugabe von Biotin-gekoppelten Cytidintriphosphaten (rCTPs)

zur Transkriptionsreaktion hergestellt, so dass im Optimalfall etwa 40% der in der HCV-RNA vorhandenen Cytosine biotinyliert waren. Die interne Biotinylierung der HCV-RNA wurde zunächst gering gehalten, um eine Störung der Bildung von Translationskomplexen durch die Biotinylierung zu vermeiden. Anschließend wurden die biotinylierten RNAs aufgereinigt, um noch frei vorliegende Biotin-Moleküle sowie sonstige Bestandteile der Transkriptionsreaktion zu entfernen.

Im Folgenden wurde die Bindung der biotinylierten HCV-RNA an die Streptavidin-Beads ohne vorherige Inkubation der HCV-RNA in RRL unter verschiedenen Pufferbedingungen getestet.

Die Streptavidin-Beads wurden in Bindungspuffer gewaschen, für 15 min equilibriert und anschließend pelletiert. Die Bindungsreaktion erfolgte durch Mischen der Beads mit der biotinylierten HCV-RNA im Bindungspuffer. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Beads pelletiert, der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit Bindungspuffer gewaschen und wie der Überstand in einem denaturierenden Probenpuffer aufgenommen. Nach dem Aufkochen der Proben zum Lösen der Biotin-Streptavidin-Bindung wurde die Bindung der biotinylierten HCV-RNA an die Beads über Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert (Abb. 29).



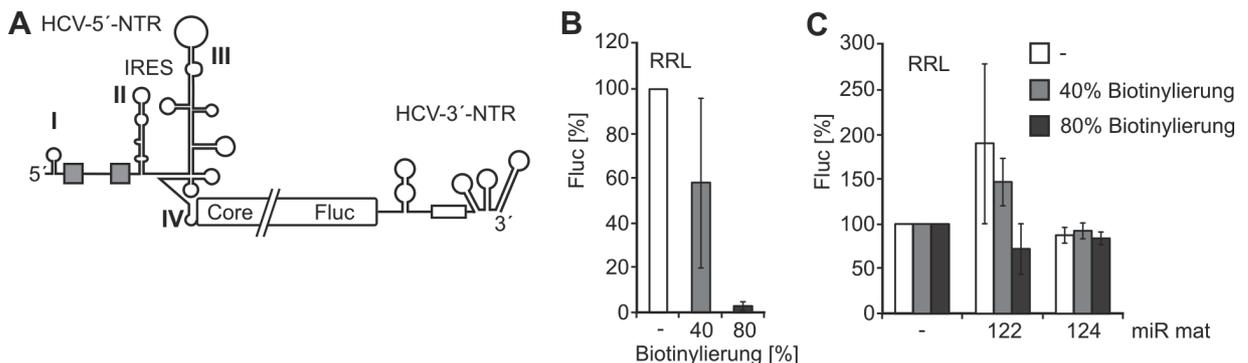
**Abbildung 29: Bindung von Biotin-gekoppelter und intern biotinylierter HCV-RNA an Streptavidin-Beads.** Nachweis der HCV-RNA in Überstand (Ü) und Pellet (P) nach Bindung an Streptavidin-Beads über denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese. HCV, HCVwtsin-RNA; HCV/LNA, HCVwtsin-RNA hybridisiert mit Biotin-gekoppeltem LNA-Oligonukleotid; HCV/Bio, intern biotinylierte HCVwtsin-RNA.

Unter Verwendung eines Tris-Puffers mit 500 mM Natriumchlorid (NaCl) als Bindungspuffer konnte die mit Biotin-gekoppelten LNA-Oligonukleotiden hybridisierte HCV-RNA (HCV/LNA) im Überstand aber auch im Pellet reproduzierbar nachgewiesen werden. Die intern biotinylierte RNA (HCV/Bio) verblieb dagegen vollständig im Überstand. Dies weist darauf hin, dass entweder die Biotinylierung während der Transkriptionsreaktion sehr ineffizient ist oder die internen Biotin-Moleküle durch die Struktur der HCV-RNA für eine Bindung an Streptavidinbeads nicht ausreichend zugänglich sind. Als Kontrolle wurde nicht biotinylierte HCV-RNA verwendet, die sich zu großen Teilen im Überstand befand, aber auch in geringen Mengen im Pellet sichtbar war, was zeigt, dass die HCV-RNA auch unspezifisch an die Beads bindet. Diese Versuche zeigen, dass die Hybridisierung der HCV-RNA mit einem Biotin-gekoppelten LNA-Oligonukleotid erfolgreich war und das HCV/LNA-Hybrid unter den oben genannten Pufferbedingungen an die Streptavidinbeads bindet. Weitere Optimierungs-Versuche waren jedoch notwendig, um die Effizienz der Hybridisierung und Bindung an die Beads zu verbessern.

### 5.1.1.2 Einfluss der internen Biotinylierung auf die Translationseffizienz der HCV-RNA und den Effekt der miR-122

Erste Versuche zur Bindung von biotinylierter HCV-RNA an Streptavidin-Beads zeigten, dass eine interne Biotinylierung mit einem theoretischen Anteil von 40 % an biotinylierten rCTPs in der HCV-RNA möglicherweise nicht ausreichend ist, um eine stabile Bindung der HCV-RNA an die Streptavidin-Beads zu vermitteln. Daher wurde die Möglichkeit der Verwendung einer stärker biotinylierten RNA geprüft.

Dazu wurde zunächst der Einfluss der internen Biotinylierung auf die Translationseffizienz der HCV-RNA und den stimulatorischen Effekt der miR-122 getestet. Es wurden dazu HCV-Reporter-RNAs mit einem theoretischen Biotinylierungsanteil von 40 % und 80 % der enthaltenen Cytosine hergestellt (Abb. 30A). Diese RNAs wurden in RRL *in vitro*-translatiert und die Translationseffizienz durch Messung der *Firefly*-Luziferase-Aktivität ermittelt. Abbildung 30B zeigt, dass die Biotinylierung die Translationseffizienz der HCV-RNA stark beeinflusst. Schon bei einer Biotinylierung von 40 % sank die durchschnittliche Translationseffizienz um 40 %. Bei einer Biotinylierung von 80 % war nur noch eine sehr geringe Translationsaktivität von etwa 5 % im Vergleich zu nicht biotinylierter RNA messbar.



**Abbildung 30: Translationseffizienz und microRNA-Effekt intern biotinylierter HCV-RNA.** (A) Intern biotinylierte HCV-Reporter-RNA mit Ziel-Sequenzen der miR-122 in der HCV-5'-NTR. (B) *Firefly*-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % nach *in vitro* Translation von unterschiedlich stark biotinylierten HCV-Reporter-RNAs in RRL; n=4. Die Messwerte aus Reaktionen mit nicht-biotinylierter HCV-Reporter-RNA wurden gleich 100 % gesetzt. (C) *Firefly*-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % nach *in vitro* Translation von unterschiedlich stark biotinylierten HCV-Reporter-RNAs in RRL in An- oder Abwesenheit von miR-122mat oder miR-124mat; n=4. Die Messwerte aus Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt.

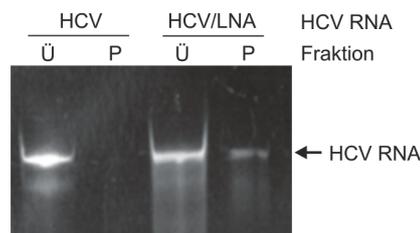
Abbildung 30C zeigt den Einfluss der Biotinylierung auf den stimulatorischen Effekt der miR-122mat auf die HCV-Translation. Für eine bessere Vergleichbarkeit des miR-Effektes wurden die Differenzen der generellen Translationseffizienzen der intern biotinylierten HCV-RNAs im Vergleich zu einer nicht biotinylierten RNA vernachlässigt und alle Messwerte aus Reaktionen ohne microRNA gleich 100 % gesetzt. Die Ergebnisse der Experimente zeigen, dass die Translation einer nicht-biotinylierten HCV-RNA wie in vorangehenden Versuchen durch Zugabe von miR-122mat stimuliert wird. Schon eine Biotinylierung der HCV-RNA von 40 % führt dagegen zu einer Verringerung der Stimulation. Die Biotinylierung von 80 % führt zu einem kompletten Verlust der Translationssteigerung durch

miR-122mat. Die Kontrolle miR-124mat hat keinen Effekt auf die Translationseffizienz der verwendeten RNAs.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine interne Biotinylierung sowohl die generelle Translationsaktivität der HCV-RNA als auch die stimulierende Wirkung der miR-122 auf die Translation stört. Eine stärkere Biotinylierung der HCV-RNA zur Bindung an Streptavidin-Beads würde daher zum Verlust der zu analysierenden Effekte führen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die intern biotinylierte HCV-RNA für folgende Versuche nicht weiter verwendet.

### 5.1.1.3 Optimierung der Bindung Biotin-gekoppelter HCV-RNA an Streptavidin-Beads durch Blocken unspezifischer RNA-Bindungen

In vorangehenden Versuchen wurde festgestellt, dass auch nicht-biotinylierte HCV-RNA unter den verwendeten Pufferbedingungen an die Streptavidin-Beads binden. Zum Blocken der unspezifischen Bindung der HCV-RNA an Streptavidin-Beads erfolgte daher die Equilibrierung der Beads unter Zugabe von Hefe tRNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) zum Bindungspuffer. Hefe tRNA wird häufig zum Blocken unspezifischer Nukleinsäurebindungen sowie als Präzipitationshilfe von Nukleinsäuren eingesetzt. Die anschließende Bindungsreaktion der HCV-RNA an die Beads erfolgte in Bindungspuffer ohne tRNA.



**Abbildung 31: Blocken unspezifischer RNA-Bindungen an Streptavidin-Beads mittels tRNA.** Nachweis der HCV-RNA in Überstand (Ü) und Pellet (P) nach Bindung an Streptavidin-Beads über denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese. HCV, HCVwtsin-RNA; HCV/LNA, HCVwtsin-RNA hybridisiert mit Biotin-gekoppeltem LNA-Oligonukleotid.

Abbildung 31 zeigt, dass durch eine Equilibrierung der Beads in Anwesenheit von tRNA die unspezifische Bindung der HCV-RNA verhindert werden kann. Während die biotinylierte HCV-RNA (HCV/LNA) auch im Pellet nachgewiesen werden konnte, war die nicht biotinylierte HCV-RNA im Gegensatz zu vorigen Versuchsansätzen ohne tRNA nur im Überstand vorhanden.

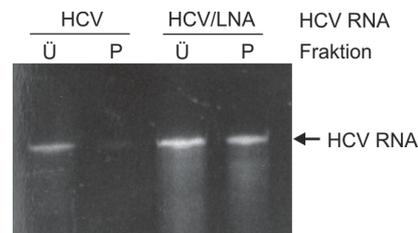
### 5.1.1.4 Bindung Biotin-gekoppelter HCV-RNA an Streptavidin-Beads bei physiologischen Kaliumchlorid-Konzentrationen

Der bis dahin verwendete Bindungs- und Waschpuffer für das Fischen des HCV/LNA-Hybrids enthielt hohe NaCl-Konzentrationen. Die hohe Konzentration von Chlorid-Ionen könnte bei späterer Zugabe zu Komplexbildungs-Reaktionen in RRL zur Dissoziation der an der HCV-RNA gebildeten

Translations-Komplexe oder assoziierten Faktoren führen. Daher wurden erneut die Pufferbedingungen für die Bindungsreaktion optimiert.

Die Untersuchungen von Holmberg et al. (2005) zu Elutionsbedingungen der Biotin-Streptavidin-Bindung ergaben, dass neben hohen Konzentrationen monovalenter Salze wie NaCl und KCl geringere Konzentrationen von 10 mM divalenter Salze wie Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ ) ausreichend sind, um die Biotin-Streptavidinbindung zu fördern und zu stabilisieren. Magnesiumchlorid wird außerdem häufig zum Stoppen von Translationsreaktionen verwendet, da es die Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten verhindert. Dies würde zusätzlich zu einer Stabilisierung der Translationskomplexe an der HCV-RNA bei der Aufreinigung über die Streptavidin-Beads führen.

Um die Salzkonzentration in allen Teilreaktionen des Experiments möglichst konstant zu halten und die Verwendung unterschiedlicher Puffer zu vermeiden, wurde im Folgenden ein Tris-Puffer mit 10 mM  $MgCl_2$  und einer physiologischen KCl-Konzentration von 130 mM wie in *in vitro* Translationsreaktionen als Bindungspuffer verwendet.



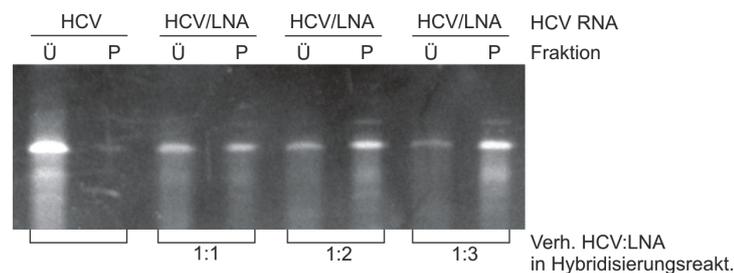
**Abbildung 32: Bindung von Biotin-gekoppelter HCV-RNA an Streptavidin-Beads unter physiologischen Kaliumchlorid-Konzentrationen.** Nachweis der HCV-RNA in Überstand (Ü) und Pellet (P) nach Bindung an Streptavidin-Beads über denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese. HCV, HCVwtsin-RNA; HCV/LNA, HCVwtsin-RNA hybridisiert mit Biotin-gekoppeltem LNA-Oligonukleotid.

Abbildung 32 zeigt, dass die biotinylierte HCV-RNA (HCV/LNA) unter diesen Pufferbedingungen im Gegensatz zu nicht biotinylierter HCV-RNA spezifisch an die Streptavidin-Beads gebunden werden kann. Die Zugabe von tRNA bei der Equilibrierung der Beads führte auch unter diesen Bedingungen zu einer effizienten Blockierung unspezifischer Bindung der HCV-RNA an die Beads.

#### 5.1.1.5 Optimierung des HCV-RNA/LNA-Oligonukleotid-Verhältnisses bei der Hybridisierung

Nach der Optimierung der Pufferbedingungen für die Bindung der biotinylierten HCV-RNA an die Streptavidinbeads konnte trotzdem ein erheblicher Teil ungebundener HCV-RNA im Überstand der Bindungsreaktion detektiert werden. Es wurde vermutet, dass dies durch eine ineffiziente Hybridisierung der HCV-RNA mit dem Biotin-gekoppelten LNA-Oligonukleotid hervorgerufen wird. Zur Optimierung der Hybridisierung wurden unterschiedliche Verhältnisse von HCV-RNA und LNA-Oligonukleotid in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt und anschließend die Bindung der RNA an die Streptavidinbeads unter optimierten Pufferbedingungen getestet.

Der Einsatz von HCV-RNA und Biotin-gekoppeltem LNA-Oligonukleotid in einem Verhältnis von 1 : 1 führte wie erwartet zu einem Verbleib eines Großteils der nicht hybridisierten HCV-RNA im Überstand (Abb. 33). Mit dem Einsatz steigender Mengen LNA-Oligonukleotid konnte die Effizienz der Hybridisierung und damit die Bindung der HCV-RNA an die Streptavidinbeads stark verbessert werden. Bei einem Verhältnis von 1 : 3 von HCV-RNA und Biotin-gekoppeltem LNA-Oligonukleotid in der Hybridisierungsreaktion konnte der Großteil der HCV-RNA an die Beads gebunden werden, wobei nur ein geringer Teil ungebundener RNA im Überstand verblieb. Als Kontrolle für die Spezifität der Bindung diente wie in vorigen Experimenten eine nicht-biotinylierte HCV-RNA, die nicht an die Beads gebunden wurde.



**Abbildung 33: Optimierung des HCV-RNA/LNA-Oligonukleotid-Verhältnisses bei der Hybridisierung.** Nachweis der HCV-RNA in Überstand (Ü) und Pellet (P) nach Bindung an Streptavidin-Beads über denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese. HCV, HCVwtsin-RNA; HCV/LNA, HCVwtsin-RNA hybridisiert mit Biotin-gekoppeltem LNA-Oligonukleotid.

Diese Experimente zeigten, dass ein Überschuss an LNA-Oligonukleotiden in der Hybridisierungsreaktion notwendig ist, um eine vollständige Biotinylierung der HCV-RNA und damit eine effiziente Bindung der HCV-RNA an die Streptavidin-Beads zu erzielen.

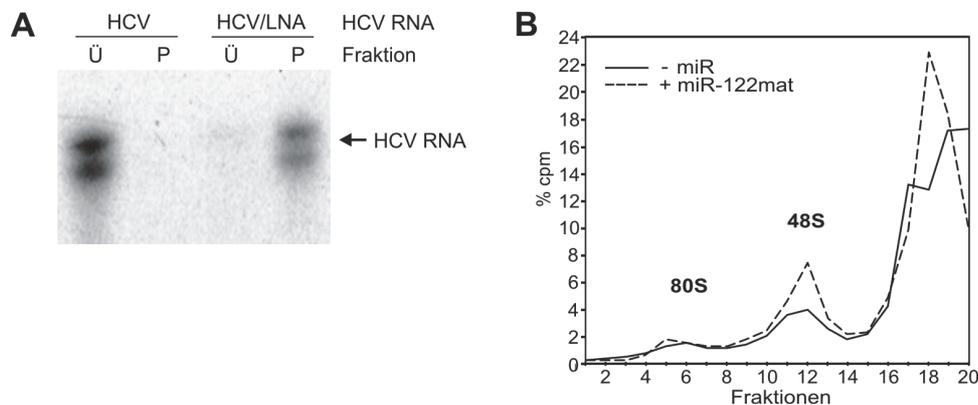
#### 5.1.1.6 Zusammenfassung

Versuche zur Optimierung der Bindung von biotinylierter HCV-RNA an Streptavidin-Beads ergaben, dass die interne Biotinylierung der HCV-RNA durch Einsatz von Biotin-gekoppelten Nukleotiden in der Transkriptionsreaktion für das Fischen von HCV-Translationskomplexen nicht geeignet ist. Eine mit Biotin-gekoppelten LNA-Oligonukleotiden hybridisierte HCV-RNA konnte dagegen durch Verwendung eines optimierten Bindungspuffers mit 130 mM KCl und 10 mM MgCl<sub>2</sub> spezifisch an die Beads gebunden werden. Unspezifische Bindungen der HCV-RNA an die Beads konnten durch Equilibrierung der Beads in Anwesenheit von Hefe tRNA (1 µg/µl) verhindert werden. Des Weiteren wurde die Effizienz der Hybridisierung der HCV-RNA mit dem Biotin-gekoppelten LNA-Oligonukleotid durch den Einsatz eines Überschusses an LNA-Oligonukleotiden in der Hybridisierungs-Reaktion stark verbessert. Folglich konnte die mittels Biotin-gekoppelten LNA-Oligonukleotiden biotinylierte HCV-RNA spezifisch und effizient an Streptavidin-Beads gebunden werden und sollten daher zur Isolierung von HCV-Translationskomplexen aus RRL eingesetzt werden.

### 5.1.2 Nachweis der Bildung von Translations-Initiationskomplexen und microRNA-Effekt mit Biotin-gekoppelter HCV-RNA

In vorangehenden Experimenten hatten Translationsexperimente in RRL mit intern biotinylierter HCV-RNA gezeigt, dass die Biotinylierung sowohl die Translationseffizienz der RNA als auch den Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation stark beeinträchtigt. Im Folgenden wurde daher die Bildung von Translations-Initiationskomplexen an der mit LNA-Oligonukleotiden hybridisierten HCV-RNA durch Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation untersucht.

Dazu wurden radioaktiv [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-markierte HCV-RNAs hergestellt, die anschließend wie oben beschrieben mit Biotin-gekoppelten LNA-Oligonukleotiden hybridisiert wurden. Der Erfolg der Hybridisierung wurde durch Ermittlung der Bindungseffizienz des HCV/LNA-Hybrids wie in Kapitel 5.1.1 beschrieben unter optimierten Reaktionsbedingungen geprüft. Der Nachweis der HCV-RNA erfolgte durch Autoradiographie.



**Abbildung 34: Nachweis der Bildung von Translations-Initiationskomplexen und miR-Effekt mit Biotin-gekoppelter HCV-RNA.** (A) Nachweis der HCV-RNA in Überstand (Ü) und Pellet (P) nach Bindung an Streptavidin-Beads über denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese. HCV, HCVwtsin-RNA; HCV/LNA, HCVwtsin-RNA hybridisiert mit Biotin-gekoppeltem LNA-Oligonukleotid. (B) Bildung von 48S- und 80S-Komplexen mit Biotin-gekoppelter HCV-RNA in RRL in Anwesenheit von Anisomycin, in An- oder Abwesenheit von miR-122mat; n=2.

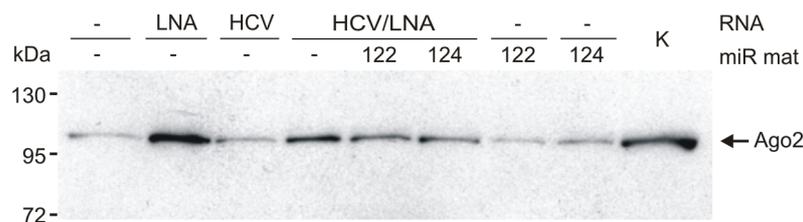
Abbildung 34A zeigt, dass die biotinylierte HCV-RNA fast vollständig an die Beads gebunden und mit diesen pelletiert wurde, während nicht-biotinylierte HCV-RNA nur im Überstand nachweisbar war. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die HCV-RNA fast vollständig mit dem biotinylierten LNA-Oligo assoziiert war.

Die Analyse der Translationskomplex-Bildung an der Biotin-gekoppelten RNA in RRL erfolgte anschließend wie in Kapitel II.4.1 beschrieben. Aus den resultierenden Gradientenprofilen in Abbildung 34B geht hervor, dass sowohl in An- als auch in Abwesenheit von miR-122mat ribosomale 48S- und 80S-Komplexe an der mit Biotin-gekoppelten LNA-Oligonukleotiden hybridisierten HCV-RNA gebildet werden und dass die miR-122mat wie in vorangehenden Versuchen die Bildung der 48-Komplexe fördert.

### 5.1.3 Nachweis von Ago2-Proteinen in aus RRL isolierten HCV-Translations-Initiationskomplexen

Nach der Optimierung der Bindung von biotinylierter HCV-RNA an Streptavidin-Beads wurde dieses System eingesetzt, um die Beteiligung von Ago2-Proteinen an der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 zu untersuchen.

Um eine bessere Effizienz der Isolierung von HCV-Translationskomplexen zu erzielen, wurde die biotinylierte HCV-RNA vor der Komplexbildungs-Reaktion in RRL wie zuvor beschrieben an die Streptavidin-Beads gebunden. Die an Beads gebundene HCV-RNA wurde in einer Komplexbildungs-Reaktion in Anwesenheit des Elongationsinhibitors Cycloheximid und in An- oder Abwesenheit von microRNA in RRL inkubiert. Danach wurden die Beads pelletiert und in Bindungspuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Dissoziation der Biotin-Streptavidin-Bindung durch Aufnahme der Beads in bidestilliertem Wasser und Aufkochen der Proben in denaturierendem Probenpuffer (Holmberg et al., 2005). Nach erneutem Pelletieren der Beads wurde der Überstand, der die HCV-RNA und die damit komplexierten Faktoren enthielt, für den Nachweis von Ago2-Proteinen über SDS-PAGE und Western Blot verwendet.



**Abbildung 35: Nachweis von Ago2-Proteinen in HCV-Translations-Initiationskomplexen.** Western Blot gegen Ago2 nach der Isolierung von HCV-Translations-Initiationskomplexen aus RRL mittels Streptavidin-Beads. Allen Reaktionen wurden Beads zugegeben. Die Inkubation erfolgte in Anwesenheit des Elongationsinhibitors Cycloheximid. -/-, ohne RNA; LNA/- mit Biotin-gekoppeltem LNA-Oligonukleotid; HCV/LNA/-,122,124, mit Biotin-gekoppelter HCV-RNA in An- oder Abwesenheit von miR-122mat oder miR-124mat; -/122, mit miR-122mat; -/124 mit miR-124mat; K, nur RRL.

Im Western Blot konnte in allen Spuren wie in der Kontrollspur (K, nur RRL) eine einzelne Bande in der Laufhöhe von etwa 100 kDa detektiert werden, was der Größe des Ago2-Proteins entspricht. Ago2 konnte auch in Reaktionsansätzen ohne HCV-RNA und microRNA (-/-) sowie in Ansätzen mit nicht-biotinylierter HCV-RNA (HCV/-) und bei der alleinigen Zugabe von miR-122mat (-/122) oder miR-124mat (-/124) in geringen Mengen nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass Ago2 in geringem Maße, trotz Blocken der Beads mit tRNA und BSA (Bovines Serumalbumin), unspezifisch bindet.

In Reaktionen mit Biotin-gekoppelter HCV-RNA (HCV/LNA) konnten stärkere Banden detektiert werden, was zunächst auf eine Assoziation von Ago2-Proteinen mit der an die Beads gebundenen HCV-RNA hindeutet. Ago2 konnte jedoch in Reaktionen mit HCV-RNA durch Zugabe von miR-122mat nicht angereichert werden (HCV/LNA/122). Stattdessen war in Anwesenheit von miR-122mat und miR-124mat (HCV/LNA/122 oder 124) im Vergleich zu Reaktionen ohne microRNA (HCV/LNA/-) weniger Ago2-Protein nachweisbar. Unerwartet war auch das Ergebnis einer Kontroll-Reaktion in der an Beads gekoppelte LNA-Oligonukleotide in Komplexbildungs-Reaktionen

eingesetzt wurden (LNA/-). Die Detektion einer starken Ago2-Bande nach dieser Reaktion zeigte, dass Ago2-Proteine auch in Abwesenheit von HCV-RNA oder microRNAs in RRL effizient an das für die Biotinylierung verwendete LNA-Oligonukleotid binden. Dies bedeutet, dass die erhöhte Detektion von Ago2 in Reaktionsansätzen mit biotinylierter HCV-RNA wahrscheinlich nicht durch eine Assoziation von Ago2-Proteinen mit HCV-Translationskomplexen zustande kommt, sondern durch Bindung von Ago2 an Biotin-gekoppelte LNA-Oligonukleotide hervorgerufen wird. Trotz intensiver Aufreinigung der HCV/LNA-Hybride nach der Hybridisierungsreaktion und weiteren Optimierungs-Versuchen (nicht gezeigt) war im Folgenden eine eindeutige Unterscheidung der Bindung von Ago2 an die LNA-Oligonukleotide und Assoziation von Ago2 mit HCV-Translationskomplexen nicht möglich. Daher ist dieser experimentelle Ansatz für die Untersuchung der Beteiligung von Ago2 an der HCV-Translationsstimulation durch miR-122 in RRL letztlich nicht geeignet.

## **5.2 Analyse der Kosedimentation von Ago2-Proteinen mit HCV-Translations-Initiationskomplexen in Sucrose-Dichtegradienten**

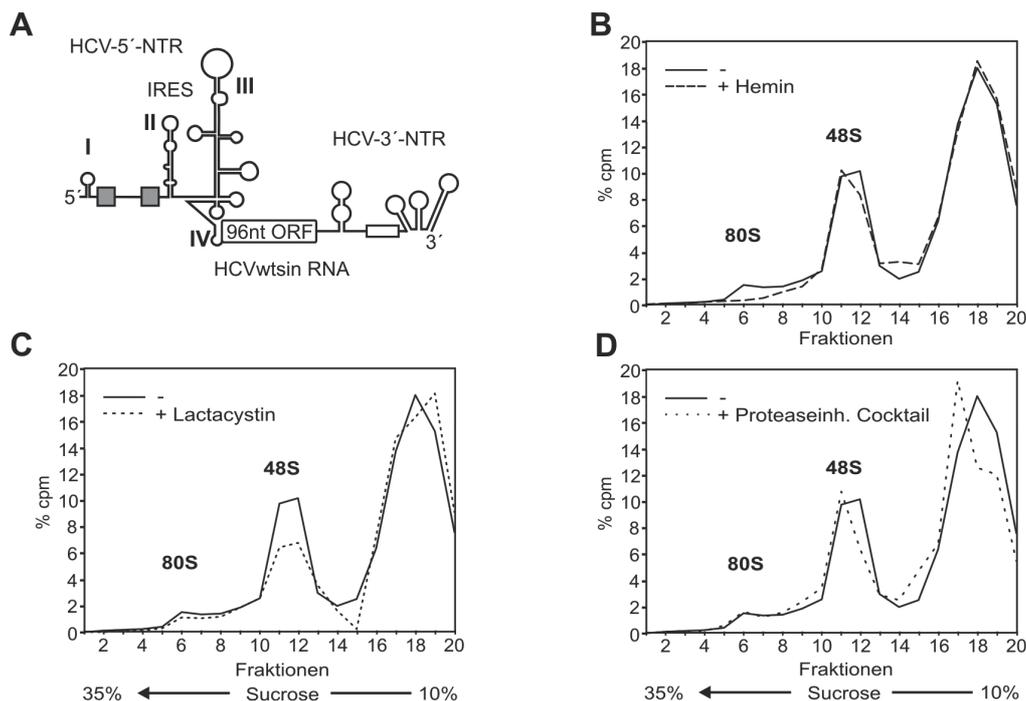
Der obige Versuch des Nachweises von Ago2-Proteinen in HCV-Translations-Initiationskomplexen in Anwesenheit von miR-122 nach Aufreinigung der Komplexe aus RRL zeigte, dass Ago2 an das verwendete Biotin-gekoppelte LNA-Oligonukleotid bindet. Dieser Versuchsansatz eignete sich daher nicht, um die Beteiligung von Ago2-Proteinen an der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 zu untersuchen.

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Beteiligung von bestimmten Proteinen an der Bildung von Translationskomplexen ist der Nachweis der Kosedimentation des Proteins mit Translationskomplexen in Sucrose-Dichtegradienten. Dazu werden die an einer radioaktiv-markierten RNA gebildeten Translationskomplexe mittels Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt und durch Erstellung eines Gradientenprofils wie in Kapitel II.4.1 beschrieben analysiert. Anschließend erfolgt die Fällung der Proteine aus den Gradienten-Fractionen und der Nachweis über Western Blot. Ein Abgleich des Gradientenprofils mit dem Ergebnis des Western Blots gibt einen Hinweis darauf, ob das zu untersuchende Protein mit den gebildeten Translationskomplexen assoziiert ist. Im Anschluss kann dann die Interaktion des Proteins mit den Translationskomplexen genauer charakterisiert werden. Beispielsweise kann durch UV-Crosslink der radioaktiv markierten RNA nach der Komplexbildungs-Reaktion die Interaktion des Proteins mit der RNA während der Bildung der Translationskomplexe nachgewiesen werden. Diese Methode wurde in früheren Studien erfolgreich für die Charakterisierung der Rolle von PTB und eIF4B bei der Translationsinitiation des FMDV und Poliovirus angewendet (Niepmann et al., 1997; Ochs et al., 1999; Ochs et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde im Folgenden die Assoziation von Ago2-Proteinen mit HCV-Translations-Initiationskomplexen in Anwesenheit von miR-122 mittels Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation analysiert.

### 5.2.1 Optimierung der Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation in Anwesenheit von Proteasom- und Protease-Inhibitoren

In früheren Untersuchungen zum Nachweis bestimmter Proteine in Translationskomplexen über Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurde festgestellt, dass Proteine aus RRL bei der Dichtegradienten-Zentrifugation durch Kosedimentation von Proteasen und Proteasomen verstärkt degradiert werden (Niepmann et al., 1997; Ochs et al., 1999; Ochs et al., 2002). Es erfolgte daher die Zugabe von Proteasom-Inhibitoren wie Hemin und Lactacystin zur Komplexbildungs-Reaktion, um den Abbau der Proteine zu verhindern.



**Abbildung 36: Optimierung der Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation in Anwesenheit von Proteasom- und Protease-Inhibitoren.** (A) Radioaktiv markierte HCVwtsin-RNA mit Ziel-Sequenzen der miR-122 in der HCV-5'-NTR. (B) Bildung von 48S- und 80S- Komplexen mit der HCVwtsin-RNA in Anwesenheit des Eolngationsinhibitors Cycloheximid und in An- oder Abwesenheit von Hemin. (C) Wie (B), nur in An- oder Abwesenheit von Lactacystin. (D) Wie (B), nur in An- oder Abwesenheit von Proteaseinhibitor-Cocktail.

Da die Möglichkeit bestand, dass die Zugabe verschiedener Inhibitoren zur Komplexbildungs-Reaktion einen Einfluss auf die Effizienz der Bildung von HCV-Translationskomplexen hat, wurde dies zuvor getestet. Dazu wurde radioaktiv markierte HCV-RNA hergestellt (Abb. 36A), die in An- oder Abwesenheit der verschiedenen Inhibitoren in Komplexbildungs-Reaktionen in RRL inkubiert wurde. Anschließend wurde die Bildung der Translations-Initiationskomplexe über Sucrose-Gradienten-Zentrifugation analysiert.

Die resultierenden Gradientenprofile zeigten, dass Hemin keinen Einfluss auf die Bildung der 48S-Komplexe hat, jedoch auf die Formation der 80S-Komplexe inhibierend wirkt (Abb. 36B). In Anwesenheit von Lactacystin hingegen konnte eine Reduktion der 48S-Komplexe beobachtet werden (Abb. 36C). Zusätzlich wurde der vielseitig zur Inhibition von Proteasen eingesetzte Protease-

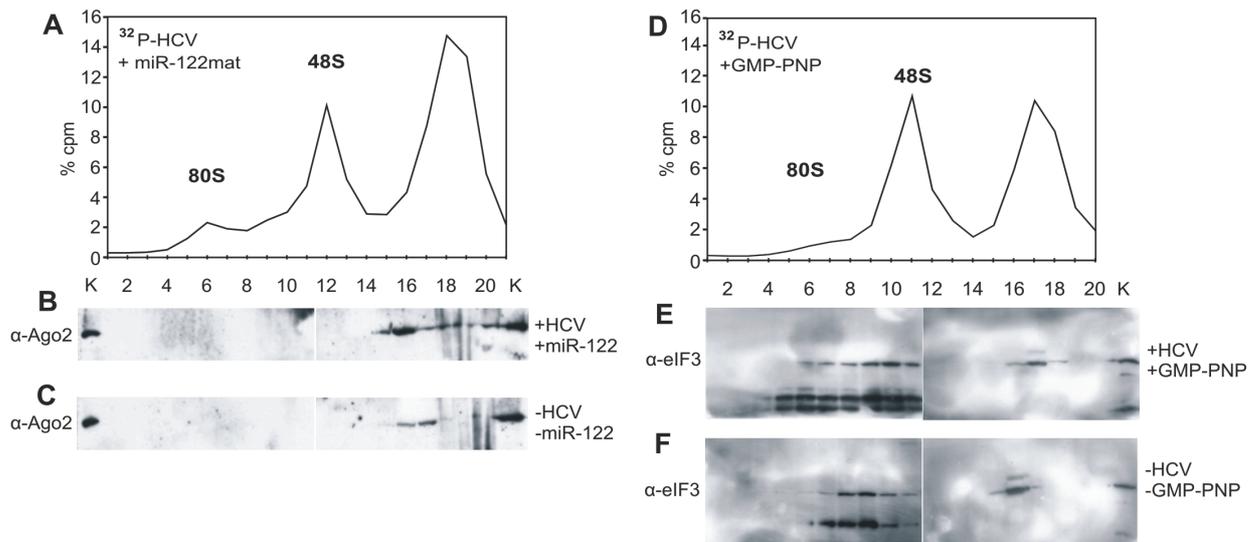
Inhibitor-Cocktail der Firma Roche getestet, der keinen Effekt auf die Bildung von HCV-Translations-Initiationskomplexen zeigte (Abb. 36D).

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die verwendeten Proteasom-Inhibitoren Hemin und Lactacystin die Bildung von HCV-Translationskomplexen beeinflussen und daher nicht zur Komplexbildungs-Reaktion zugegeben werden sollten. Um eine Störung der Komplexbildung zu vermeiden, aber dennoch die Degradation der Proteine während der Gradienten-Zentrifugation zu verhindern, wurden die Inhibitoren in folgenden Versuchen nach der Inkubation der Komplexbildungs-Reaktion zugesetzt. Außerdem waren die Inhibitoren in den Sucrose-Lösungen zur Herstellung der Gradienten enthalten.

### **5.2.2 Nachweis der Kosedimentation von Ago2 mit HCV-Translations-Initiationskomplexen in Sucrose-Dichtegradienten**

Zur Analyse der Kosedimentation von Ago2-Proteinen mit HCV-Translations-Initiationskomplexen in Sucrose-Dichtegradienten wurden Komplexbildungs-Reaktionen mit radioaktiv markierter HCV-RNA und miR-122mat parallel mit Reaktionen ohne HCV-RNA und ohne miR-122mat in Sucrose-Gradienten aufgetrennt. Ein kleiner Teil jeder Fraktion der Gradienten wurde wie in Kapitel II.4.1 beschrieben zur Lokalisation der Translationskomplexe und Erstellung eines Gradientenprofils verwendet. Aus dem Großteil jeder Fraktion der Gradienten wurden die Proteine mittels Trichloressigsäure (TCA) gefällt und danach über SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von Ago2 in den einzelnen Fraktionen der Gradienten erfolgte anschließend über Western Blot.

Die Gradientenprofile der Auftrennung von Translationskomplexen in Anwesenheit von HCV-RNA und miR-122mat (+<sup>32</sup>P-HCV/+miR-122mat) zeigten einen typischen Verlauf (Abb. 37A). Der in Fraktionen 5 - 7 detektierte Peak repräsentiert die schneller sedimentierenden 80S-Komplexe, während der Peak in Fraktionen 10 - 14 den langsamer sedimentierenden 48S-Komplexen entspricht. Nicht mit ribosomalen Untereinheiten assoziierte HCV-RNA war in Fraktionen 17 - 20 nachweisbar. Abbildungen 37B und C zeigen die Verteilung von Ago2-Proteinen in Fraktionen der Gradienten mit HCV-RNA und miR-122mat (Abb. 37B; +HCV/+miR-122) und parallel zentrifugierter Gradienten ohne Zugabe von HCV-RNA und miR-122mat (Abb. 37C; -HCV/-miR-122). Ago2-Proteine konnten weder in Fraktionen der 80S-Komplexe (5 - 7) noch in Fraktionen entsprechend der 48S-Komplexe (10 - 14) nachgewiesen werden, sondern waren nur in Fraktionen 16 - 20, die nicht mit ribosomalen Untereinheiten assoziierte RNA und Proteine enthalten, detektierbar. In Wiederholungs-Experimenten konnten teilweise geringe Mengen Ago2 in 48S- und 80S-Fraktionen nachgewiesen werden, was aber nicht in Korrelation mit der An- oder Abwesenheit von HCV-RNA oder miR-122mat gesetzt werden konnte. Die Ergebnisse ließen zunächst vermuten, dass Ago2-Proteine nicht mit ribosomalen Untereinheiten assoziiert sind und auch durch Anwesenheit von miR-122 nicht in HCV-Translations-Initiationskomplexen angereichert werden können.



**Abbildung 37: Nachweis der Kosedimentation von Ago2 und eIF3 mit HCV-Translations-Initiationskomplexen in Sucrose-Dichtegradienten.** (A) Bildung der 48S- und 80S-Komplexe mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-markierter HCVwsin-RNA in Anwesenheit von miR-122mat und dem Elongationsinhibitor Cycloheximid. (B) Western Blot gegen Ago2 nach Fällung der Proteine aus Sucrose-Gradientenfraktionen einer Komplexbildungs-Reaktion in Anwesenheit von HCV-RNA, miR-122mat und Cycloheximid. (C) Wie (B), aber in Abwesenheit der HCV-RNA und miR-122mat. (D) Wie (A), aber ohne miR-122mat und in Anwesenheit des Inhibitors GMP-PNP. (E) Western Blot gegen eIF3 nach Fällung der Proteine aus Sucrose-Gradientenfraktionen einer Komplexbildungs-Reaktion in Anwesenheit von HCV-RNA und GMP-PNP. (F) Wie (E), aber in Abwesenheit von HCV-RNA und GMP-PNP.

Als Kontrolle diente der Nachweis der Anreicherung des eukaryotischen Translations-Initiationsfaktors 3 (eIF3) in 48S-Komplexen durch Zugabe des Translationsinhibitors GMP-PNP. Die Durchführung des Experiments erfolgte wie oben beschrieben, außer dass die entsprechenden Komplexbildungs-Reaktionen ohne microRNA in An- oder Abwesenheit von HCV-RNA und GMP-PNP inkubiert wurden.

Im Gradientenprofil der Komplexbildungs-Reaktionen mit HCV-RNA und GMP-PNP konnten anschließend aufgrund der verhinderten Anlagerung der ribosomalen 60S-Komplexe durch den Inhibitor GMP-PNP wie erwartet keine 80S-Komplexe aber ein erhöhter Peak entsprechend der 48S-Komplexe in Fraktionen 9 - 13 detektiert werden (Abb. 37D).

Bei einem Vergleich der Western Blots in Abbildungen 37E und F gegen die Untereinheit p110 von eIF3 nach Gradienten-Zentrifugation fällt zunächst auf, dass der Faktor zum größten Teil degradiert war. Die Kontrollbanden zeigen, dass dies nicht allein eine experimentelle Ursache hat, sondern dass die Untereinheit p110 in RRL teilweise schon degradiert vorliegt, was aber offensichtlich die Funktionalität des Translationssystems nicht beeinträchtigt. Wie schon in früheren Studien beobachtet kam es während der Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation zusätzlich zu einer verstärkten Degradation des eIF3 p110 (Niepmann et al., 1997), die in diesem Fall auch durch den Einsatz von Proteasom- und Protease-Inhibitoren nicht verhindert werden konnte.

Dennoch zeigen die Resultate, dass eIF3 p110 in An- und Abwesenheit von HCV-RNA und GMP-PNP nur in geringen Mengen in Fraktionen freier RNA und Proteinen (Fraktionen 15 - 18) nachweisbar ist, während ein Großteil von eIF3 p110 in beiden Gradienten mit Translationskomplexen

kosedimentiert (Fraktionen 6 - 12). Dies lässt vermuten, dass eIF3 in RRL generell mit ribosomalen Untereinheiten assoziiert vorliegt. Weiterhin zeigt der Vergleich der Western Blots in Abb. 37E und F, dass eIF3 durch Zugabe von HCV-RNA und GMP-PNP in Fraktionen entsprechend der Translations-Initiationskomplexe angereichert und verstärkt nachgewiesen werden kann.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass durch diese Methode generell eine Kosedimentation und Anreicherung von Proteinen in Translationskomplexen detektiert werden kann. Durch die starke Degradation des eIF3 p110 kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass geringe Mengen Ago2 in HCV-Translations-Initiationskomplexen durch Abbau des Proteins nicht detektierbar waren. Folglich kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob Ago2 in Anwesenheit von miR-122 in RRL mit HCV-Translations-Initiationskomplexen assoziiert ist.

### 5.3 Diskussion

Zur Untersuchung der Beteiligung von Ago2-Proteinen wurde zunächst eine „Fisch-Methode“ entwickelt, mit der es möglich sein sollte, HCV-Translationskomplexe aus RRL zu isolieren und die enthaltenen Proteine mittels Western Blot oder Massenspektrometrie nachzuweisen. Dieser Ansatz wurde gewählt, um sowohl Proteine detektieren zu können, die durch Anwesenheit der miR-122 direkt mit der HCV-RNA interagieren, als auch Proteine nachweisen zu können, die durch miR-122 über Protein-Protein-Interaktionen verstärkt mit den HCV-Translationskomplexen assoziiert sind. Zum Fischen der HCV-Translationskomplexe mittels Streptavidin-Beads wurde die HCV-RNA durch Hybridisierung mit einem Biotin-gekoppelten DNA/LNA-Oligonukleotid biotinyliert. Die Methode konnte durch Vorversuche zunächst erfolgreich etabliert und optimiert werden. Eine Kontrollreaktion mit dem verwendeten DNA/LNA-Oligonukleotid beim anschließenden Nachweis von Ago2-Proteinen in HCV-Translations-Initiationskomplexen mittels Western Blot zeigte, dass Ago2-Proteine sehr effizient an das Biotin-gekoppelte DNA/LNA-Oligonukleotid binden. Auch nach intensiver Reinigung der Biotin-gekoppelten HCV-RNA konnte nicht sicher bestimmt werden, ob die detektierten Proteinbanden durch Assoziation mit HCV-Translationskomplexen oder mit dem Biotin-gekoppelten DNA/LNA-Oligo hervorgerufen werden.

Dass Ago2-Proteine in RRL auch DNA-Oligonukleotide binden, ist ein zunächst unerwartetes Ergebnis, da in der Literatur für Ago-Proteine aus eukaryontischen Zellen bisher nur die Assoziation mit kleinen RNAs beschrieben wurde. Durch biochemische Analysen von mit eukaryotischen Ago-Proteinen verwandten Proteinen aus Prokaryonten wurde jedoch gezeigt, dass ursprüngliche Argonaute-Proteine möglicherweise wie Proteine der RNase H-Familie die Spaltung von RNA-DNA-Hybriden katalysieren und mit DNA-Oligonukleotiden zur Identifizierung von Ziel-mRNAs interagieren (Yuan et al, 2005). Es wird vermutet, dass im Laufe der Evolution eine Spezialisierung der Agos auf die Bindung von RNA-Oligonukleotiden und Spaltung von RNA-Doppelsträngen stattfand (Hutvagner & Simard, 2008), was aber die Fähigkeit der Bindung an DNA-Oligonukleotide nicht ausschließt. Des Weiteren enthält das Biotin-gekoppelte Oligonukleotid LNAs, die unter

anderem auch zur Stabilisierung von siRNAs in RNAi-Experimenten eingesetzt werden (Elmen et al., 2005). Einige Studien beschreiben, dass die Funktionalität der siRNAs durch Einbau von LNAs erhalten bleibt, was theoretisch eine Interaktion mit Ago-Proteinen erfordert, wobei ein direkter Nachweis der Bindung der modifizierten Oligonukleotide an Ago-Proteine bisher fehlt (Elmen et al., 2005).

Da wahrscheinlich ist, dass nicht nur Ago2-Proteine, sondern auch andere Ago-Proteine an das verwendete DNA/LNA-Oligonukleotid binden, ist die anfangs vielversprechende Fisch-Methode für die Untersuchung der Beteiligung von miR-122-assoziierten Proteinen am stimulatorischen Effekt auf die HCV-Translation in RRL nicht verwendbar. Diese technischen Schwierigkeiten könnten möglicherweise durch die Verwendung eines anderen Tags umgangen werden. Eine Möglichkeit wäre dabei die Verwendung eines spezifisch an Streptomycin bindenden RNA-Aptamers (Bachler et al., 1999; Locker et al., 2006; Windbichler & Schroeder; 2006), welches in den verkürzten offenen Leserahmen der HCV-RNA kloniert werden könnte. Dabei müsste allerdings in Vorversuchen die Funktionalität des Aptamers durch korrekte Faltung und die Zugänglichkeit für die Bindung an Streptomycin in HCV-Translationskomplexen getestet werden. Auch die Bindung von Ago-Proteinen oder anderen zellulären Faktoren an das Aptamer müsste zuvor geprüft werden. Der Vorteil eines solchen Tags wäre eine vereinfachte Herstellung der getagten HCV-RNA in größeren Mengen, da aufwendige Reinigungsschritte zur Entfernung nicht gebundener Tags entfallen. Bei einer hohen Transfektionseffizienz der Aptamer-getagten HCV-RNA wäre dann eventuell auch eine Aufreinigung von HCV-Translationskomplexen aus intakten Zellen möglich.

In einem weiteren experimentellen Ansatz zum Nachweis der Beteiligung von Ago2-Proteinen an dem stimulatorischen Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation wurde die Kosedimentation von Ago2-Proteinen mit HCV-Translations-Initiationskomplexen in Sucrose-Dichtegradienten untersucht. Während der Translationsinitiations-Faktor 3 (eIF3) durch Zugabe von stadienspezifischen Translationsinhibitoren in Fraktionen der HCV-Translationskomplexe angereichert werden konnte, konnten auch in Anwesenheit von miR-122 keine Ago2-Proteine in entsprechenden Fraktionen detektiert werden. Dies lässt zunächst vermuten, dass Ago2-Proteine nicht an der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in RRL beteiligt sind. Obwohl in Western Blots gegen Ago2 keine Degradation der Proteine sichtbar war, kann aufgrund der starken Degradation des eIF3 nach der Gradienten-Zentrifugation nicht ausgeschlossen werden, dass eine Detektion von geringeren Mengen Ago2 in HCV-Translations-Initiationskomplexen durch Abbau der Proteine verhindert wird. Über den Einsatz der verwendeten Protease- und Proteasom-Inhibitoren hinaus, gibt es keine weiteren technischen Möglichkeiten, die Degradation von Proteinen in den Gradienten durch kosedimentierende Proteasen und Proteasomen zu verhindern. Folglich kann aus den hier erzielten Ergebnissen keine eindeutige Aussage über eine Beteiligung von Ago2-Proteinen an der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in RRL getroffen werden.

In parallel durchgeführten Arbeiten konnte der Mechanismus der HCV-Translationsstimulation durch miR-122 in RRL wie im folgenden Kapitel beschrieben weitestgehend aufgeklärt werden, weshalb die hier gewählten Ansätze zum Nachweis der am miR-Effekt beteiligten Proteine in RRL letztlich nicht weiter verfolgt wurden.

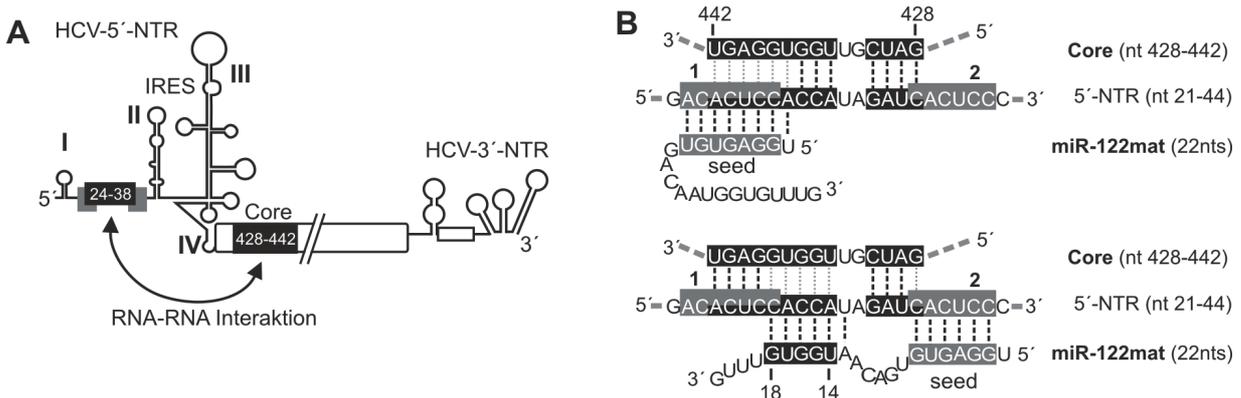
#### **5.4 Fazit**

Die Untersuchung der Beteiligung von Proteinen an der Stimulation der HCV-Translation durch Isolierung von HCV-Translations-Initiationskomplexen aus RRL über Streptavidin-Beads zeigte, dass Ago2-Proteine auch an die zur Biotinylierung der HCV-RNA verwendeten DNA/LNA-Oligonukleotide binden. Diese Methode eignet sich daher nicht zum differentiellen Nachweis der Beteiligung von Ago-Proteinen bei der Regulation der HCV-Translation durch miR-122 in RRL. Auch durch die Untersuchung der Kosedimentation von Ago2 mit HCV-Translations-Initiationskomplexen in Sucrose-Dichtegradienten konnte eine Beteiligung von Ago2 an der Regulation der HCV-Translation durch miR-122 in RRL nicht eindeutig ausgeschlossen werden.

## 6 microRNA-122 stimuliert die HCV-Translation in RRL durch Blockierung einer inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion

Zu Beginn dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die miR-122 die Translation der HCV-RNA in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (RRL) wie in der Leberzelllinie Huh7 und HeLa-Zellen stimuliert (Kapitel II.2.2, siehe auch Henke, Goergen et al., 2008). Erste Untersuchungen des Mechanismus der Translationsstimulation in RRL und in Zellen zeigten übereinstimmend, dass der Effekt durch Bindung der „seed“-Region der miR-122 an komplementäre Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR vermittelt wird. Die Übereinstimmung der Resultate in RRL und Zellen ermöglichte anschließend die Verwendung des *in vitro* Systems zur Analyse der Bildung von HCV-Translationskomplexen mittels Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation. Die Resultate zeigten, dass die miR-122 die Translation der HCV-RNA im Stadium der Initiation durch Förderung der Bildung von 48S-Komplexen stimuliert.

Die anschließenden Experimente zum Nachweis von Ago2-Proteinen in HCV-Translationskomplexen in Anwesenheit von miR-122 gaben keinen Hinweis auf eine Beteiligung von Ago2 bei der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in RRL.



**Abbildung 38: Die Bindung der miR-122 an Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR interferiert mit einer RNA-RNA-Interaktion zwischen der HCV-5'-NTR und einem Abschnitt der Core-kodierenden Region.**

(A) Die HCV-RNA mit den interagierenden Sequenzen in der HCV-5'-NTR (Nukleotide 24 - 38) und der Core-kodierenden Region (Nukleotide 428 - 442, schwarze Kästen) und den Ziel-Sequenzen der miR-122 (graue Kästen). (B) Überlappende Interaktion der Core-kodierenden Region (Nukleotide 428 - 442, schwarze Kästen) und der miR-122 (miR-122mat) mit der HCV-5'-NTR (Nukleotide 21 - 24). Oben: Überlappende Bindung der Core-kodierenden Region (schwarze Kästen) und der „seed“-Region der miR-122 (graue Kästen) an die erste miR-122-Ziel-Sequenz in der HCV-5'-NTR. Unten: Überlappende Bindung der Core-kodierenden Region (schwarze Kästen) und Bindung der „seed“-Region der miR-122 (graue Kästen) an die zweite miR-122-Ziel-Sequenz in der HCV-5'-NTR mit zusätzlicher Hybridisierung der 3'-Region der miR-122 (Nukleotide 14 - 18).

In früheren Publikationen wurde beschrieben, dass eine konservierte Sequenz von 12 Nukleotiden in der Core-Protein-kodierenden Region der HCV-RNA (Nukleotide 428 - 442) eine RNA-RNA-Interaktion mit einer komplementären Sequenz in der HCV-5'-NTR (Nukleotide 24 - 38) eingeht (Honda et al., 1999b; Wang et al., 2000; Kim et al., 2003) (Abb. 38A). Durch Mutagenese-Studien wurde gezeigt, dass die Ausbildung dieser RNA-RNA-Interaktion die Translation der HCV-RNA in RRL und in humanen Zellen reprimiert (Honda et al., 1999b; Wang et al., 2000; Kim et al., 2003).

Bei näherer Analyse der an der RNA-RNA-Interaktion beteiligten Sequenzbereiche wurde festgestellt, dass die mit der Core-Sequenz paarende Region in der HCV-5'-NTR mit den funktionellen Bindestellen der miR-122 überlappt (Abb. 38A, B). Die Bindung der miR-122 mit der „seed“-Region an die erste Ziel-Sequenz in der HCV-5'-NTR (Abb. 38B oben) interferiert mit der Paarung von 6 der 12 komplementären Nukleotide der Core-Sequenz an die HCV-5'-NTR. Die Bindung der „seed“-Region der miR-122 an die zweite Ziel-Sequenz in der HCV-5'-NTR überlappt dagegen nur in einem Nukleotid mit der Paarung der Core-Sequenz (Abb. 38B unten). In diesem Fall ist aber zusätzlich eine Interaktion der Nukleotide 14 - 18 der 3'-Region der miR-122 mit der HCV-5'-NTR möglich. Die zusätzliche Hybridisierung des 3'-Endes der miR-122 an die HCV-5'-NTR würde ebenfalls mit der Interaktion der Core-Sequenz interferieren (Abb. 38B unten). Nach theoretischen Sequenz- und Interaktionsanalysen könnte die Bindung der miR-122 an die HCV-5'-NTR daher die Ausbildung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion zwischen HCV-5'-NTR und Core-Sequenz beeinträchtigen.

Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass die miR-122 die HCV-Translation durch Blockierung einer inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion zwischen der Core-Sequenz der HCV-5'-NTR stimuliert.

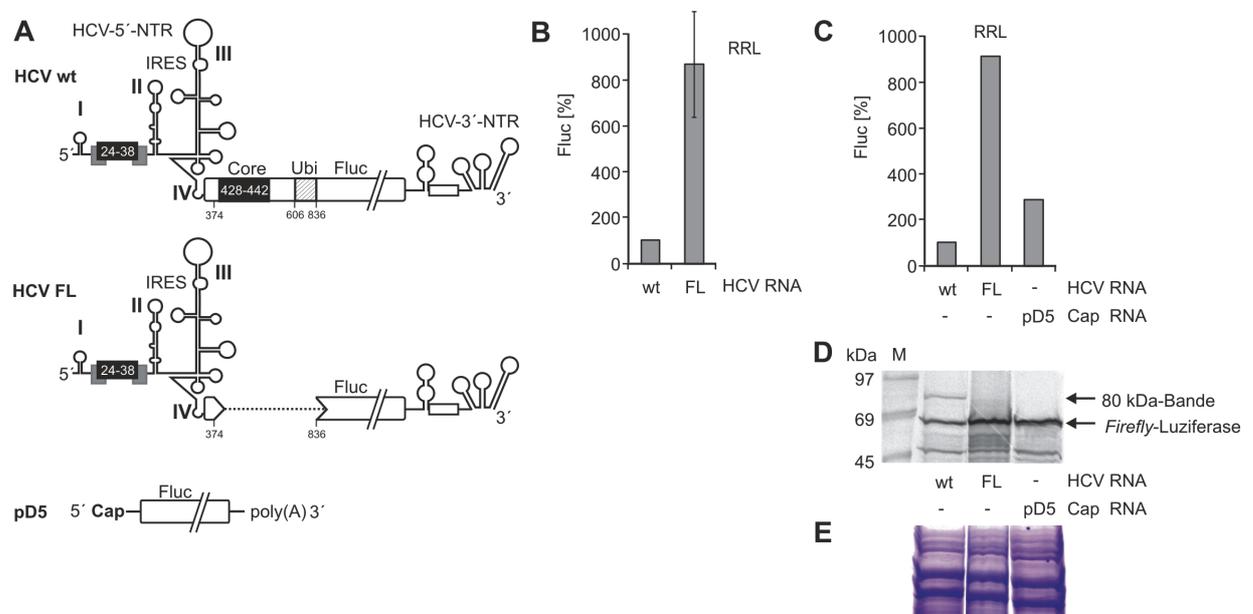
### **6.1 Eine RNA-RNA-Interaktion zwischen Sequenzabschnitten der HCV-5'-NTR und der Core-kodierenden Region reprimiert die HCV-Translation in RRL**

Zur Analyse der Hypothese, dass die microRNA-122 die Translationseffizienz durch Blockierung einer inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion steigert, wurde zunächst die reprimierende Wirkung der RNA-RNA-Interaktion zwischen der HCV-5'-NTR und der Core-Sequenz auf die Translation der HCV-Reporter-RNA in RRL überprüft. Dazu wurden mittels Restriktionsverdau und PCR-Mutagenese HCV-Reporter-Konstrukte hergestellt, bei denen die Ausbildung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion durch Mutationen in der HCV-5'-NTR oder in der Core-Sequenz verhindert wird. Anschließend wurde die Translationseffizienz der von diesen Konstrukten generierten RNA im Vergleich zur Wildtyp-HCV-RNA in RRL bestimmt.

Wie in der Einleitung beschrieben enthält die in dieser Arbeit für Translationsstudien verwendete HCV-Reporter-RNA (HCVwt) die HCV-5'-NTR und einen Teil der daran anschließenden kodierenden Sequenz für das Core-Protein, wovon die ersten 32 Nukleotide (342 - 374) an der Ausbildung der IRES und deren Funktionalität beteiligt sind (Reynolds et al., 1995; Honda et al., 1996) (Abb. 39A). Es folgt eine Ubiquitin-Sequenz, die kodierende Sequenz für das Reporter-Protein *Firefly*-Luziferase und die HCV-3'-NTR. Bei der Translation dieser Reporter-RNA entsteht ein Reporter-Protein mit einem Core-Peptid am N-Terminus, welches durch die enthaltene Ubiquitin-Sequenz kotranslational abgespalten wird. Dies führt zur Freisetzung eines aktiven *Firefly*-Luziferase-Proteins mit korrektem N-Terminus, dessen Aktivität anschließend als Maß für die Translationseffizienz der RNA gemessen wird.

Im Reporter-Konstrukt HCV-FL (Abb. 39A) wurden die Core-Sequenz, bis auf Nukleotide 342 - 374, und die anschließende Ubiquitin-Sequenz deletiert. Nach *in vitro* Translation der HCV-FL-RNA in RRL konnte bei Einsatz gleicher RNA-Mengen eine im Vergleich zur Wildtyp-HCV-Reporter-RNA (wt) 8 - 9-fach gesteigerte Luziferase-Aktivität gemessen werden (Abb 39B).

Um zu zeigen, dass die stark erhöhte Luziferase-Aktivität Resultat einer gesteigerten Translationseffizienz durch Deletion der inhibierend wirkenden Core-Sequenz ist, wurden die *in vitro* Translationsreaktionen in Anwesenheit von L-[<sup>35</sup>S]-Methionin durchgeführt. Als Kontrolle wurde die pD5-RNA verwendet, die Cap-abhängig die *Firefly*-Luziferase exprimiert (Abb. 39A). Neben der Messung der Luziferase-Aktivität (in Abb. 39C) erfolgte im Anschluss der Nachweis der Translationsprodukte über SDS-PAGE und Autoradiographie. In allen Reaktionen konnte eine Bande bei 60 - 65 kDa detektiert werden, was der Größe der *Firefly*-Luziferase von 62 kDa entspricht (Abb. 39D).



**Abbildung 39: Die Deletion der Core-kodierenden Sequenz führt zu gesteigerter Translationseffizienz der HCV-Reporter-RNA.** (A) Verwendete Reporter-RNAs. HCVwt mit HCV-5'-NTR, Abschnitt der Core-kodierenden Sequenz (Core), Ubiquitin-Sequenz (Ubi), Sequenz kodierend für die *Firefly*-Luziferase (Fluc) und HCV-3'-NTR. HCV-FL wie HCVwt-RNA aber mit Deletion der Core- und Ubiquitin-Sequenz (Nukleotide 374 - 836). Kontroll-RNA pD5 kodierend für die *Firefly*-Luziferase (Fluc), gecappt und polyadenyliert. (B) *Firefly*-Luziferase-Aktivität in % nach *in vitro* Translation in RRL; n=4. Die Messwerte aus Reaktionen mit der HCVwt-RNA wurden gleich 100 % gesetzt. (C) *Firefly*-Luziferase-Aktivität in % nach *in vitro* Translation in RRL in Anwesenheit von L-[<sup>35</sup>S]-Methionin. (D) Nachweis der translatierten Reporter-Proteine aus Reaktion in (B) über SDS-PAGE und Autoradiographie. M, <sup>14</sup>C-Marker. (E) Coomassie-Färbung des SDS-Gels aus (D) als Lade-Kontrolle.

Ein Vergleich der Stärke der 62 kDa-Bande aus der Reaktion mit Wildtyp-HCV-RNA und HCV-FL-RNA, zeigt eine deutliche Steigerung in der Intensität in Reaktionen mit HCV-FL-RNA. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Deletion der mit der HCV-5'-NTR interagierenden Core-Sequenz zu einer Steigerung der Translationseffizienz der RNA führt, was den inhibierenden Effekt der RNA-RNA-Interaktion in RRL zunächst bestätigt. Eine Lade-Kontrolle durch Coomassie-Färbung des SDS-Gels

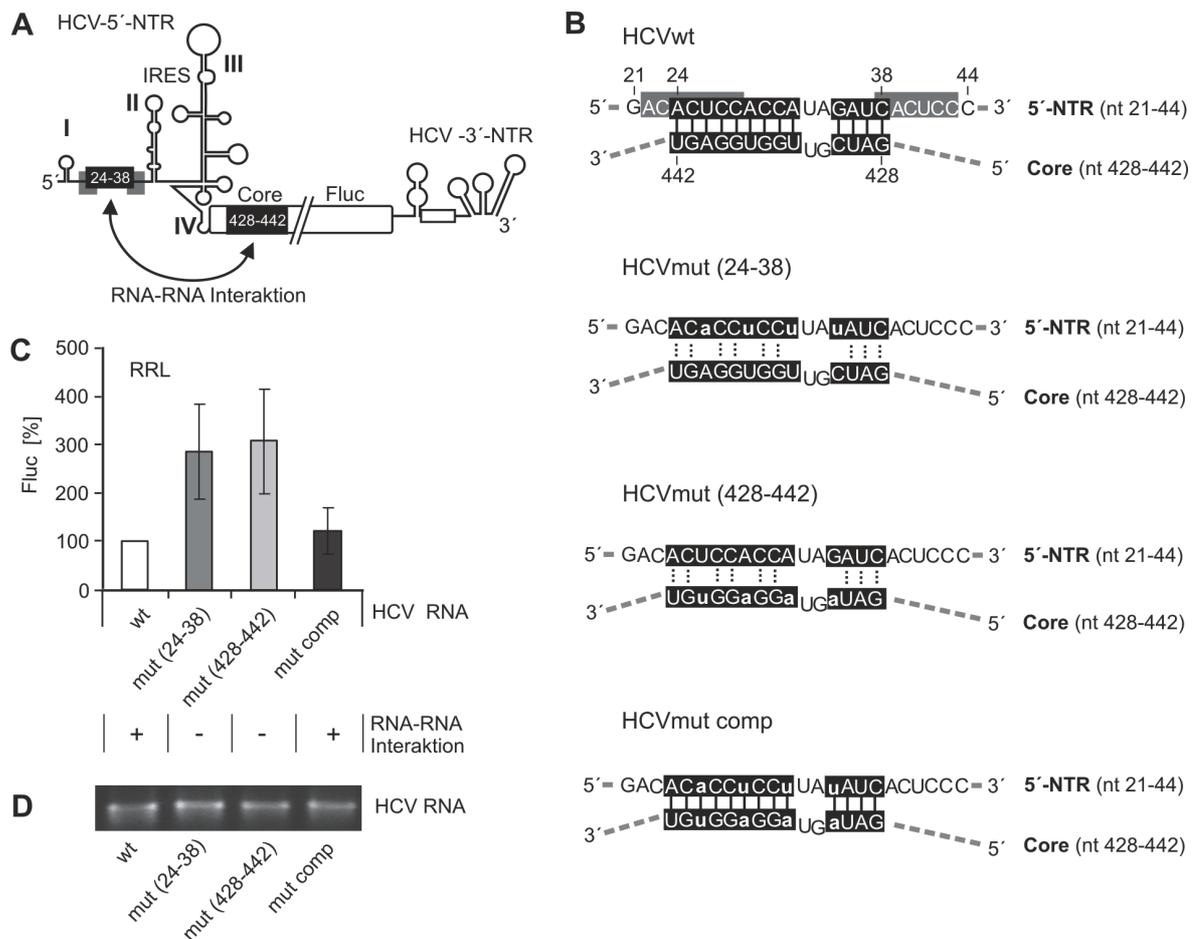
(Abb 39E) zeigt, dass die mittels Autoradiographie detektierten unterschiedlichen Bandenstärken nicht durch Auftrag unterschiedlicher Proteinmengen zustande kommen.

Zusätzlich wurde in Translationsreaktionen mit Wildtyp-HCV-RNA im Vergleich zu Reaktionen mit HCV-FL-RNA und pD5-RNA eine Bande mit einer Größe von ungefähr 80 kDa detektiert (Abb. 39D). Diese Bande entspricht der Größe unprozessierter und damit möglicherweise inaktiv vorliegender *Firefly*-Luziferase, die an ihrem N-Terminus den Rest des Core-Proteins und das Ubiquitin-Signalpeptid enthält. Diese 80 kDa-Bande konnte in Translationsreaktionen mit der HCV-FL-RNA und pD5-RNA nicht detektiert werden, da hier die entsprechenden Sequenzen fehlen und keine Prozessierung des N-Terminus der Luziferase erforderlich ist. Dies weist darauf hin, dass die 8 – 9-fache Steigerung der Messwerte mit der HCV-FL-RNA im Vergleich zur Wildtyp-RNA durch zwei Effekte zustande kommt. Einerseits wird die Translationseffizienz der HCV-FL-RNA durch Deletion der inhibierenden Core-Sequenz gesteigert. Andererseits führt die vorgenommene Deletion zu einem Wegfall der notwendigen Prozessierung des N-Terminus der Luziferase, wodurch alle Moleküle sofort im aktiven Zustand vorliegen und eine höhere Luziferase-Aktivität detektiert werden kann.

Aus Ergebnissen mit dieser Deletionsmutante konnte folglich keine Aussage über die Stärke des inhibitorischen Einflusses der Core-Sequenz auf die HCV-Translation getroffen werden. Des Weiteren ist das HCV-FL-Reporter-Konstrukt daher für weitere Vergleichsstudien der basalen Translationseffizienz mit anderen HCV-Reporter-RNAs nicht gut geeignet.

Für die weitere Analyse des Einflusses der inhibierenden Core-Sequenz auf die HCV-Translation in RRL wurden daher mittels PCR-Mutagenese HCV-Reporter-Konstrukte generiert, die Punktmutationen in den interagierenden Sequenzen enthalten (Abb. 40A,B). Das Reporter-Konstrukt HCVmut (24-38) enthält Punktmutationen in der HCV-5'-NTR (Nukleotide 26, 29, 32 und 35), das Konstrukt HCVmut (428-442) enthält dazu komplementäre Punktmutationen an entsprechenden Positionen in der Core-kodierenden Sequenz (Nukleotide 431, 434, 437 und 440). In beiden Fällen verhindern die eingefügten Mutationen eine effiziente Ausbildung der RNA-RNA-Interaktion zwischen HCV-5'-NTR und Core-Sequenz. Im Reporter-Konstrukt HCVmut comp sind sowohl die Mutationen in der HCV-5'-NTR als auch in der Core-Sequenz enthalten. Durch die Komplementarität der Mutationen wird hier eine korrekte Basenpaarung zwischen HCV-5'-NTR und Core-Sequenz und damit die Ausbildung der RNA-RNA-Interaktion wieder hergestellt. Bei allen eingefügten Mutationen wurde beachtet, dass das Leseraster und die Aminosäure-Sequenz des exprimierten Proteins erhalten bleiben.

*In vitro* Translationen der mutierten RNAs im Vergleich zur Wildtyp-Reporter-RNA (wt) (Abb. 40C) zeigten, dass Mutationen in der HCV-5'-NTR (mut (24-38)) oder in der Core-kodierenden Sequenz (mut (428-442)), die eine Interaktion der Core-Sequenz mit der HCV-5'-NTR verhindern, die Translationseffizienz der HCV-Reporter-RNA gleichermaßen auf das 3-fache steigern.



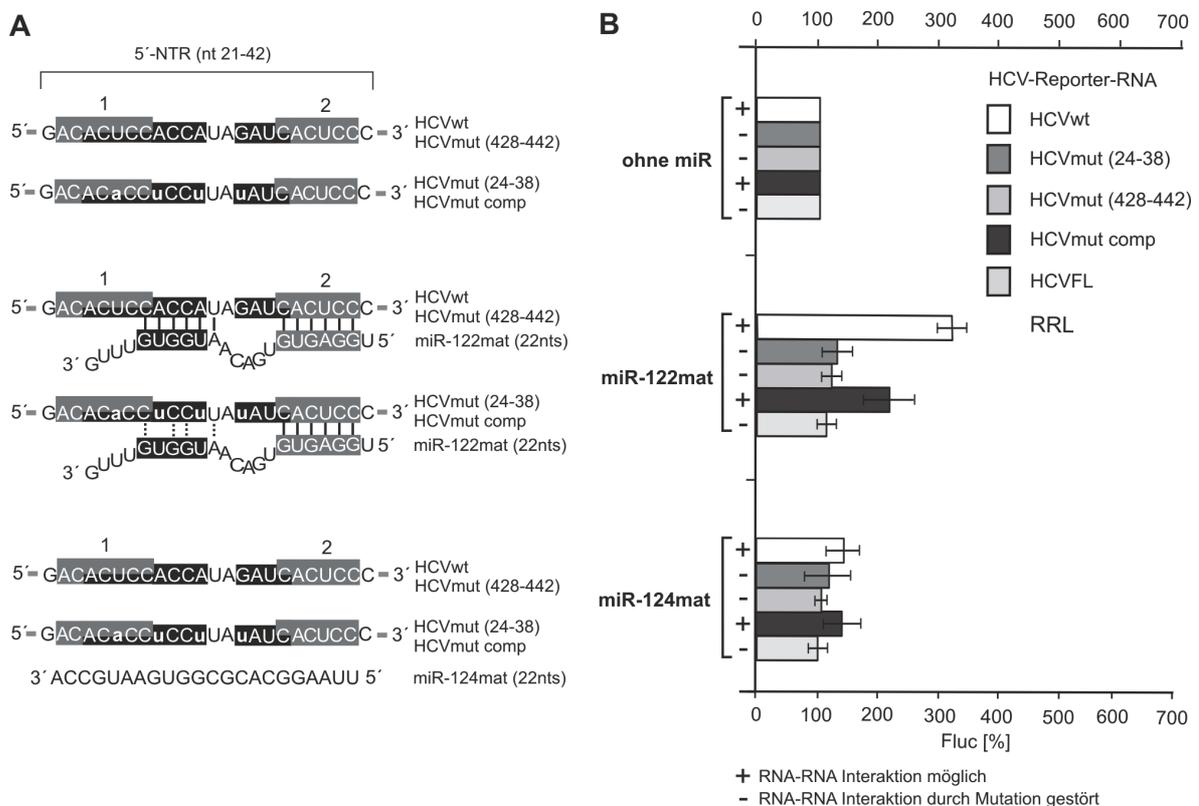
**Abbildung 40: Punktmutationen in den interagierenden Sequenzen der HCV-5'-NTR und Core-kodierenden Region führen zu gesteigerter Translationseffizienz der HCV-Reporter-RNA.** (A) HCV-Reporter-RNA mit interagierenden Sequenzen (schwarze Kästen) und Ziel-Sequenzen der miR-122 (graue Kästen). (B) Nukleotid-Sequenzen der RNA-RNA-Interaktion (schwarze Kästen) zwischen der HCV-5'-NTR (Nukleotide 24 - 38) und der Core-kodierenden Region (Nukleotide 428 - 442) der Wildtyp (wt) und mutierten HCV-Reporter-RNAs. Mutierte Nukleotide sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Ziel-Sequenzen der miR-122 sind durch graue Kästen markiert. (C) *Firefly*-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % nach *in vitro* Translation der HCV-Reporter-RNAs in RRL. Die Messwerte der Reaktionen mit Wildtyp-Reporter-RNA (wt) sind gleich 100 % gesetzt; n=8. Die mögliche Ausbildung der RNA-RNA-Interaktion ist gekennzeichnet durch plus (+) und minus (-). (D) In Translations-Reaktionen eingesetzte HCV-Reporter-RNAs.

Die komplementären Mutationen in der HCV-Reporter-RNA mut comp hatten dagegen keinen Effekt auf die Translationseffizienz, die vergleichbar mit der der Wildtyp-RNA war. Ein anschließender Abgleich der in den Translationsreaktionen verwendeten RNAs durch Agarosegel-Elektrophorese bestätigte, dass die beobachteten Differenzen der Translationseffizienzen nicht durch den Einsatz unterschiedlicher Mengen an HCV-Reporter-RNA hervorgerufen wurden (Abb. 40D). Eine Aufhebung der RNA-RNA-Interaktion zwischen der HCV-5'-NTR und der Core-Sequenz führt folglich zu einer gesteigerten Translationseffizienz während eine Wiederherstellung der Interaktion die Translationseffizienz auf das Ausgangsniveau senkt.

Zusammenfassend bestätigten die Ergebnisse, dass eine Interaktion der Core-kodierenden Sequenz mit der HCV-5'-NTR die Translation der HCV-RNA in RRL reprimiert.

## 6.2 Die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in RRL ist abhängig von der Ausbildung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion

Nach der Bestätigung der reprimierenden Wirkung einer Interaktion der Core-kodierenden Sequenz mit der HCV-5'-NTR wurde der Zusammenhang dieses Effektes mit dem stimulatorischen Einfluss der miR-122 auf die HCV-Translation untersucht. Dazu wurden die mutierten HCV-Reporter-RNAs im Vergleich zur Wildtyp-Reporter-RNA in An- oder Abwesenheit von microRNA *in vitro* translatiert (Abb. 41). Für eine bessere Vergleichbarkeit des Effektes der microRNA auf die Translation der HCV-Reporter-RNAs wurden die Translationseffizienzen aller HCV-RNAs aus Reaktionen ohne microRNA bei der Darstellung der folgenden Ergebnisse gleich 100 % gesetzt.



**Abbildung 41: Ein Verlust der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion führt zu einem Verlust der stimulatorischen Wirkung der miR-122 auf die HCV-Translation.** (A) Darstellung der Interaktion der verwendeten microRNAs mit der zweiten Ziel-Sequenz in der 5'-NTR der Wildtyp- und mutierten HCV-Reporter-RNAs. Für die Interaktion der microRNAs mit der ersten Ziel-Sequenz siehe Abb. 38B oben. Ziel-Sequenzen der miR-122 sind durch graue Kästen markiert. Sequenzen, die mit der Core-kodierenden Region interagieren und die paarende 3'-Region der miR-122 sind durch schwarze Kästen markiert. Mutierte Nukleotide sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. (B) *Firefly*-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % nach *in vitro* Translation der HCV-Reporter-RNAs in RRL in An- oder Abwesenheit von Einzelsträngen (miR mat) der miR-122 oder miR-124; n=6. Die Messwerte der Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt. Die mögliche Ausbildung der RNA-RNA-Interaktion ist gekennzeichnet durch plus (+) und minus (-).

Die Translationseffizienz der Wildtyp-RNA (wt) konnte wie schon in vorangehenden Experimenten beobachtet durch Zugabe der miR-122mat zu den Translationsreaktionen etwa um das 3-fache gesteigert werden (Abb. 41B). Im Gegensatz dazu wurde die Translation der RNA mut (24-38) und mut (428-442) in Anwesenheit von miR-122 nicht stimuliert. Folglich führt ein Verlust der

inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion durch Mutationen in der HCV-5'-NTR (mut (24-38)) oder in der interagierenden Core-Sequenz (mut (428-442)) auch zu einem Verlust der Translationsstimulation durch miR-122. Die Translation der RNA mut comp wird durch Zugabe der miR-122mat, wenn auch nicht mit der gleichen Intensität wie die Wildtyp-RNA, gesteigert. Die Wiederherstellung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion durch komplementäre Mutationen in der HCV-Reporter-RNA mut comp führt folglich auch zu einer Wiederherstellung der stimulatorischen Wirkung der miR-122. Dass die Translation der RNA mut comp durch miR-122mat nicht im gleichen Maße wie die der Wildtyp-RNA gesteigert wird, kann dadurch erklärt werden, dass die eingefügten Punktmutationen in der HCV-5'-NTR der RNA die Bindung der miR-122mat sowohl an die erste als auch an die zweite Ziel-Sequenz beeinträchtigen (siehe auch Abb. 41A, miR-122mat). Als Kontrolle wurde zusätzlich die HCV-FL-RNA mit einer Deletion der Core-Sequenz verwendet, deren Translationseffizienz in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der HCV-RNAs mut (24-28) und mut (428-442) nicht durch Zugabe von miR-122mat gesteigert werden konnte. Die Anwesenheit von miR-124mat in der Translations-Reaktion hatte bei keiner der verwendeten HCV-Reporter-RNAs einen Einfluss auf deren Translationseffizienz.

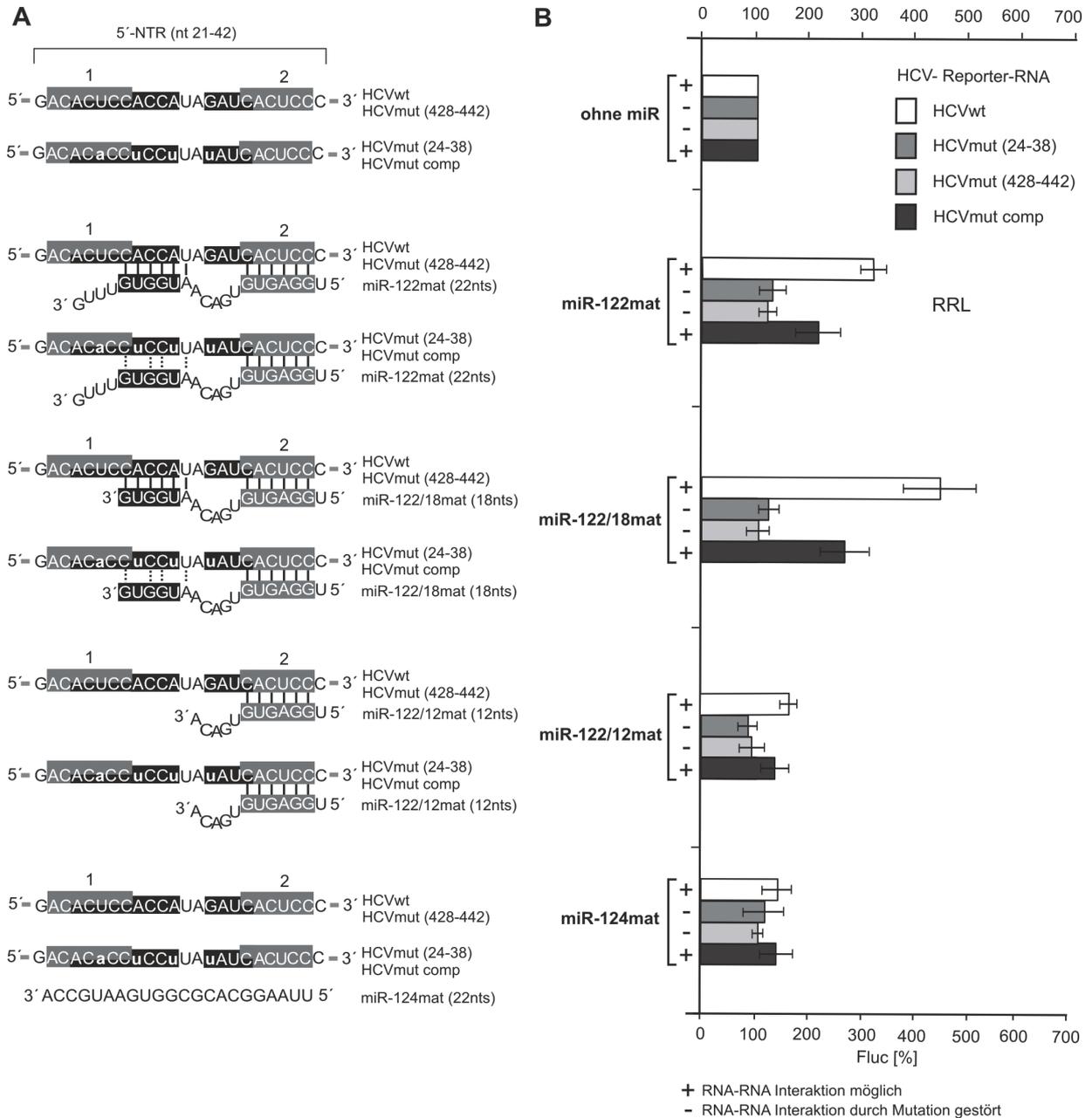
Die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in RRL ist folglich abhängig von der Ausbildung einer inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion der Core-kodierenden Sequenz mit der HCV-5'-NTR. Diese Ergebnisse bestätigten die Hypothese, dass die miR-122 die Translation der HCV-RNA in RRL hauptsächlich stimuliert, indem sie durch Bindung an die HCV5'-NTR die Ausbildung der translationsreprimierenden RNA-RNA-Interaktion beeinträchtigt.

### **6.3 Die Funktion der 3'-Region der miR-122 bei der Stimulation der HCV-Translation in RRL**

In vorangehenden Experimenten wurde gezeigt, dass die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in RRL und Zellen durch Interaktion der „seed“-Region der miR-122 mit zwei Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR vermittelt wird (Kapitel II.3.2, Henke, Goergen et al., 2008). Auffällig war, dass schon die Mutation einer der beiden Ziel-Sequenzen zu einem fast vollständigen Verlust der Translationsstimulation führte. Folglich sind beide Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR essentiell für die Wirkung der miR-122 auf die Translation der HCV-RNA. Übereinstimmend ergaben Sequenzanalysen, dass die Bindung der „seed“-Sequenz der miR-122 an die erste Ziel-Sequenz stark mit der Interaktion der inhibierenden Core-Sequenz interferiert. Bei Bindung der miR-122 an die zweite Ziel-Sequenz ist theoretisch zusätzlich zur Interaktion der „seed“-Sequenz eine Paarung des 3'-Endes der miR-122 notwendig, um eine Ausbildung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion zu blockieren.

Im Folgenden wurde daher die Funktion des 3'-Endes der miR-122 bei der Translationsstimulation der HCV-RNA in RRL analysiert. Dazu wurden zunächst Varianten der miR-122mat mit einem verkürzten 3'-Ende verwendet (Abb. 42A). Bei dem RNA-Oligonukleotid miR-122/18mat fehlen die

Nukleotide 19 - 22 des 3'-Endes. Die mögliche Interaktion der 3'-Region der miR-122 mit der HCV-5'-NTR mittels der Nukleotide 14 - 18 bleibt erhalten. Das RNA-Oligonukleotid miR-122/12mat wurde auf 12 Nukleotide gekürzt, was einen zusätzlichen Verlust der zur HCV-5'-NTR komplementären 3'-Region bedeutet.



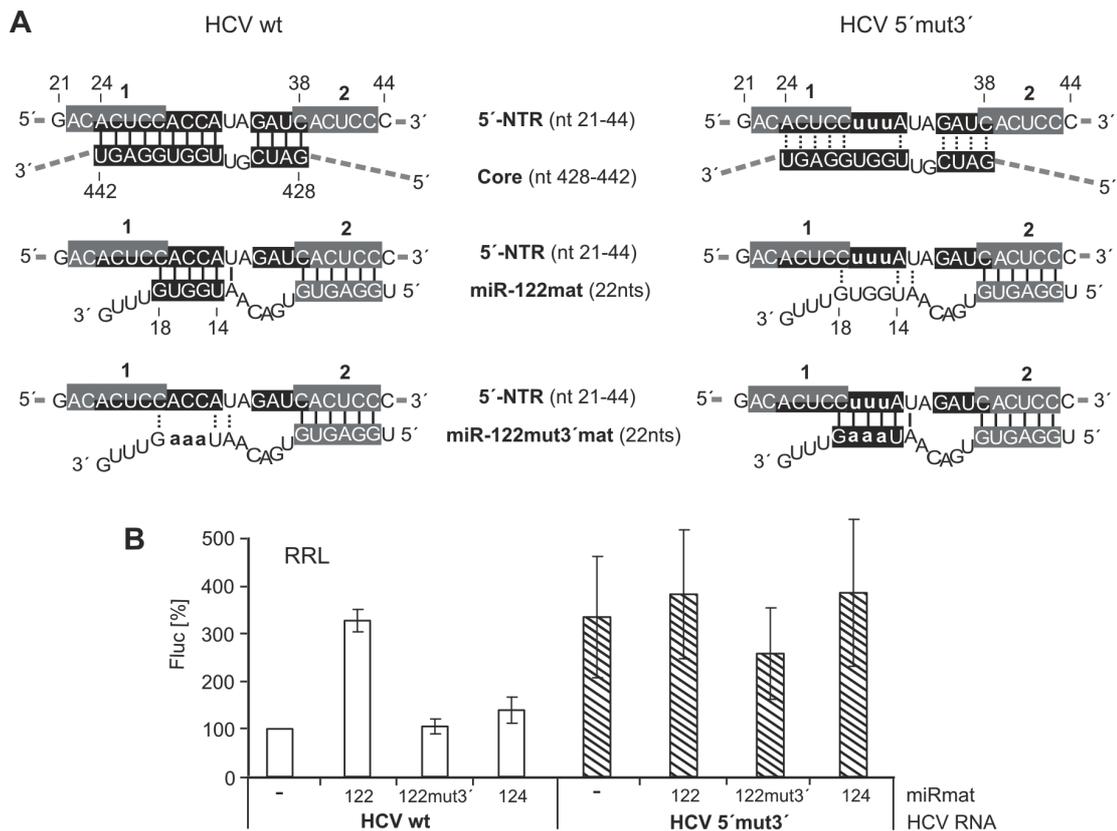
**Abbildung 42: Die 3'-Region der miR-122 ist essentiell für die HCV-Translationsstimulation in RRL.** (A) Interaktion der verwendeten microRNAs mit der zweiten Ziel-Sequenz in der 5'-NTR der Wildtyp- und mutierten HCV-Reporter-RNAs. Für die Interaktion der microRNAs mit der ersten Ziel-Sequenz siehe Abb. 38B oben. Ziel-Sequenzen der miR-122 sind durch graue Kästen markiert. Sequenzen, die mit der Core-kodierenden Region interagieren, und die paarende 3'-Region der miR-122 sind durch schwarze Kästen markiert. Mutierte Nukleotide sind durch Kleinbuchstaben markiert. (B) *Firefly*-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % nach *in vitro* Translation der HCV-Reporter-RNAs in RRL in An- oder Abwesenheit von Einzelsträngen (miR mat) der miR-122 oder miR-124; n=6. Die Messwerte der Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt. Die mögliche Ausbildung der RNA-RNA-Interaktion ist gekennzeichnet durch plus (+) und minus (-).

Bei der Analyse der Wirkung dieser miR-122-Varianten auf die Translation der verschiedenen Reporter-RNAs in RRL zeigte die miR-122/18mat das gleiche Stimulations-Muster wie die Wildtyp-miR-122mat (Abb. 42B). Die Translation der HCVwt-RNA und der RNA HCVmut comp wurde durch Zugabe der miR-122/18mat sogar stärker als durch die miR-122mat stimuliert. Die Translationseffizienzen der RNAs HCVmut (24-38) und HCVmut (428-442) konnten wie mit miR-122mat nicht gesteigert werden. Bei Zugabe der miR-122/12mat zur Translationsreaktion konnte dagegen nur ein schwacher stimulierender Effekt der Translation der HCVwt und HCVmut comp RNA detektiert werden. Eine Verkürzung des 3'-Endes der miR-122 auf 18 Nukleotide hat demnach keinen negativen Einfluss auf die stimulatorische Eigenschaft der miR-122, während die Deletion des kompletten 3'-Endes zum Verlust der stimulatorischen Wirkung auf die HCV-Translation in RRL führt.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die exakte Länge der miR-122 von 22 Nukleotiden kein entscheidender Faktor für die Stimulation der HCV-Translation in RRL ist. Außerdem zeigen die Resultate, dass die Bindung der „seed“-Region an die Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR nicht ausreicht, um die translationssteigernde Wirkung der miR-122 zu vermitteln. Die zur HCV-5'-NTR komplementäre 3'-Region der miR-122 ist zusätzlich essentiell für die Stimulation der HCV-Translation in RRL.

Um zu bestätigen, dass nicht eine drastische Verkürzung der miR-122, sondern der Verlust der mit der HCV-5'-NTR interagierenden 3'-Region Ursache für einen Verlust der stimulatorischen Wirkung der miR-122 ist, wurde die Sequenz des 3'-Endes der miR-122 sowie komplementäre Nukleotide in der HCV-5'-NTR mutiert. In der miR-122mut3'mat wurden die Nukleotide 15 - 17 durch die Nukleotide AAA ersetzt, wodurch diese im Vergleich zur Wildtyp-miR-122mat nicht mit dem 3'-Ende an die HCV-5'-NTR binden kann (Abb. 43A, linke Spalte). Entsprechend dazu wurden in der 5'-NTR der HCV5'mut3'-RNA mittels PCR-Mutagenese komplementäre Mutationen eingefügt und die Nukleotide 29 - 31 durch die Nukleotide UUU ersetzt (Abb 43A, rechte Spalte). Durch die Mutation in der HCV-5'-NTR ist die Bindung des 3'-Endes der miR-122mat gestört, während die 3'-Interaktion der mutierte miR-122mut3'mat wieder hergestellt wird.

Vergleichende *in vitro* Translationsexperimente zeigten, dass die Translationseffizienz der HCVwt-RNA in Anwesenheit der Wildtyp-miR-122mat wie zuvor beobachtet um das 3-fache gesteigert wird. Im Gegensatz dazu wurde die Translation der HCVwt-RNA durch Zugabe der miR-122mut3'mat nicht stimuliert. Diese Ergebnisse bestätigen, dass nicht die Länge des 3'-Endes der miR-122, sondern die Anwesenheit einer zur HCV5'-NTR komplementären 3'-Sequenz determinierend für die translationsfördernde Wirkung der miR-122 in RRL ist. Die basale Translationseffizienz der HCV5'mut3'-RNA war entsprechend der Resultate mit den RNAs HCVmut (24-38) und HCVmut (428-442) (siehe auch Abb. 40C) im Vergleich zur Translationseffizienz der HCVwt-RNA um das 3-fache erhöht (Abb. 43B).



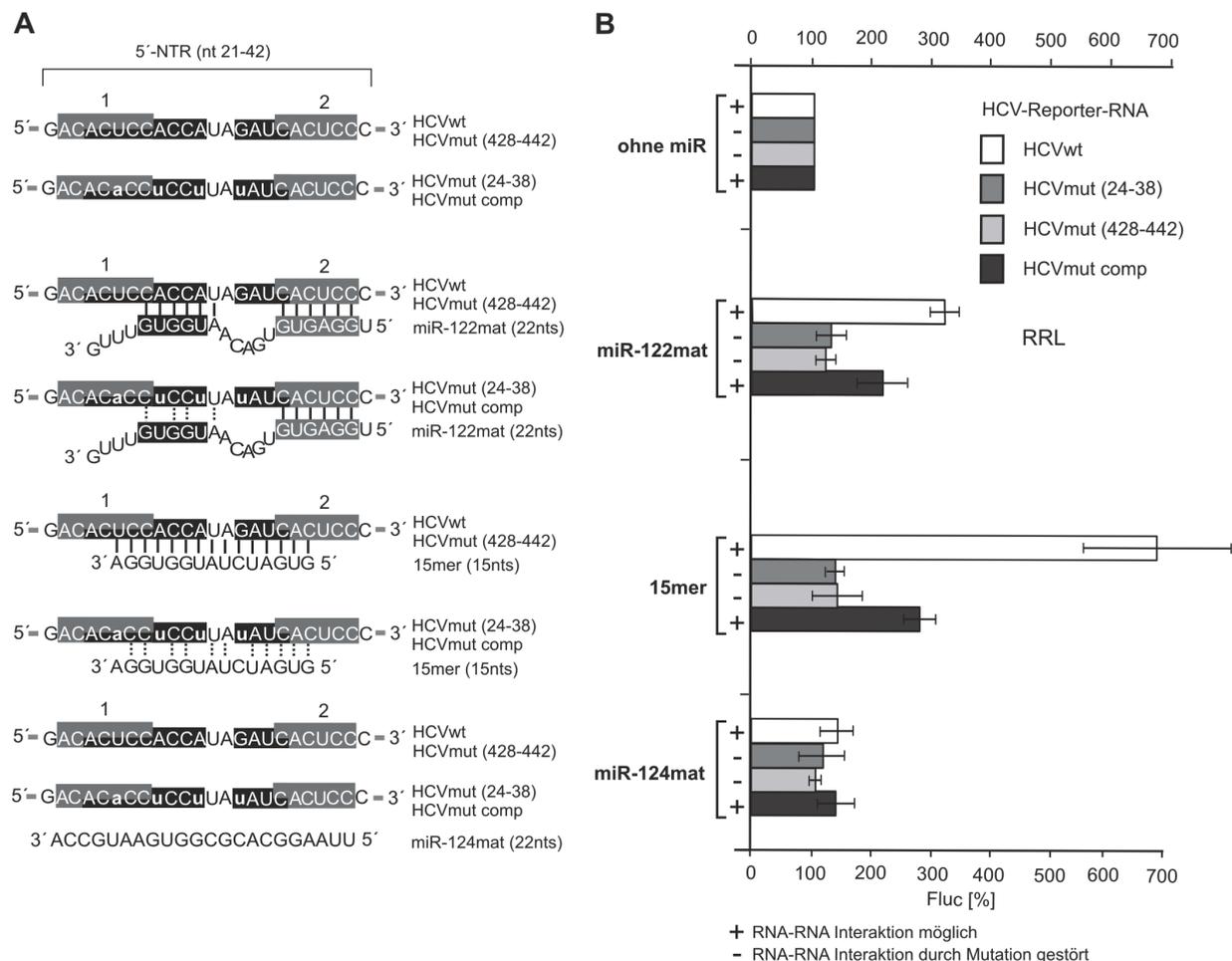
**Abbildung 43: Die Sequenz der 3'-Region der miR-122 ist essentiell für die HCV-Translationsstimulation in RRL.** (A) Darstellung der Interaktion der verwendeten microRNAs mit der 5'-NTR der Wildtyp-HCV-Reporter-RNA und der mutierten HCV-Reporter-RNA 5'-mut3'. Mutationen in der Sequenz der microRNA und HCV-RNA sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Ziel-Sequenzen der miR-122 sind durch graue Kästen markiert. Sequenzen, die mit der Core-kodierenden Region interagieren, und die paarende 3'-Region der miR-122 sind durch schwarze Kästen markiert. (B) *Firefly*-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % nach *in vitro* Translation der HCV-Reporter-RNAs in RRL in An- oder Abwesenheit von Einzelsträngen (miR mat) der miR-122 oder miR-122mut3'; n=6. Die Messwerte der Reaktion nur mit Wildtyp-HCV-Reporter-RNA wurden gleich 100 % gesetzt.

Dies deutet darauf hin, dass die hier eingefügte Mutation in der HCV-5'-NTR wie die Mutationen in der HCVmut (24-38) RNA die Ausbildung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion zwischen HCV-5'-NTR und Core-Sequenz aufhebt. Übereinstimmend konnte die Translation der HCV5' mut3'-RNA weder durch Zugabe der miR-122mat noch durch miR-122mut3' mat weiter stimuliert werden. Die Kontroll-miR-124mat hatte bei keiner der HCV-Reporter-RNAs einen Einfluss auf die Translationseffizienz.

Zusammenfassend unterstützen die Resultate die Hypothese, dass eine Interaktion der 3'-Region der miR-122 zusätzlich zur Bindung der „seed“-Sequenz wichtig für die Blockierung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion und damit für die Stimulation der HCV-Translation in RRL ist.

### 6.4 Ein RNA-Oligonukleotid mit vollständiger Komplementarität zur HCV-5'-NTR stimuliert die HCV-Translation in RRL

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in RRL hauptsächlich durch Blockierung einer inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion durch Hybridisierung der miR-122 mit der HCV-5'-NTR vermittelt wird. Im Folgenden wurde daher geprüft, ob auch andere RNA-Oligonukleotide, die durch Bindung an die HCV-5'-NTR mit der RNA-RNA-Interaktion interferieren, die HCV-Translation in gleichem Maße stimulieren können wie die miR-122.



**Abbildung 44: Ein RNA-Oligonukleotid mit vollständiger Komplementarität zur HCV-5'-NTR stimuliert die HCV-Translation in RRL.** (A) Darstellung der Interaktion der verwendeten microRNAs und des 15mer-Oligonukleotids mit der zweiten Ziel-Sequenz in der 5'-NTR der Wildtyp- und mutierten HCV-Reporter-RNAs. Für die Interaktion der microRNAs mit der ersten Ziel-Sequenz siehe Abb. 38B oben. Ziel-Sequenzen der miR-122 sind durch graue Kästen markiert. Sequenzen, die mit der Core-kodierenden Region interagieren, und die paarende 3'-Region der miR-122 sind durch schwarze Kästen markiert. Mutierte Nukleotide sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. (B) Firefly-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % nach *in vitro* Translation der HCV-Reporter-RNAs in RRL in An- oder Abwesenheit von Einzelsträngen (miR mat) der miR-122 oder miR-124 oder des RNA-Oligonukleotids 15mer; n=6. Die Messwerte der Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt. Die mögliche Ausbildung der RNA-RNA-Interaktion ist gekennzeichnet durch plus (+) und minus (-).

Dazu wurde die Wirkung eines 15 Nukleotide langen RNA-Oligonukleotids (15mer) auf die Translation der HCV-Reporter-RNAs im Vergleich zur miR-122mat in RRL getestet. Das 15mer paart vollständig mit den Nukleotiden 26 - 40 der HCV-5'-NTR und interferiert daher theoretisch stärker mit der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion als die miR-122mat (Abb. 44A).

Wie in Anwesenheit von miR-122mat wurde die Translation der HCVwt-RNA und der HCVmut comp-RNA durch Zugabe des 15mers stimuliert, während die Translation der RNAs HCVmut (24-38) und HCVmut (428-442) nicht beeinflusst wurde (Abb. 44B). Folglich haben auch andere RNA-Oligonukleotide, die mit der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion interferieren einen positiven Effekt auf die Translationseffizienz der HCV-RNA in RRL. Des Weiteren wurde die HCV-Translation durch das 15mer RNA-Oligonukleotid übereinstimmend mit der verstärkten Basenpaarung an die 5'-NTR insgesamt stärker stimuliert als durch die miR-122mat. Dies lässt vermuten, dass der Grad der Basenpaarung der RNA-Oligonukleotide mit der HCV-5'-NTR die bestimmende Determinante für die Blockierung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion und damit für die Stimulation der HCV-Translation in RRL ist.

## 6.5 Diskussion

Die Analyse des Mechanismus der HCV-Translationsstimulation durch miR-122 in RRL zeigte, dass die miR-122 durch Hybridisierung an die HCV-5'-NTR eine inhibitorische RNA-RNA-Interaktion zwischen der 5'-NTR und der Core-kodierenden Sequenz der HCV-RNA blockiert und dadurch die Translation der HCV-RNA stimuliert.

In Übereinstimmung mit anderen Publikationen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Interaktion der Core-kodierenden Sequenz mit einem komplementären Sequenzabschnitt in HCV-5'-NTR zu einer verringerten Translationseffizienz der HCV-RNA in RRL führt (Honda et al., 1999b; Wang et al., 2000; Kim et al., 2003). Strukturanalysen der HCV-RNA *in vitro* zeigten, dass etwa 80 % einer *in vitro* transkribierten HCV-RNA-Population in der „geschlossenen“ Konformation vorliegt, bei der die Core-kodierende Sequenz an die HCV-5'-NTR hybridisiert ist (Diaz-Toledano et al., 2009).

Die inhibierende Core-Sequenz interagiert mit den Nukleotiden 24 - 38 der HCV-5'-NTR, die teilweise ebenso von der miR-122 für die Bindung an die HCV-5'-NTR genutzt werden. Die Untersuchung, ob der inhibitorische Effekt der RNA-RNA-Interaktion in Zusammenhang mit der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 steht, zeigte eine Abhängigkeit des stimulatorischen Einflusses der miR-122 von der Ausbildung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion. Ausschließlich die Translationseffizienz derjenigen HCV-Reporter-RNAs, bei denen eine Ausbildung der RNA-RNA-Interaktion möglich ist, kann durch Zugabe von miR-122 in RRL gesteigert werden. Die Translation der RNAs, in denen die RNA-RNA-Interaktion durch Mutationen aufgehoben ist, wird nicht durch miR-122 stimuliert. Diese Resultate weisen darauf hin, dass die miR-122 die HCV-Translation hauptsächlich dadurch stimuliert, dass sie durch Bindung an die HCV-5'-NTR die Ausbildung der translationsreprimierenden RNA-RNA-Interaktion zwischen der HCV-5'-NTR und

der Core-Sequenz blockiert. Übereinstimmend zeigen *in vitro* Struktur-Analysen der HCV-RNA der Gruppe Diaz-Toledano et al. (2009), dass die miR-122 durch Bindung an die HCV-5'-NTR eine Konformationsänderung von der „geschlossenen“ Form, in der die HCV-5'-NTR mit der Core-Sequenz gepaart ist, zu einer „offenen“ Form ohne RNA-RNA-Interaktion bewirkt. Diese Konformationsänderung erhöht möglicherweise die Zugänglichkeit der HCV-IRES für Translations-Initiationsfaktoren und erleichtert die Anlagerung der ribosomalen Komplexe an der HCV-RNA, was zu einer gesteigerten Translationeffizienz führt. Dem entsprechend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die miR-122 in RRL die Initiation der HCV-Translation durch Förderung der Formation von 48S-Komplexen stimuliert. Allerdings konnte in dieser Arbeit auch mit HCV-RNAs, die keine inhibierende Core-Sequenz enthalten, in Anwesenheit von miR-122 eine gesteigerte Formation der 48S-Komplexe detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt kann nur vermutet werden, dass die miR-122 neben der Blockierung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion zusätzlich Einfluss auf die Konformation der HCV-5'-NTR nimmt, was eine verstärkte Bildung von Translationsinitiations-Komplexen an der HCV-IRES begünstigt.

Das Resultat, dass die miR-122 die HCV-Translation in RRL hauptsächlich durch Blockierung einer inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion stimuliert, deutet darauf hin, dass es sich möglicherweise hier nicht um einen typischen „microRNA-Effekt“ handelt, bei dem die Interaktion der microRNA mit der RNA hauptsächlich der Ziel-Erkennung dient und die Effektor-Funktion bei der Protein-Komponente der miRNP-Komplexe liegt. Vielmehr kann man annehmen, dass es sich um einen „Struktur-Effekt“ handelt, bei dem die Basenpaarung der miR-122 an die HCV-5'-NTR entscheidend ist.

Übereinstimmend damit wurde festgestellt, dass die Translationsstimulation in RRL eine verstärkte Interaktion der miR-122 mit der HCV-5'-NTR erfordert. Experimente mit miR-122 Varianten zeigen, dass eine Verkürzung der miR-122 auf 18 Nukleotide keinen Einfluss auf die Translationsstimulation der HCV-RNA hat, eine Deletion des kompletten 3'-Endes aber zu einem Verlust des Effektes führt. Dies zeigt, dass die exakte Länge der miR-122 von 22 Nukleotiden in RRL keine Rolle spielt, eine Bindung der „seed“-Sequenz an die Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR aber nicht ausreicht, um den stimulatorischen Effekt zu vermitteln. Dazu ist wahrscheinlich eine zusätzliche Hybridisierung der 3'-Region der miR-122 an die HCV-5'-NTR nötig, die die Interferenz mit der Interaktion der inhibitorischen Core-Sequenz an die HCV-5'-NTR verstärkt. Dem gemäß stellten Diaz-Toledano et al. (2009) fest, dass weder die „seed“-Region noch die 3'-Region der miR-122 allein ausreichend ist, um eine Konformationsänderung der HCV-RNA von der „geschlossenen“ zur „offenen“ Form zu bewirken. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass ein 15 Nukleotide langes RNA-Oligonukleotid, welches vollständig mit der HCV-5'-NTR hybridisiert und daher stärker als die miR-122 mit der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion interferiert, auch einen verstärkten stimulatorischen Effekt auf die HCV-Translation hat. Dies bestätigt zum einen, dass der Grad der Basenpaarung der miR-122 mit der HCV-5'-NTR ein entscheidender Faktor bei der Stimulation der HCV-Translation in RRL ist. Zum anderen wird deutlich, dass für die Stimulation der HCV-

Translation in RRL die typischen Eigenschaften einer microRNA nicht von Bedeutung sind. Daher kann vermutet werden, dass auch spezielle microRNA-assoziierte Faktoren bei der Stimulation der Translation durch miR-122 in RRL eine eher untergeordnete Rolle spielen. Gestützt wird diese Hypothese wiederum durch die Untersuchungen von Diaz-Toledano et al. (2009), deren Experimente zur Konformationsänderung der HCV-RNA in Anwesenheit von miR-122 zum größten Teil *in vitro* in Abwesenheit von Zellextrakten durchgeführt wurden. Ein Einbau von miR-122 in Effektor-Komplexe in RRL ist dennoch nicht ausgeschlossen. Denkbar wäre, dass die mit miR-122 assoziierten Proteine unterstützend bei der Verdrängung der inhibierenden Core-Sequenz wirken.

## **6.6 Fazit**

Die miR-122 stimuliert die HCV-Translation in RRL, indem sie die Ausbildung einer inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion zwischen einem Abschnitt der Core-kodierenden Sequenz und einer dazu komplementären Region in der HCV-5'-NTR blockiert. Dabei ist die verstärkte Basenpaarung der miR-122 an die HCV-5'-NTR entscheidend. Neben der Bindung der „seed“-Region der miR-122 an die Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR ist die 3'-Region der miR-122, die zusätzlich mit der HCV-5'-NTR hybridisieren kann, essentiell. Die exakte Länge von 22 Nukleotiden der miR-122 ist dagegen nicht entscheidend für die Translationsstimulation in RRL. Die Resultate weisen darauf hin, dass die HCV-Translationsstimulation durch miR-122 in RRL im Wesentlichen auf einem „Struktur-Effekt“ beruht, der hauptsächlich durch RNA-RNA-Interaktionen und weniger durch spezielle microRNA-assoziierte Faktoren vermittelt wird.

## **7 Einfluss der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion auf die Stimulation der HCV-Translation durch microRNA-122 in humanen Zellen**

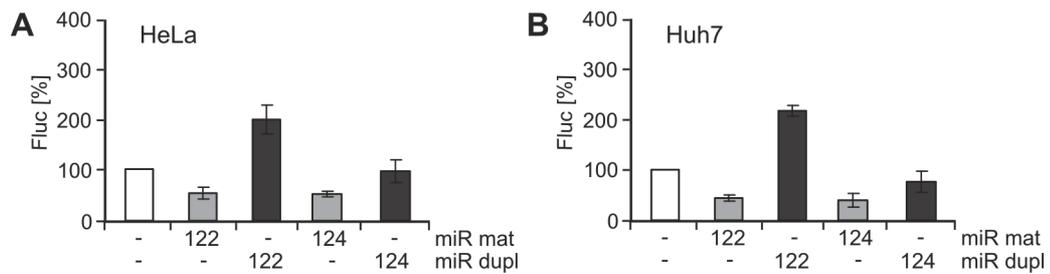
Die Erkenntnisse aus vergleichenden Translationsstudien in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat und in Zellkultur gaben bis dato keinen eindeutigen Hinweis auf unterschiedliche Mechanismen der HCV-Translationsstimulation durch miR-122 in diesen Translationssystemen. In beiden Systemen wurde gezeigt, dass die miR-122 die HCV-Translation spezifisch durch Interaktion mit Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR stimuliert (siehe Kapitel II.3.2 und Henke, Goergen et al., 2008). Des Weiteren konnte in beiden Systemen eine Förderung der Assoziation ribosomaler Untereinheiten mit der HCV-RNA durch miR-122 nachgewiesen werden (siehe Kapitel II.4.1 und Henke, Goergen et al., 2008).

Wie im vorigen Kapitel beschrieben konnte der molekulare Mechanismus der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in RRL weitgehend aufgeklärt werden. Um zu prüfen, ob die *in vitro* gewonnenen Kenntnisse auch auf die stimulatorische Wirkung der miR-122 auf die HCV-Translation in lebenden Zellen übertragbar sind, wurden vergleichende Studien in humanen Hepatoma-Zellen Huh7, die endogene miR-122 enthalten, und in HeLa-Zellen, die keine miR-122 exprimieren, durchgeführt.

### **7.1 Die Kotransfektion einzelsträngiger miR-122 hat keinen stimulierenden Effekt auf die Translation der HCV-RNA in humanen Zellen**

Die Experimente in RRL hatten gezeigt, dass die Translationsstimulation der miR-122 im Wesentlichen auf einem „Struktur-Effekt“ beruht, bei dem die Basenpaarung der einzelsträngigen reifen miR-122 an die HCV-5'-NTR entscheidend ist. Für die Analysen des miR-Effektes in Zellkultur wurden dagegen bis dahin immer microRNA-Duplexe kotransfiziert, die in der Zelle zu einzelsträngigen reifen microRNAs entwunden und in miRNP-Komplexe eingebaut werden. Es wurde vermutet, dass, wenn die miR-122 die HCV-Translation auch in Zellen basierend auf einem „Struktur-Effekt“ stimuliert, auch in Zellen eine Kotransfektion von microRNA-Einzelsträngen zu einer gesteigerten Translationseffizienz der HCV-Reporter-RNA führt. Um dies zu prüfen, wurden microRNA-Duplexe (miR dupl) und reife einzelsträngige microRNA (miR mat) parallel mit der HCV-Reporter-RNA in HeLa und Huh7-Zellen kotransfiziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl in HeLa-Zellen als auch in Huh7-Zellen ausschließlich die Transfektion von miR-122-Duplexen zu einer Translationsstimulation der HCV-Reporter-RNA führt (Abb. 45). Die Kotransfektion von miR-124-Duplexen hatte wie in vorangehenden Versuchen keinen Effekt auf die Translationseffizienz.



**Abbildung 45: Die Kotransfektion einzelsträngiger miR-122 hat keinen stimulierenden Effekt auf die HCV-Translation in humanen Zellen.** (A) *Firefly*-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % 4 h nach Transfektion der HCV-Reporter-RNA in HeLa-Zellen in An- oder Abwesenheit von doppelsträngigen microRNA-Duplexen (miR dupl) oder reifer einzelsträngiger microRNA (miR mat) der miR-122 oder miR-124; n=2. Die Messwerte wurden mittels WST1-Test normalisiert, um Unterschiede in der Zellzahl und Zellviabilität auszugleichen. Die Messwerte der Reaktionen ohne microRNA wurden gleich 100 % gesetzt. (B) Wie (A), nur in Huh7-Zellen.

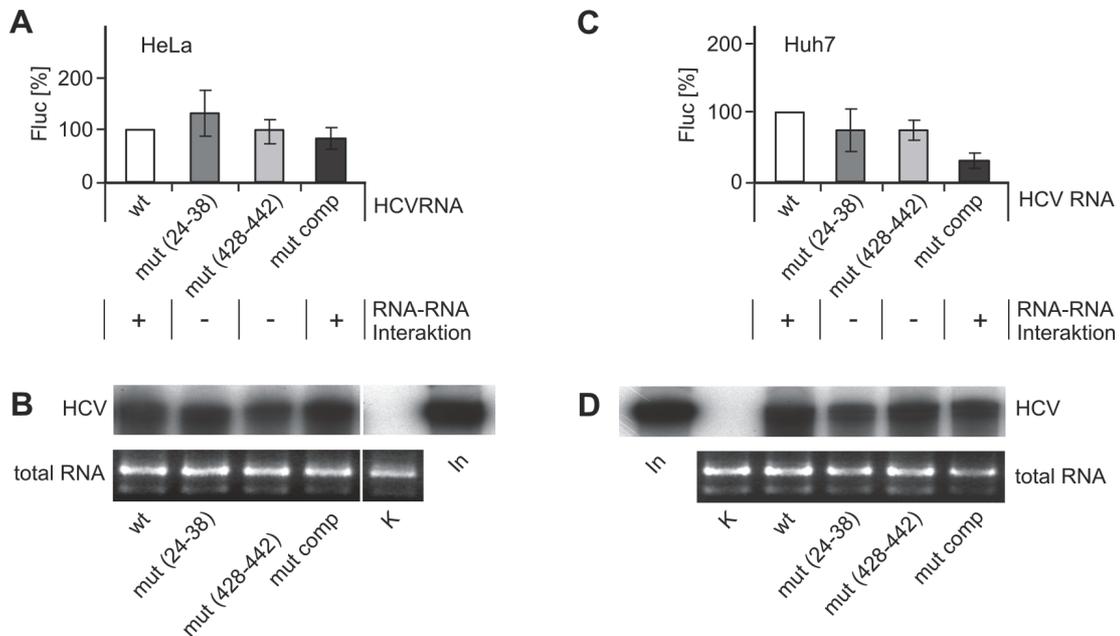
Die Zugabe von reifer einzelsträngiger miR-122 (miR-122mat) führte dagegen in beiden Zelllinien zu einer verringerten Translationseffizienz der HCV-Reporter-RNA. Auch bei der Kotransfektion der einzelsträngigen miR-124 (miR-124mat) wurde in beiden Zelllinien eine Repression der HCV-Translation detektiert, was auf einen generellen inhibierenden Einfluss von transfizierten einzelsträngigen RNA-Oligonukleotiden auf die Translation in Zellen hinweist. Die Resultate zeigen, dass die Transfektion einzelsträngiger microRNA-122 im Gegensatz zu miR-122-Duplexen in humanen Zellen keinen stimulatorischen Effekt auf die HCV-Translation hat.

## 7.2 Die RNA-RNA-Interaktion zwischen der HCV-5'-NTR und der Core-Sequenz hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Effizienz der HCV-Translation in humanen Zellen

In allen bisherigen Publikationen wird einheitlich beschrieben, dass die Interaktion zwischen der HCV-5'-NTR und Core-Sequenz eine inhibierende Wirkung auf die HCV-Translation in RRL hat (Honda et al., 1999b; Wang et al., 2000; Kim et al., 2003). Die Ergebnisse bezüglich der Relevanz dieses Effektes bei der HCV-Translation in intakten Zellen sind jedoch nicht in allen Studien eindeutig. Im Folgenden wurde daher der Einfluss der RNA-RNA-Interaktion zwischen HCV-5'-NTR und Core-Sequenz auf die HCV-Translation in humanen Zelllinien untersucht. Dazu wurden wie in RRL die Translationseffizienzen der mutierten HCV-Reporter-RNAs im Vergleich zur Wildtyp-RNA in HeLa- und Huh7-Zellen ermittelt.

Die Ergebnisse der Transfektion der Reporter-RNAs in HeLa-Zellen, die keine miR-122 enthalten (Abb. 46A), zeigen grundlegende Unterschiede im Vergleich zu den Resultaten aus *in vitro* Translationen in RRL. Im Gegensatz zu Translationsexperimenten in RRL führten weder Punktmutationen in der HCV-5'-NTR (mut (24-38)) noch Mutationen in der interagierenden Core-Sequenz (mut (428-442)), die beide die Ausbildung einer inhibierenden RNA-RNA-Interaktion beeinträchtigen würden, zu einer gesteigerten Translationseffizienz der HCV-Reporter-RNA. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die RNA-RNA-Interaktion zwischen HCV-5'-NTR und Core-Sequenz keine regulierende Funktion bei der HCV-Translation in lebenden Zellen hat.

Übereinstimmend konnte bei Transfektion der HCVmut comp RNA in HeLa-Zellen keine Veränderung der Translationseffizienz im Vergleich zur HCVwt-RNA festgestellt werden. Der Nachweis reextrahierter radioaktiv markierter HCV-Reporter-RNA aus den transfizierten HeLa-Zellen zeigte, dass die gemessenen Translationseffizienzen verschiedener HCV-Reporter-RNAs nicht durch Einsatz unterschiedlicher Mengen oder durch Degradation hervorgerufen wurden (Abb. 46B).



**Abbildung 46: Die RNA-RNA-Interaktion zwischen der HCV-5'-NTR und Core-Sequenz hat keinen wesentlichen Einfluss auf die HCV-Translation in intakten Zellen.** (A) *Firefly*-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % 4 h nach Transfektion der Wildtyp- und mutierten HCV-Reporter-RNA in HeLa-Zellen; n=11. Die Messwerte wurden mittels WST1-Test normalisiert, um Unterschiede in der Zellzahl und Zellviabilität auszugleichen. Die Messwerte der Reaktionen mit Wildtyp-HCV-Reporter-RNA wurden gleich 100 % gesetzt. Die mögliche Ausbildung einer RNA-RNA-Interaktion ist gekennzeichnet durch plus (+) und minus (-). (B) Stabilitätskontrolle von HCV-Reporter-RNAs nach Transfektion in HeLa-Zellen. HCV: Nachweis der reextrahierten [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-markierten Wildtyp- und mutierten HCV-Reporter-RNAs über Autoradiographie. Total RNA: Nachweis der reextrahierten Gesamt-RNA durch Ethidiumbromidfärbung als Ladekontrolle. K, Reextraktion der RNA aus nicht transfizierten Zellen. In, transfizierte [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-markierte HCV-Reporter-RNA. (C) Wie (A), nur in Huh7-Zellen; n=10. (D) Wie (B), nur in Huh7-Zellen.

Wie in HeLa-Zellen konnte auch in Huh7-Zellen keine gesteigerte Translationseffizienz der HCV-Reporter-RNA durch Mutation der interagierenden Sequenzen in der HCV-5'-NTR (mut (24-38)) oder in der Core-kodierenden Sequenz (mut (428-442)) gemessen werden (Abb. 46C). Da die Huh7-Zellen endogene miR-122 enthalten, könnte man aber vermuten, dass die Bindung der endogenen miR-122 an die 5'-NTR der Wildtyp-RNA ausreichend ist, um den inhibitorischen Effekt der RNA-RNA-Interaktion aufzuheben. Folglich würden die Mutationen in den interagierenden Sequenzen in den RNAs mut (24-38) und mut (428-442) den Ergebnissen entsprechend nicht zu einer weiteren Steigerung der Translationseffizienz im Vergleich zur HCVwt-RNA führen.

Bei Transfektion der HCVmut comp-RNA, bei der die RNA-RNA-Interaktion durch komplementäre Mutationen wieder hergestellt ist, wurde in Huh7-Zellen eine verringerte Translationseffizienz im Vergleich zur Wildtyp-RNA gemessen. Geht man auch hier von einem Zusammenhang zwischen der

Wirkung der RNA-RNA-Interaktion und der endogenen miR-122 aus, könnte dieses Ergebnis dadurch erklärt werden, dass die komplementären Mutationen in der HCVmut comp-RNA zu einer effizienten Ausbildung der RNA-RNA-Interaktion führen, während die Interaktion der endogenen miR-122 mit der HCV-5'-NTR durch die Mutationen beeinträchtigt ist. In diesem Fall könnte die inhibitorische RNA-RNA-Interaktion doch wirksam werden, da keine effiziente Aufhebung der RNA-RNA-Interaktion durch Bindung der endogenen miR-122 stattfinden kann. Die Reextraktion der transfizierten RNA und der anschließende Nachweis zeigten, dass die beobachteten Differenzen der Translationseffizienzen verschiedener HCV-Reporter-RNAs nicht durch Einsatz unterschiedlicher Mengen oder Degradation hervorgerufen wurden (Abb. 46D).

Zusammenfassend weisen die Translationsexperimente in HeLa-Zellen, die keine miR-122 enthalten, darauf hin, dass die RNA-RNA-Interaktion zwischen der HCV-5'-NTR und der Core-Sequenz in intakten Zellen keinen wesentlichen Einfluss auf die Translation der HCV-RNA hat.

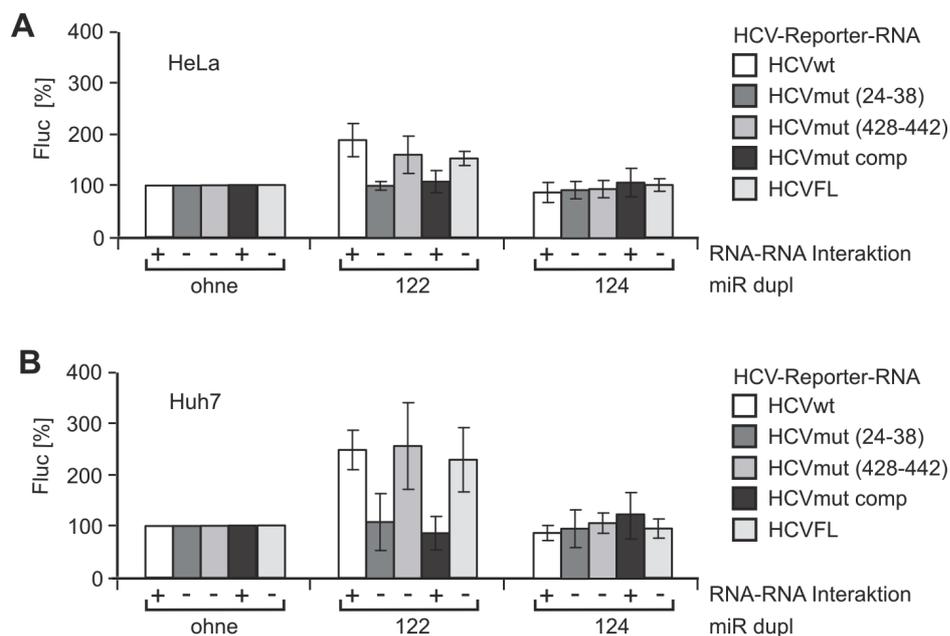
### **7.3 Die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in humanen Zellen erfolgt unabhängig von der Ausbildung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion**

Die bisherigen Experimente in Zellkultur wiesen darauf hin, dass die RNA-RNA-Interaktion zwischen der HCV-5'-NTR und Core-Sequenz in Zellen anders als in RRL möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle bei der Regulation der HCV-Translation spielt. Um dies weiterhin zu prüfen, wurde wie in RRL der Effekt der miR-122 auf die Translation der verschiedenen HCV-Reporter-RNAs in HeLa- und Huh7-Zellen untersucht.

Die Kotransfektion von miR-122dupl mit den HCV-Reporter-RNAs in HeLa-Zellen zeigte, dass die Translation der HCVwt-RNA wie in RRL stimuliert wird (Abb. 47A). Mutationen, die in RRL eine Aufhebung der RNA-RNA-Interaktion und einen Verlust der Translationsstimulation durch miR-122 bewirken hatten jedoch in HeLa-Zellen keinen einheitlichen inhibierenden Einfluss auf den Effekt der miR-122. Während Punktmutationen in der HCV-5'-NTR in der HCV-Reporter-RNA mut (24-38) zu einem Verlust der Translationsstimulation führten, wurde die Translationseffizienz der HCVmut (428-442) RNA, die Punktmutationen in der Core-Sequenz enthält, in Anwesenheit von miR-122dupl gesteigert. Auch die Translation der HCV-FL-RNA mit einer Deletion der interagierenden Core-Sequenz wurde durch Zugabe von miR-122dupl stimuliert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in HeLa-Zellen anders als in RRL nur Mutationen in der HCV-5'-NTR, die die Bindung der miR-122 an die HCV-RNA beeinträchtigen, zu einem Verlust der Translationsstimulation führen, während Mutationen in der Core-kodierenden Sequenz keinen Einfluss auf den stimulatorischen Effekt der miR-122 haben. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen konnte die Translationseffizienz der HCVmut comp-RNA, die wie die RNA HCVmut (24-38) Mutationen in der HCV-5'-NTR enthält, in HeLa-Zellen nicht durch die Zugabe von miR-122 gesteigert werden. Die Kotransfektion der miR-124dupl als Kontrolle hatte keinen Effekt auf die Translationseffizienz der HCV-Reporter-RNAs. Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in HeLa-

Zellen anders als in RRL unabhängig von der Ausbildung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion stattfindet.

Bei entsprechenden Transfektionen der HCV-Reporter-RNAs in Huh7-Zellen konnte bei Kotransfektion von miR-122dupl das gleiche Stimulations-Muster wie in HeLa-Zellen beobachtet werden (Abb. 47B). Auch in Huh7-Zellen wurde die Translation der RNAs HCVmut (428-442) und HCVFL mit Mutationen in der Core-Sequenz durch Zugabe von miR-122dupl stimuliert, während die Translationseffizienz der RNAs HCVmut (24-38) und HCVmut comp, die beide Mutationen in der HCV-5'-NTR enthalten, nicht durch miR-122dupl gesteigert werden konnte. Die Kotransfektion der miR-124dupl hatte wie in HeLa-Zellen keinen Effekt auf die Translation der HCV-Reporter-RNAs.



**Abbildung 47: Die RNA-RNA-Interaktion zwischen der HCV-5'-NTR und Core-Sequenz hat keinen Einfluss auf die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in humanen Zellen.** (A) Firefly-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % 4 h nach Transfektion der Wildtyp- und mutierten HCV-Reporter-RNA in HeLa-Zellen in An- oder Abwesenheit von microRNA-Duplexen (miR dupl) der miR-122 oder miR-124; n=5. Die Messwerte wurden mittels WST1-Test normalisiert, um Unterschiede in der Zellzahl und Zellviabilität auszugleichen. Die Messwerte der Reaktionen ohne Zugabe von microRNA-Duplexen wurden gleich 100 % gesetzt. Die mögliche Ausbildung einer RNA-RNA-Interaktion ist gekennzeichnet durch plus (+) und minus (-) (B) Wie (A), nur in Huh7-Zellen; n=4.

Insbesondere das Ergebnis, dass die HCV-RNAs mut (428-442) und HCVFL, bei denen die inhibitorische RNA-RNA-Interaktion theoretisch durch Mutationen aufgehoben ist, in Huh7-Zellen in gleichem Maße wie die Wildtyp-RNA durch miR-122 stimuliert wurden, zeigt, dass die miR-122 auch in Huh7-Zellen die HCV-Translation unabhängig von der Ausbildung einer inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion stimuliert. Damit wird weiterhin deutlich, dass die beobachteten Translationseffizienzen der verschiedenen HCV-Reporter-RNAs in Kapitel II.7.2 nicht auf einen Effekt der endogenen miR-122 zurückzuführen sind und dass die RNA-RNA-Interaktion auch in Huh7-Zellen wahrscheinlich eher eine geringe Rolle bei der Regulation der HCV-Translation spielt.

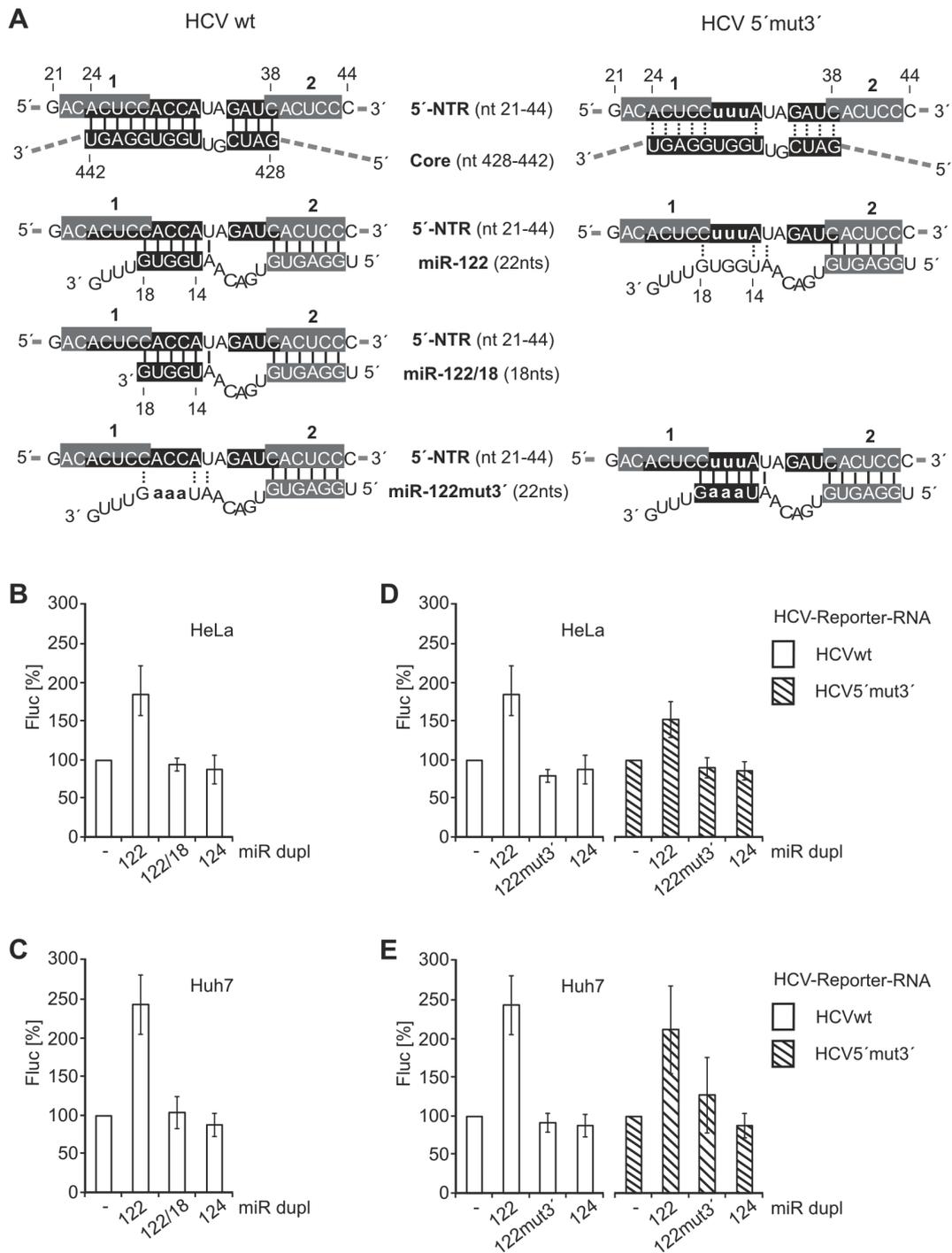
Zusammenfassend zeigen die Resultate aus Experimenten in Zellkultur, dass die miR-122 die HCV-Translation in intakten Zellen unabhängig von der Ausbildung einer inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion stimuliert. Folglich liegt der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in humanen Zellen ein anderer Mechanismus zugrunde als im *in vitro* Translationsystem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat.

#### **7.4 Die Funktion der 3'-Region der miR-122 bei der Stimulation der HCV-Translation in humanen Zellen**

Die Untersuchung des Einflusses der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion auf die Translationsstimulation der HCV-RNA durch miR-122 in Zellkultur ergab, dass die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in RRL und in Zellen auf unterschiedlichen Mechanismen beruht.

Um zu prüfen, ob die 3'-Region der miR-122 wie in RRL eventuell auch in Zellen eine essentielle Funktion bei der Stimulation der HCV-Translation hat, wurde der Effekt der miR-122-Varianten mit einem veränderten 3'-Ende auf die HCV-Translation in HeLa- und Huh7-Zellen untersucht. Dazu wurde die HCVwt-RNA zunächst mit der Wildtyp-miR-122dupl und miR-122/18dupl, deren 3'-Ende um 4 Nukleotide verkürzt ist, kotransfiziert (Abb. 48A, linke Spalte). Die Translation der HCVwt-RNA konnte wie in vorigen Experimenten durch Anwesenheit der miR-122dupl in HeLa-Zellen sowie in Huh7-Zellen stimuliert werden (Abb. 48B,C). Die Zugabe der miR-122/18dupl hatte jedoch in beiden Zelllinien keine translationssteigernde Wirkung. Anders als in RRL scheint also für eine Funktion der miR-122 bei der Regulation der HCV-Translation in humanen Zellen eine exakte Länge der miR-122 von 22 Nukleotiden entscheidend zu sein. Die Kontroll-miR-124dupl hatte wie in vorigen Experimenten keinen Einfluss auf die HCV-Translation.

Die miR-122mut3' hat im Vergleich zur miR-122/18 eine exakte Länge von 22 Nukleotiden, enthält aber eine Mutation in der Sequenz der 3'-Region, was eine mögliche Interaktion der 3'-Region mit der HCV-5'-NTR verhindert (Abb. 48A). Die Kotransfektion der miR-122mut3'dupl mit der HCV-Wildtyp-RNA in HeLa-Zellen und Huh7-Zellen zeigte übereinstimmend, dass die Mutation der 3'-Region im Vergleich zur Wildtyp-miR-122dupl zu einem Verlust der Translationsstimulation führt (Abb. 48D,E). Dieses Resultat ist vergleichbar mit dem Ergebnis in RRL und zeigt, dass die Sequenz der 3'-Region der miR-122 neben der „seed“-Region auch in Zellen eine wesentliche Funktion bei der Stimulation der HCV-Translation hat.



**Abbildung 48: Die Funktion der 3'-Region der miR-122 bei der Stimulation der HCV-Translation in humanen Zellen.** (A) Interaktion der Core-Sequenz (schwarze Kästen) und der verwendeten microRNAs mit der 5'-NTR der Wildtyp-Reporter-RNA (HCVwt) und der HCV5' mut3'-RNA mit Mutation in der HCV-5'-NTR. Ziel-Sequenzen und die „seed“-Region der microRNAs sind durch graue Kästen gekennzeichnet. Für die Interaktion der microRNAs mit der ersten Ziel-Sequenz siehe Kapitel II.6 Abb. 38B. (B) *Firefly*-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % 4 h nach Transfektion der HCVwt-RNA in HeLa-Zellen in An- oder Abwesenheit von miR-Duplexen (miR dupl) der miR-122, miR122/18 mit verkürztem 3'-Ende und miR-124; n=5. Die Messwerte wurden mittels WST1-Test normalisiert, um Unterschiede in der Zellzahl und Zellviabilität auszugleichen. Die Messwerte der Reaktionen ohne Zugabe von microRNA-Duplexen wurden gleich 100 % gesetzt. (C) Wie (B), nur in Huh7-Zellen; n=4. (D) *Firefly*-Luziferase-Aktivität (Fluc) in % 4 h nach Transfektion der RNA HCVwt und HCV5' mut3' mit einer Mutation in der HCV-5'-NTR in HeLa-Zellen in An- oder Abwesenheit von miR-Duplexen (miR dupl) der miR-122, miR122mut3' mit Mutation in der 3'-Region und miR-124; n=5. Die Messwerte der Reaktionen ohne Zugabe von microRNA-Duplexen wurden gleich 100 % gesetzt. (E) Wie (D), nur in Huh7-Zellen; n=4.

Um zu prüfen, ob die miR-122 wie in RRL zusätzlich mit der 3'-Region an die HCV-5'-NTR hybridisiert, wurden entsprechende Versuche mit der HCV5'mut3'-RNA durchgeführt, die komplementäre Mutationen zur miR-122mut3' in der HCV-5'-NTR enthält (Abb. 48A, rechte Spalte). Die Translationseffizienz der HCV5'mut3'-RNA konnte in beiden Zelllinien durch Kotransfektion der Wildtyp-miR-122dupl gesteigert werden, obwohl die Interaktion der 3'-Region durch die Mutation der HCV-5'-NTR blockiert ist (Abb. 48D,E). Dieses Ergebnis zeigt, dass für die Stimulation der HCV-Translation in humanen Zellen keine zusätzliche Hybridisierung der 3'-Region der miR-122 mit der HCV-5'-NTR erforderlich ist. Des Weiteren wurde die HCV5'mut3'-RNA durch Kotransfektion der komplementären miR-122mut3'dupl in HeLa-Zellen nicht und in Huh7-Zellen nur gering stimuliert. Dies zeigt, dass die 3'-Region der miR-122 in humanen Zellen zwar nicht mit der HCV-5'-NTR interagiert, aber dennoch eine essentielle Funktion bei der Stimulation der HCV-Translation hat.

## 7.5 Diskussion

Die Experimente in Zellkultur zeigten, dass die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in humanen Zellen nicht wie in dem *in vitro* System RRL durch die Blockierung einer inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion vermittelt wird, sondern auf einem anderen noch unbekanntem Mechanismus beruht.

Die Untersuchung des Zusammenhangs der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion und der stimulatorischen Wirkung der miR-122 in Huh7- und HeLa-Zellen zeigte im Gegensatz zu den Resultaten in RRL, dass die miR-122 die HCV-Translation in intakten Zellen unabhängig von der Ausbildung einer RNA-RNA-Interaktion stimuliert. In Huh7- und HeLa-Zellen konnte übereinstimmend festgestellt werden, dass ausschließlich Mutationen, die die Interaktion der miR-122 mit der HCV-5'-NTR beeinträchtigen, zu einem Verlust der Translationsstimulation führen. Die Translationseffizienz der HCV-RNAs mut (428-442) und HCVFL, die in RRL aufgrund der Aufhebung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion nicht durch miR-122 stimuliert wurde, wurde dagegen in Huh7 und HeLa-Zellen einheitlich durch Kotransfektion von miR-122 gesteigert. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in humanen Zellen ein anderer Mechanismus zugrunde liegt als in RRL.

Des Weiteren wurde festgestellt, dass die inhibitorische RNA-RNA-Interaktion in intakten Zellen generell keinen wesentlichen Einfluss auf die Effizienz der HCV-Translation hat. In HeLa Zellen führt weder eine Aufhebung der RNA-RNA-Interaktion durch Mutation der interagierenden Sequenzen noch die Wiederherstellung der RNA-RNA-Interaktion durch kompensatorische Mutationen zu einer veränderten Translationseffizienz. In Huh7-Zellen war aufgrund des endogenen miR-122-Gehalts zunächst nicht ganz klar, ob der geringe Effekt der Mutationen in den interagierenden Sequenzen auf einen unwesentlichen Einfluss der RNA-RNA-Interaktion auf die HCV-Translation in Zellen hindeutet oder auf einer generellen Aufhebung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion durch die endogene miR-122 beruht. Dass die Stimulation der Translation durch miR-122 auch in Huh7-Zellen

unabhängig von der Ausbildung der RNA-RNA-Interaktion erfolgt zeigt allerdings, dass auch die Ergebnisse in Huh7-Zellen weniger auf einen Effekt der endogenen miR-122 als auf eine untergeordnete Rolle der RNA-RNA-Interaktion bei der Regulation der HCV-Translation in Zellen zurückzuführen sind.

Dass die RNA-RNA-Interaktion in humanen Zellen anders als in RRL keinen wesentlichen Einfluss auf die HCV-Translation hat, kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass RRL im Vergleich zu anderen Zellextrakten nachweislich weniger RNA-bindende Proteine wie das La autoantigen, PTB (Polypyrimidintrakt-bindendes Protein) und hnRNP A1 (heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A1) enthält (Svitkin et al., 1996). So wäre denkbar, dass eine vermehrte Assoziation der HCV-RNA mit RNA-bindenden Proteinen in Zellen generell zu einer Instabilität bzw. einer Aufhebung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion führt, während diese aufgrund der nur gering vorhandenen Faktoren in RRL bestehen bleibt und erst durch Interaktion mit der miR-122 mit der HCV-5'-NTR aufgehoben werden kann. Übereinstimmend mit der Hypothese wird in der Literatur eine Interaktion der oben genannten RNA-bindenden Proteine mit der HCV-5'-NTR beschrieben (Ali & Siddiqui, 1995; Ali & Siddiqui, 1997; Kim et al., 2007). Für das La autoantigen und PTB konnten außerdem ein stimulierender Einfluss auf die HCV-Translation nachgewiesen werden (Ali & Siddiqui, 1995; Ali & Siddiqui, 1997), während das hnRNP A1 einen positiven Effekt auf die Replikation des HCV hat (Kim et al., 2007).

In anderen Publikationen wurde beschrieben, dass die RNA-RNA-Interaktion sowohl in RRL als auch in HepG2 und Huh7-Zellen einen reprimierenden Einfluss auf die HCV-Translation hat (Honda et al., 1999b; Wang et al., 2000; Kim et al., 2003). Der Einfluss der RNA-RNA-Interaktion in HepG2-Zellen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Die hier durchgeführten Experimente in HeLa-Zellen und Huh7-Zellen können diese Beobachtung allerdings nicht bestätigen. Auffallend ist, dass in den anderen Studien im Unterschied zu dieser Arbeit Plasmid-DNA für die Transfektion der Zellen verwendet wurde. Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Transfektion von Plasmid-DNA bei der Untersuchung der HCV-Translation im Vergleich zur Transfektion von HCV-RNA zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann (Song et al., 2006). Des Weiteren wurden in einigen Studien statt monocistronischer Reporter-RNA dicistronische Konstrukte zur Messung der Translationseffizienz der HCV-Reporter-RNA verwendet. Dabei ist nicht klar, welchen Einfluss die vorgeschaltete Reporter-Sequenz auf die Translationsinitiation an der HCV-IRES hat. Daher kann nur vermutet werden, dass die Diskrepanz zwischen den Resultaten dieser Arbeit und früheren Publikationen durch unterschiedliche experimentelle Ansätze hervorgerufen wird.

Die Stimulation der HCV-Translation in Retikulozyten-Lysat durch Blockierung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion ist im Wesentlichen ein „Struktur-Effekt“. Dabei ist die Fähigkeit der Basenpaarung der miR-122 an die HCV-5'-NTR die entscheidende Determinante. So ist die Interaktion der miR-122 mit der HCV-5'-NTR in RRL durch zusätzliche Hybridisierung der 3'-Region der miR-122 verstärkt. Da die exakte Länge der miR-122 hier keine Rolle spielt und auch

andere RNA-Oligonukleotide, die mit der RNA-RNA-Interaktion interferieren, die HCV-Translation in RRL stimulieren, wird weiterhin vermutet, dass spezifische miR-122-assoziierte Proteine keine essentielle Funktion haben.

Die Daten aus Experimenten in Zellkultur weisen dagegen darauf hin, dass der stimulatorische Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation in humanen Zellen nicht allein auf der Basenpaarung der miR-122 mit der HCV-5'-NTR beruht. Anders als in RRL hat ausschließlich die Transfektion von miR-122-Duplexen eine fördernde Wirkung auf die HCV-Translation, was auf eine Prozessierung der microRNA-Vorläufer und einen Einbau in miRNP-Komplexe hindeutet. In lebenden Zellen ist zudem die exakte Länge der miR-122 ein entscheidender Faktor für die stimulierende Funktion der miR-122. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Sequenz der 3'-Region der miR-122 eine essentielle Funktion hat, aber nicht wie in RRL mit der HCV-5'-NTR hybridisiert. Dies weist auf eine Interaktion der miR-122 mit zellulären Proteinen und eine mögliche Beteiligung von miRNP-Komplexen an der Stimulation der HCV-Translation in Zellen hin.

## **7.6 Fazit**

Die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in dem *in vitro* Translationssystem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat und in humanen Zelllinien beruht auf unterschiedlichen Mechanismen. Während die Stimulation der HCV-Translation in RRL im Wesentlichen durch die verstärkte Basenpaarung der miR-122 an die HCV-5'-NTR vermittelt wird und auf der Blockierung einer inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion zwischen der HCV-5'-NTR und der Core-kodierenden Sequenz basiert, hat die RNA-RNA-Interaktion in Zellen keinen bedeutenden Einfluss bei der Regulation der HCV-Translation. Die Resultate in Zellen weisen dagegen auf einen noch unbekanntem Mechanismus hin, an dem möglicherweise miR-122 assoziierte Proteine in miRNP-Komplexen beteiligt sind.

### III SCHLUSSDISKUSSION

In dieser Arbeit wurde zunächst die biologische Relevanz der stimulierenden Wirkung der leberspezifischen microRNA-122 auf die Translation des Hepatitis C Virus RNA-Genoms durch Translationsstudien mit vollständiger genomischer HCV-RNA in humanen Hepatoma-Zellen Huh7 bestätigt.

Durch vergleichende Experimente in Zellkultur und dem *in vitro* Translationssystem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (RRL) wurde dann gezeigt, dass die Stimulation der HCV-Translation *in vitro* wie in lebenden Zellen durch Interaktion der miR-122 mit Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR stromaufwärts der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) vermittelt wird.

Die detaillierte Analyse des Wirkmechanismus der miR-122 bei der Stimulation der HCV-Translation ergab, dass die translationsfördernde Wirkung der miR-122 *in vitro* in RRL und in humanen Zelllinien auf unterschiedlichen Mechanismen beruht.

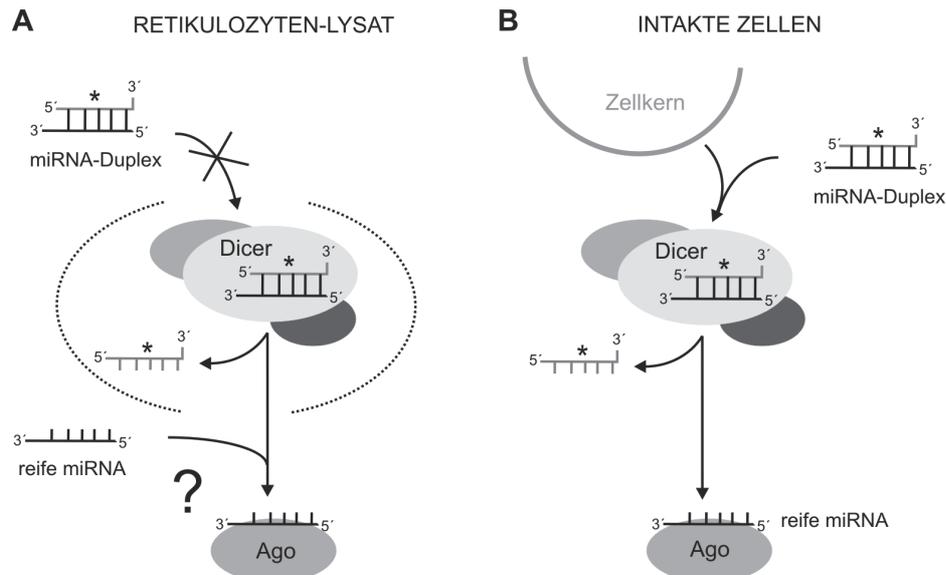
Untersuchungen der Bildung von Translationskomplexen an der HCV-RNA zeigten, dass die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in RRL im Stadium der Initiation durch Förderung der Bildung von 48S-Translationskomplexen stattfindet. Durch *in vitro* Translationsstudien wurde festgestellt, dass die miR-122 in RRL durch verstärkte Basenpaarung mit der HCV-5'-NTR die Ausbildung einer inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion zwischen Sequenzen der HCV-5'-NTR und der Core-kodierenden Region blockiert, woraus eine Steigerung der Translationseffizienz resultiert. Experimente in Zellkultur ergaben dagegen, dass die inhibitorische RNA-RNA-Interaktion in lebenden Zellen keinen Einfluss auf die Regulation der HCV-Translation hat. Translationsstudien mit miR-122-Varianten zeigten zudem, dass sich die Eigenschaften der Bindung der miR-122 an die HCV-5'-NTR in intakten Zellen von denen in RRL unterscheiden, und deuten auch dadurch auf eine Beteiligung von miR-122-assoziierten Proteinen in miRNP-Komplexen bei der Stimulation der HCV-Translation in lebenden Zellen hin.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen zum Verständnis des Vermehrungszyklus des HCV in humanen Leberzellen bei und geben Hinweise auf die Funktionsweisen von microRNAs bei der Regulation der Translation.

#### 1 Unterschiedliche Wirkmechanismen der microRNA-122 bei der Stimulation der HCV-Translation *in vitro* und in lebenden Zellen

Schon zu Beginn der Arbeit wurde beobachtet, dass es möglicherweise Unterschiede bei der Prozessierung von microRNAs in intakten Zellen und in RRL gibt. Die Zugabe von doppelsträngigen Vorläufern (microRNA-Duplexen) der miR-122 hatte in dem *in vitro* Translationssystem RRL, anders als in intakten Zellen, keinen Einfluss auf die HCV-Translation. Bei Zugabe reifer einzelsträngiger miR-122 (miR-122mat) konnte dagegen eine Stimulation der HCV-Translation in RRL detektiert werden (Abb. 49A).

Damit übereinstimmend zeigten Studien der Gruppe Novina, dass RNA-Duplexe in RRL nur bei vorheriger Inkubation bei 75 °C in Anwesenheit der Ziel-RNA funktionell sind (Wang et al., 2006, 2007). Es wird vermutet, dass in RRL möglicherweise ein Faktor fehlt oder inaktiv vorliegt, der die Entwindung der doppelsträngigen Vorläufer in reife einzelsträngige microRNAs katalysiert (Wang et al., 2006). Bei der Transfektion der microRNA-Duplexe in intakte Zellen werden diese dagegen als doppelsträngige microRNA-Vorläufer erkannt und durch die zelluläre microRNA-Produktionsmaschinerie zu reifen einzelsträngigen microRNAs prozessiert (Yoda et al., 2010) (Abb. 49B).



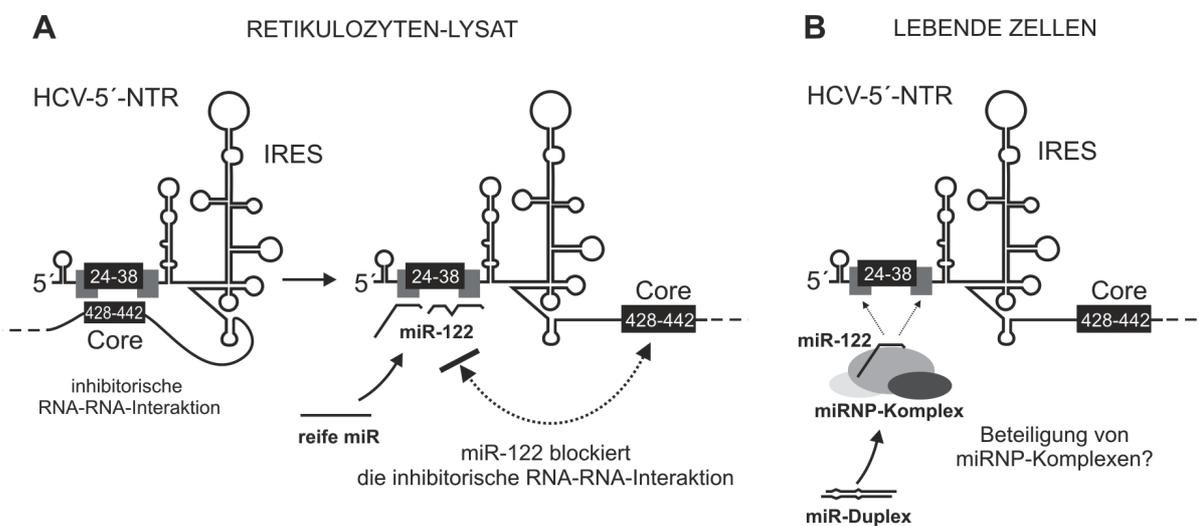
**Abbildung 49: Modell der Prozessierung zugegebener microRNAs in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat und in intakten Zellen.** (A) In Retikulozyten-Lysat (RRL) ist die Prozessierung von microRNA-Duplexen nicht funktionell. Eine Wirkung auf die Translation erfordert die Zugabe reifer einzelsträngiger microRNA. (B) In intakten Zellen werden die zugegebenen microRNA-Duplexe als microRNA-Vorläufer erkannt und zu reifen einzelsträngigen microRNAs prozessiert, die in funktionelle miRNP-Komplexe eingebaut werden.

Abgesehen von der offensichtlich nicht funktionalen Prozessierung von RNA-Duplexen zeigten Wang et al. (2006), dass die unvollständige Basenpaarung von microRNAs mit Ziel-Sequenzen in der 3'-NTR die Translation einer Reporter-RNA in RRL reprimiert, während eine vollständige Komplementarität der microRNA zu einer Degradation der Reporter-RNA führt. Des Weiteren zeigten die Autoren, dass die Paarung der „seed“-Region der microRNA an die Ziel-RNA die entscheidende Determinante bei der Repression der Translation in RRL ist und diese, wie von anderen Gruppen in lebenden Zellen nachgewiesen (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005), von der Anwesenheit des Cap-Nukleotids und der Polyadenylierung der Ziel-RNA abhängt (Wang et al., 2006). Diese Daten deuteten auf eine Funktionalität der reifen microRNAs in RRL wie in intakten Zellen hin und gaben zunächst keinen Hinweis auf generell unterschiedliche Wirkmechanismen von microRNAs in diesen Systemen.

Da in lebenden Zellen wie in RRL schlussendlich einzelsträngige reife microRNAs den Effekt auf die Translation vermitteln und in beiden Systemen übereinstimmend eine Stimulation der HCV-

Translation durch miR-122 detektiert werden konnte, war eine grundlegende Differenz des Mechanismus der Translationsstimulation in den verwendeten Translationssystemen zunächst nicht erkennbar. Erst die vergleichende Analyse des Wirkmechanismus in RRL und in Zellkultur zeigte, dass die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse nicht auf die Vorgänge in intakten Zellen übertragbar sind.

Der Mechanismus der Wirkung der miR122 auf die Translation der HCV-RNA in RRL konnte in der vorliegenden Arbeit weitgehend aufgeklärt werden. Dieser basiert im Wesentlichen auf einem „Struktur-Effekt“ (Abb. 50A). Die Ziel-Sequenzen der miR-122 in der HCV-5'-NTR überlappen mit einem Sequenzabschnitt, der mit einer Core-kodierenden Region Basenpaarungen eingeht. Mutagenesestudien bestätigten, dass diese RNA-RNA-Interaktion die Translation der HCV-RNA in RRL inhibiert (Abb. 50A) (Honda et al., 1999b; Wang et al., 2000; Kim et al., 2003).



**Abbildung 50: Mechanismen der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat und in lebenden Zellen.** (A) Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 *in vitro* in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat. Die miR-122 stimuliert die HCV-Translation durch Blockierung einer inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion. Darstellung der 5'-nicht-translatierten-Region der HCV-RNA (HCV-5'-NTR) inklusive der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) und des ersten Abschnitts des offenen Leserahmens kodierend für das Core-Protein (Core). Schwarze Kästen markieren die Sequenzen der HCV-5'-NTR und der Core-kodierenden Region, die eine inhibitorische RNA-RNA-Interaktion eingehen. Graue Kästen markieren die Ziel-Sequenzen der miR-122. Die mögliche Hybridisierung der miR-122 an die HCV-5'-NTR ist schematisch dargestellt. (B) Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in lebenden Zellen. Die miR-122 stimuliert die HCV-Translation unabhängig von der Ausbildung einer RNA-RNA-Interaktion zwischen der HCV-5'-NTR und der Core-kodierenden Sequenz höchstwahrscheinlich durch Beteiligung von microRNA-assoziierten Proteinen in miRNP-Komplexen.

Weitere Experimente zeigten, dass die miR-122 die HCV-Translation in RRL stimuliert, indem sie durch Bindung an die HCV-5'-NTR die Ausbildung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion blockiert. Übereinstimmend zeigten Struktur-Studien der Gruppe Diaz-Toledano et al. (2009), dass die miR-122 eine Konformationsänderung der HCV-RNA von einer „geschlossenen“ Form, in der die HCV-5'-NTR mit der Core-Sequenz paart, zu einer „offenen“ Form, in der die RNA-RNA-Interaktion aufgehoben ist, hervorruft.

Die Resultate dieser Arbeit ergaben weiterhin, dass für die Blockierung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion und damit für die Stimulation der HCV-Translation in RRL vor allem eine verstärkte Basenpaarung der einzelsträngigen miR-122 an die 5'-NTR von Bedeutung ist und miR-122-assoziierte Proteine nicht benötigt werden. So hat eine Verkürzung der miR-122 keinen Einfluss auf den translationsfördernden Effekt, solange eine zusätzliche Hybridisierung der 3'-Region der miR-122 an die HCV-5'-NTR gewährleistet ist. Außerdem stimulieren auch andere nicht microRNA-verwandte RNA-Oligonukleotide, die durch verstärkte Bindung an die HCV-5'-NTR mit der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion interferieren, die HCV-Translation in RRL. Zudem wurden die Strukturanalysen in der Studie Diaz-Toledano et al. (2009) *in vitro*, in Abwesenheit von Zelllysaten durchgeführt, was zeigt, dass die Aufhebung der inhibierenden RNA-RNA-Interaktion durch miR-122 ohne die Beteiligung weiterer Faktoren möglich ist. Folglich handelt es sich bei dem Mechanismus der Wirkung der miR-122 auf die HCV-Translation *in vitro* in RRL, nicht um einen klassischen „microRNA-Effekt“, der die Beteiligung von microRNA-assoziierten Proteinen in miRNP-Komplexen erfordert, sondern um einen antisense-Effekt, der auf der Basenpaarung des RNA-Oligonukleotids mit der HCV-5'-NTR basiert (Abb. 50A).

Die Analyse der Stimulation der HCV-Translation in lebenden Zellen weist dagegen auf einen anderen Wirkmechanismus der miR-122 hin, an dem wahrscheinlich microRNA-assoziierte Proteine in miRNP-Komplexen beteiligt sind (Abb. 50B).

Translationsstudien in Zellkultur zeigten, dass die miR-122 die HCV-Translation in lebenden Zellen unabhängig von der Ausbildung der inhibitorischen RNA-RNA-Interaktion stimuliert. Weiterhin hat die Interaktion der HCV-5'-NTR mit der Core-Sequenz generell eine geringe Bedeutung bei der Regulation der HCV-Translation in humanen Zellen. Die vermehrte Präsenz von RNA-bindenden Proteinen in lebenden Zellen im Gegensatz zu RRL (Svitkin et al., 1996) lässt vermuten, dass eine verstärkte Assoziation von Proteinen mit der HCV-RNA in lebenden Zellen möglicherweise generell die Ausbildung der RNA-RNA-Interaktion verhindert. Experimente mit miR-122-Varianten zeigten, dass sich auch die Eigenschaften der Bindung der miR-122 an die HCV-5'-NTR in Zellen von denen in RRL unterscheiden. Neben der Interaktion der 5'-„seed“-Region mit der HCV-5'-NTR ist auch die Sequenz der 3'-Region der miR-122 essentiell für eine translationsfördernde Wirkung, wobei diese nicht an die HCV-5'-NTR hybridisiert. Dies lässt eine Assoziation der miR-122 mit Proteinen vermuten. Auch die Resultate, dass einzelsträngige microRNA-122 in Zellen keinen stimulatorischen Effekt auf die HCV-Translation hat, und die exakte Länge der transfizierten miR-122 Duplexe entscheidend für die translationsfördernde Wirkung der miR-122 in Zellkultur ist, deutet auf eine Bildung und Beteiligung von miRNP-Komplexen an der Stimulation der HCV-Translation in lebenden Zellen hin.

Dass eine microRNA *in vitro* und in lebenden Zellen die gleiche Wirkung auf die Translation einer Ziel-RNA hat, sich die Wirkmechanismen aber grundlegend unterscheiden, ist womöglich ein Sonderfall der Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122. Die Ergebnisse geben aber auch

einen Hinweis darauf, dass das *in vitro* Translationssystem RRL möglicherweise generell nicht die Funktionsweise von microRNAs in lebenden Zellen widerspiegelt. Schon der Befund, dass die miR-122-Duplexe in RRL nicht funktionell sind, ist im Nachhinein kritisch zu betrachten, da nicht bekannt ist, welchen Einfluss der Vorgang der microRNA-Prozessierung auf die Zusammensetzung der resultierenden miRNP-Komplexe in Säugerzellen hat. Beispielsweise bestimmen in Zellen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* die strukturellen Eigenschaften der RNA-Duplexe die Interaktion mit unterschiedlichen Ago-Proteinen (Förstemann et al., 2007; Tomari et al., 2007). Es wäre also denkbar, dass die einzelsträngigen microRNAs in RRL und in intakten Zellen in miRNP-Komplexen vorliegen, aber mit verschiedenen Proteinen komplexiert sind.

Des Weiteren ist nach Untersuchungen in dieser Arbeit nicht klar, ob die zur Translationsreaktion in RRL zugefügten reifen microRNAs überhaupt mit Ago-Proteinen interagieren und in miRNP-Komplexe eingebaut werden. *In vitro* Studien mit humanen rekombinanten Ago2-Proteinen zeigen, dass zugesetzte einzelsträngige RNA-Oligonukleotide unabhängig von anderen Faktoren an Ago binden und funktionelle Effektor-Komplexe bilden können (Rivas et al., 2005; MacRae et al., 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen dagegen darauf hin, dass die Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in RRL ohne Beteiligung von microRNA-assoziierten Proteinen erfolgt. Es wäre daher denkbar, dass die Detektion einer Repression der Translation bei der Untersuchung von microRNA-Effekten in RRL in anderen Studien auch hauptsächlich auf antisense-Effekten durch Zugabe von einzelsträngigen RNA-Oligonukleotiden basiert. Die Resultate schließen eine Bildung von funktionellen miRNP-Komplexen in RRL nicht aus, zeigen aber die Notwendigkeit des Nachweises von miRNP-Komplexen bei der Untersuchung von microRNA-Effekten in RRL. Im Fall der Stimulation der HCV-Translation war der Nachweis der Beteiligung von miR-122-assoziierten Proteinen in RRL aus technischen Gründen bislang nicht möglich. Die weiteren nachgewiesenen Differenzen des Wirkmechanismus der miR-122 in RRL und in Zellkultur zeigen jedoch, dass eine weitere Untersuchung der Stimulation der HCV-Translation *in vitro* wohl keine neuen gesicherten Erkenntnisse für das Verständnis der Regulation der HCV-Translation durch miR-122 in humanen Leberzellen erbringen würde und die Untersuchung daher in intakten lebenden Zellen fortgeführt werden sollte.

Die neu gewonnenen Erkenntnisse über die Differenz der Wirkmechanismen der miR-122 in RRL und in intakten Zellen haben weiterhin Auswirkungen auf die Interpretation der Resultate in Henke, Goergen et al. (2008). Anhand der zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vorhandenen Daten wurde geschlussfolgert, dass die miR-122 die Initiation der HCV-Translation durch Förderung der Bildung von 48S-Translations-Initiationskomplexen mit der HCV-RNA stimuliert. Dieses Ergebnis wurde mittels Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation von HCV-Translations-Initiationskomplexen aus Reaktionen in RRL erzielt und ist nach den neuen Kenntnissen nicht direkt auf den Effekt der miR-122 in lebenden Zellen übertragbar. Bei der Analyse der Bildung von HCV-Translationskomplexen in HeLa-Zellen konnten, wie auch in RRL, in Anwesenheit einer microRNA, die mit der HCV-5'-NTR

interagiert, vermehrt 80S-Translationskomplexe detektiert werden (Henke, Goergen et al., 2008). Dies korreliert mit der Messung einer gesteigerten Luziferase-Aktivität nach Translation der HCV-Reporter-RNA in Anwesenheit von miR-122 in HeLa-Zellen und deutet auf eine gesteigerte Translationseffizienz der HCV-RNA hin. Eine logische Konsequenz daraus ist, dass die miR-122 auch in intakten Zellen die Assoziation der HCV-RNA mit ribosomalen Untereinheiten fördert. Jedoch kann anhand dieser Daten nicht bestimmt werden, ob die miR-122 in einem sehr frühen Stadium der Translationsinitiation die Bildung von 48S-Initiationskomplexen an der HCV-IRES fördert. Es wäre ebenso denkbar, dass die miR-122 die Anlagerung der ribosomalen 60S-Untereinheit und damit die Bildung von 80S-Translationskomplexen stimuliert. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die miR-122 den Übergang zwischen der Initiation und Elongation der Translation beschleunigt, so dass die HCV-IRES durch die Ablösung der Ribosomen vom Startpunkt der Translation schneller für eine erneute Interaktion mit ribosomalen Komplexen zur Verfügung steht. Diese möglichen Mechanismen der Stimulation der HCV-Translation in lebenden Zellen und die mögliche Funktion von miR-122-assoziierten Proteinen werden in folgenden Kapiteln eingehender diskutiert.

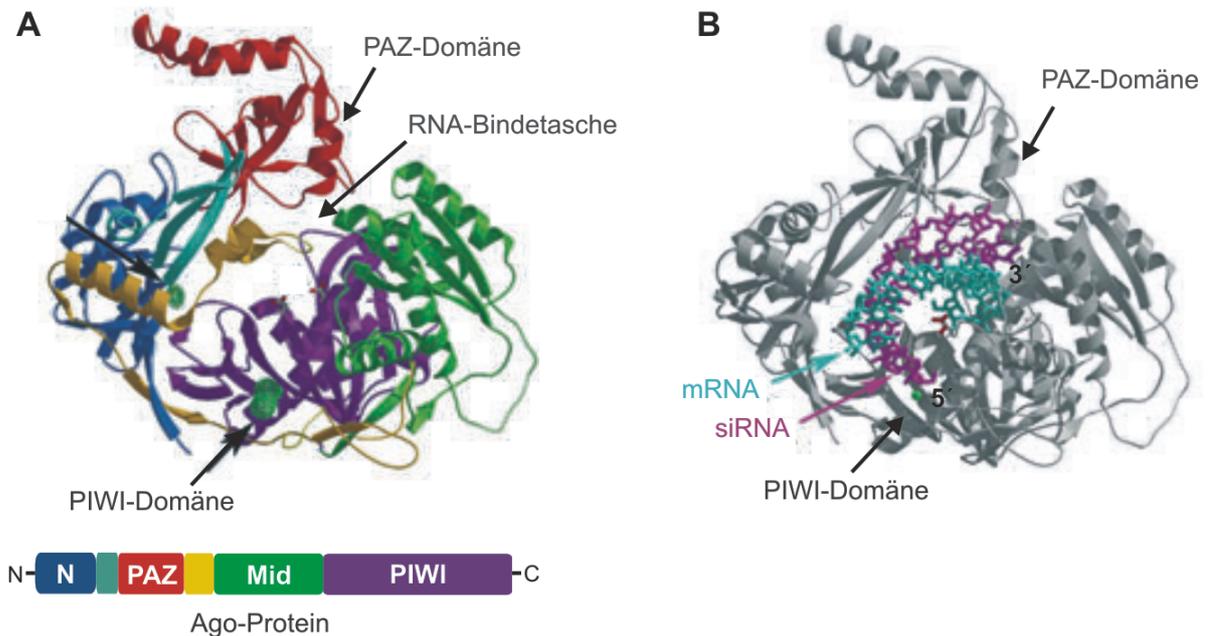
## **2 An der Stimulation der HCV-Translation in humanen Zellen sind höchstwahrscheinlich miRNP-Komplexe beteiligt**

Während die Stimulation der HCV-Translation *in vitro* hauptsächlich auf der verstärkten Basenpaarung der miR-122 an die HCV-5'-NTR beruht, weisen die Resultate aus Experimenten in Zellkultur auf eine Beteiligung von miR-122-assoziierten Proteinen in miRNP-Komplexen hin.

Translationsexperimente in Zellkultur zeigten, dass die Kofransfektion von miR-122-Duplexen einen stimulierenden Effekt auf die HCV-IRES vermittelte Translation hat. Schon die Funktionalität der miR-122-Vorläufermoleküle deutet darauf hin, dass diese in die zelluläre microRNA-Produktionsmaschinerie eingeschleust werden und anschließend als reife miR-122 in funktionellen miRNP-Komplexen für die Regulation der HCV-Translation zur Verfügung stehen (Yoda et al., 2010). Dem gemäß führt ein Knockdown von Proteinen wie Ago, Drosha und Dicer, die an der Prozessierung von microRNAs beteiligt sind, zu einer Repression der Virus-Produktion in humanen Hepatoma-Zellen Huh7 (Randall et al., 2007).

Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von funktionellen miRNP-Komplexen bei der Stimulation der HCV-Translation ist, dass die Integrität der miR-122 entscheidend für die translationsfördernde Wirkung in humanen Zellen ist. Experimente mit miR-122-Varianten zeigten, dass eine Verkürzung des 3'-Endes der miR-122 zu einem Verlust der Translationsstimulation führt. Möglicherweise ist die exakte Länge von 22 Nukleotiden sowie das 3'-Ende für die Prozessierung der microRNA und den Einbau in funktionelle miRNP-Komplexe von Bedeutung. Übereinstimmend mit dieser Vermutung wird die Bindung von kleinen nicht-kodierenden RNAs wie microRNAs und siRNAs (engl. *small interfering RNAs*) an Ago-Proteine, die die Schlüssel-Komponenten von miRNP-Komplexen

darstellen, sowohl durch das 5'-Ende als auch durch das 3'-Ende der microRNA vermittelt (Abb. 51) (Rivas et al., 2005; Hutvanger & Simard 2008).

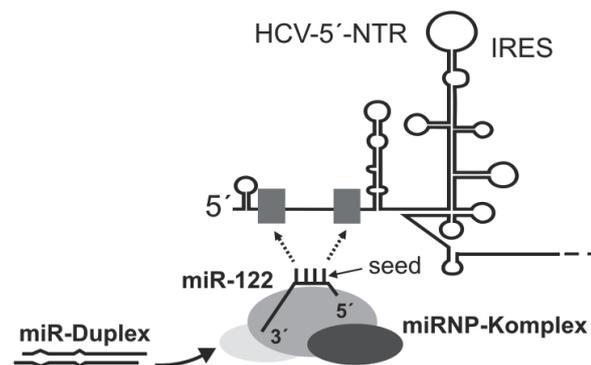


**Abbildung 51: Bindung einer siRNA und der mRNA an ein humanes Ago2-Protein.** Verändert nach Rivas et al. (2005). **(A)** Aufbau eines humanen Ago-Proteins aus einer N-terminalen Domäne (blau), PAZ-Domäne (rot), Interdomäne (gelb), Mid-Domäne (grün) und PIWI-Domäne (lila). **(B)** Bindung einer siRNA (magenta) und einem Abschnitt der Ziel-mRNA (türkis) an ein humanes Ago2-Protein.

Ago-Proteine sind aus vier Haupt-Domänen, einer N-terminalen Domäne, der PAZ-, der Mid- und der PIWI-Domäne aufgebaut (Song et al., 2004; Rivas et al., 2005). Strukturanalysen zeigen, dass diese halbmondförmig angeordnet sind, wodurch sich eine Furche im Zentrum ausbildet, die wahrscheinlich die Funktion einer RNA-Bindetasche hat (Abb. 51A) (Song et al., 2004). Die Bindung von siRNAs oder microRNAs erfolgt durch die PIWI- und die PAZ-Domäne (Abb. 51B). An der PIWI-Domäne wird das endständige 5'-Phosphat und das erste Nukleotid der microRNA verankert, wobei die exakte Position der Bindungsstelle noch diskutiert wird (Ma et al., 2005, Parker et al., 2005, Rivas et al., 2005). Die PAZ-Domäne enthält ein Oligonukleotid-Bindemotiv und geht eine Interaktion mit dem einzelsträngigen 3'-Ende der microRNAs ein (Song et al., 2003; Yan et al., 2003). Auch Dicer enthält eine PAZ-Domäne mit entsprechender Funktion, was zeigt, dass das 3'-Ende der microRNA die Interaktion mit der microRNA-Produktionsmaschinerie vermittelt (Zhang et al., 2004; Filipowicz et al., 2005).

Auffällig ist weiterhin die Position der microRNA-Bindedomänen in Ago-Proteinen und deren Distanz, wodurch die gebundene microRNA die RNA-Bindetasche des Proteins durchspannt und in einer entwundenen Konformation gehalten wird. Es wird vermutet, dass dies die korrekte Anlagerung der Ziel-RNA fördert, die mit der verstärkt exponierten „seed“-Region der microRNA hybridisiert (Song et al., 2004; Rivas et al., 2005). Möglicherweise ist die Distanz der microRNA-Bindedomänen auch restriktiv für die Länge der microRNA. Daher wäre denkbar, dass verkürzte microRNAs nicht

effizient mit beiden Enden an Ago-Proteine gebunden werden können. Möglich wäre auch, dass die Bindung verkürzter microRNAs durch die fehlende Länge zu einer Konformationsänderung des Ago-Proteins führt, wodurch die Zugänglichkeit der „seed“-Region der microRNA beeinträchtigt ist. Beide Überlegungen würden den Verlust der stimulatorischen Wirkung auf die HCV-Translation der verkürzten miR-122 erklären. Dass in lebenden Zellen ausschließlich die intakte miR-122 einen stimulatorischen Effekt auf die HCV-Translation hat, spricht demnach für eine Assoziation mit Ago-Proteinen in miRNP-Komplexen.



**Abbildung 52: In Zellen wirkt miR-122 höchstwahrscheinlich in miRNP-Komplexen.** Schematische Darstellung der möglichen Interaktion von miR-122 enthaltenden miRNP-Komplexen mit Ziel-Sequenzen (graue Kästen) in der HCV-5'-NTR inklusive der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES).

Unterstützt wird die Annahme weiterhin durch die in Zellkultur ermittelten Bindungseigenschaften der miR-122 an die HCV-5'-NTR (Abb. 52). Es konnte gezeigt werden, dass die miR-122 in humanen Zellen mit der „seed“-Region, Nukleotide 2 - 8, an die HCV-5'-NTR hybridisiert (Henke, Goergen et al., 2008). Zudem wurde festgestellt, dass die Sequenz der 3'-Region der miR-122 essentiell für den stimulatorischen Effekt ist, aber nicht an die HCV-5'-NTR bindet, was auf eine Assoziation mit Proteinen hinweist. Das endständige Phosphat und das erste Nukleotid des 5'-Endes sowie das 3'-Ende der miR-122 sind demnach nicht an der Hybridisierung mit der HCV-5'-NTR beteiligt und könnten die Interaktion mit Ago-Proteinen vermitteln.

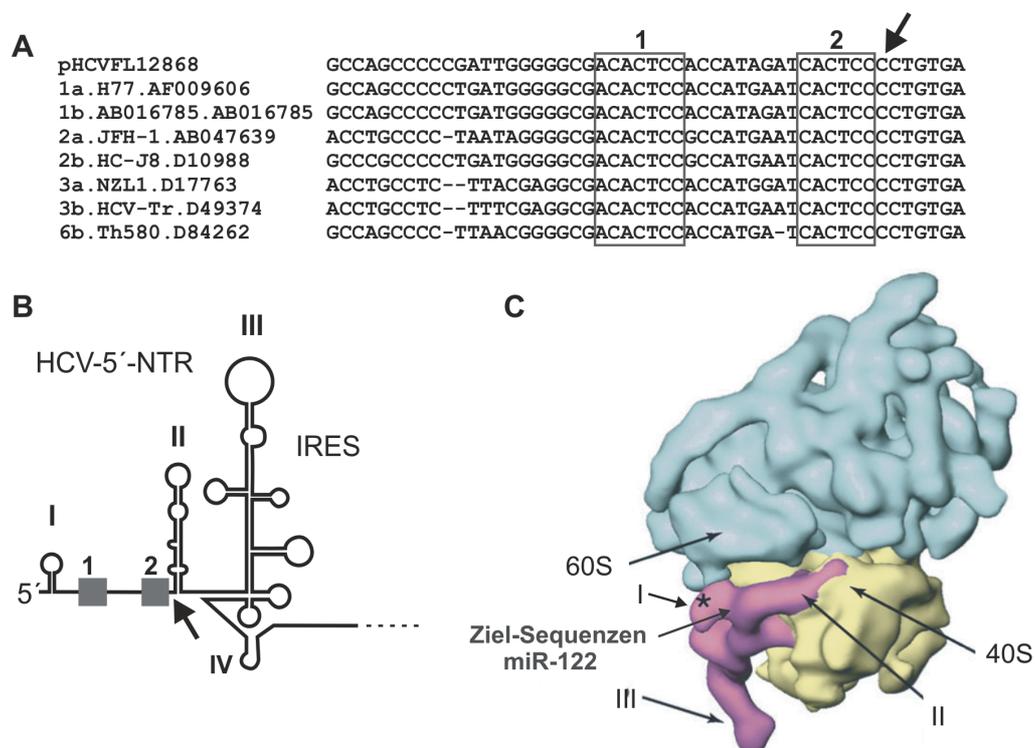
Die Resultate dieser Arbeit zeigen folglich, dass höchstwahrscheinlich miR-122 enthaltende miRNP-Komplexe an der Stimulation der HCV-Translation in lebenden Zellen beteiligt sind.

### 3 Mögliche Wirkmechanismen von miRNP-Komplexen bei der Stimulation der HCV-Translation durch microRNA-122

Die meisten bisherigen Publikationen beschreiben eine Repression der Translation, die durch Interaktion von microRNAs mit Ziel-Sequenzen in der 3'-NTR von mRNAs vermittelt wird (zusammengefasst in Liu et al., 2008; Chekulaeva & Filipowicz 2009). Dabei werden verschiedene Wirkmechanismen diskutiert. Die meisten Studien deuten auf eine Inhibition der Translationsinitiation hin, indem Proteine des miRNP-Komplexes die Bindung des Cap-Nukleotids durch eIF4F oder die Anlagerung der ribosomalen 60S-Untereinheit blockieren (Humphreys et al., 2005; Chendrimada et

al., 2007; Kirakidou et al., 2007; Mahonnet et al., 2007). Andere Studien geben Hinweise auf eine Degradation des wachsenden Polypeptids (Nottrott et al., 2006) oder eine verlangsamte Elongation und frühzeitige Termination der Translation durch Interaktion der miRNP-Komplexe mit der 3'-NTR der mRNA (Petersen et al., 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Ago-Proteine Deadenylase-Komplexe rekrutieren, was zu Deadenylierung und anschließendem Abbau der mRNAs führt (Rehwinkel et al., 2005; Wu et al., 2006; Eulalio et al., 2009).

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass die microRNA-122 die Translation der HCV-RNA stimuliert und dass die Stimulation im Gegensatz zur Repression der Translation durch Interaktion der miR-122 mit der 5'-NTR der HCV-RNA vermittelt wird. Übereinstimmend wiesen auch Jopling et al. (2005) eine Interaktion der miR-122 mit der HCV-5'-NTR nach.

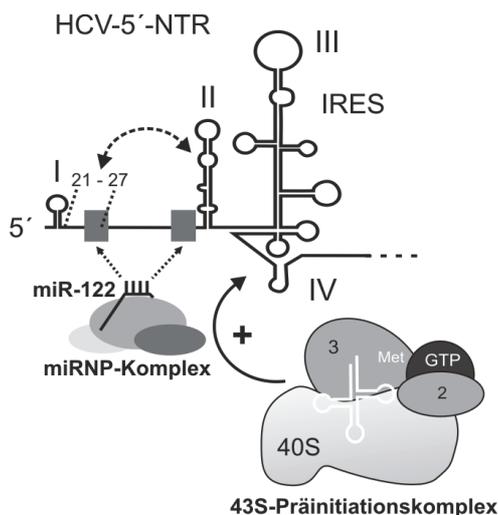


**Abbildung 53: Position der Ziel-Sequenzen der miR-122 in der HCV-5'-NTR.** (A) Alignment der ersten 50 Nukleotide verschiedener HCV-Genotypen und Subtypen (Quelle: <http://hcv.lanl.gov/content/index>). Die Ziel-Sequenzen der miR-122 sind durch graue Kästen markiert. Ein Pfeil kennzeichnet den Beginn der Domäne II der 5'-NTR. (B) HCV-5'-NTR inklusive der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES). Ziel-Sequenzen der miR-122 sind durch graue Kästen markiert. Die Domänen der HCV-5'-NTR sind durch römische Ziffern (I - IV) gekennzeichnet. (C) HCV-5'-NTR (magenta) gebunden an ein humanes 80S-Ribosom (verändert nach Kieft et al. (2008)). Die ribosomale 60S-Untereinheit ist in blau, die ribosomale 40S-Untereinheit in gelb dargestellt. Die Domänen der HCV-5'-NTR sind durch römische Ziffern (I - III) gekennzeichnet.

Die Ziel-Sequenzen der miR-122 sowie deren Position in der HCV-5'-NTR sind unter den HCV-Genotypen und Subtypen konserviert (Abb. 53A, siehe auch Anhang). Sie liegen in einem einzelsträngigen Sequenzbereich zwischen der Domäne I und II der HCV-5'-NTR stromaufwärts der HCV-IRES, die durch die Domänen II bis IV gebildet wird (Abb. 53B). In keinem HCV-Isolat konnte bisher eine Variation des Abstandes der miR-Ziel-Sequenzen zur Domäne II der HCV-5'-NTR detektiert werden (Abb. 53A,B, gekennzeichnet durch Pfeile), was auf eine funktionelle Relevanz der

Position der Ziel-Sequenzen bei der Stimulation der HCV-Translation hinweist. Abbildung 53C zeigt eine aus cryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen rekonstruierte Darstellung der HCV-5'-NTR gebunden an ein 80S-Ribosom (Kieft et al., 2008). Die miR-122-Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR liegen demnach offen an der der Lösung zugewandten Oberfläche der HCV-RNA. Demzufolge besteht die Möglichkeit, dass die an die Ziel-Sequenzen der miR-122 angelagerten miRNP-Komplexe direkt mit der HCV-IRES und den rekrutierten ribosomalen Untereinheiten interagieren. Die Lokalisation der Ziel-Sequenzen der miR-122 in der HCV-5'-NTR in direkter Nähe der HCV-IRES deutet folglich darauf hin, dass die interagierenden miRNP-Komplexe die Translation der HCV-RNA im Stadium der Initiation fördern.

Der erste Schritt der Initiation der HCV-Translation erfolgt im Wesentlichen ohne eine Beteiligung der eukaryotischen Translations-Initiationsfaktoren (eIFs) durch direkte Interaktion der ribosomalen 40S-Untereinheit mit den hochkonservierten Struktur-Elementen in der HCV-5'-NTR (Abb. 54) (Kieft et al., 2001a/b; Otto et al., 2002; Otto & Puglisi 2004). Eine der wichtigsten Voraussetzungen für eine effiziente Translation der viralen RNA ist dabei eine korrekte Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur der HCV-IRES (zusammengefasst in Lukavsky et al., 2009).

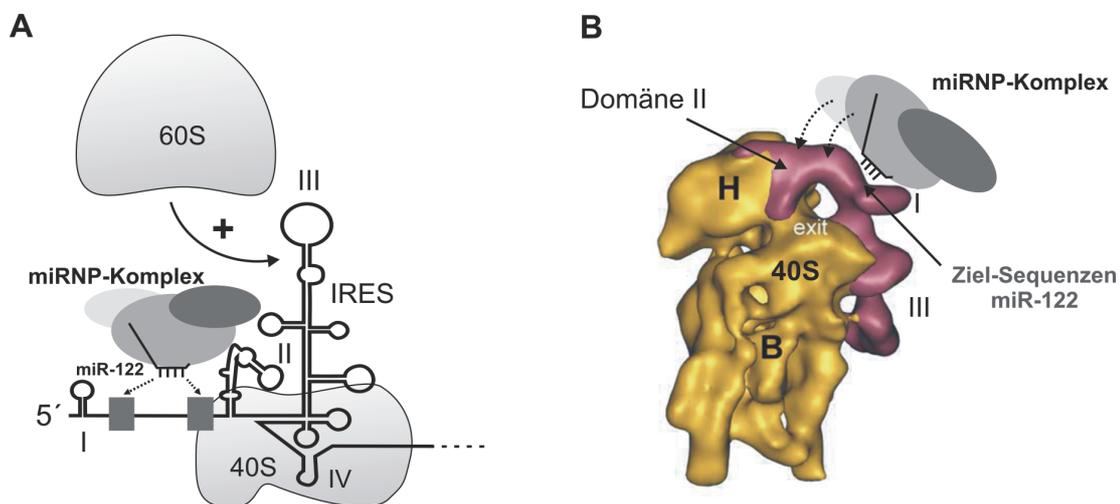


**Abbildung 54: Die Bindung von miRNP-Komplexen könnte die Anlagerung von 43S-Präinitiationskomplexen an der HCV-IRES fördern.** Modell der Stimulation der Translationsinitiation durch miR-122. Die HCV-5'-NTR inklusive der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) und den Ziel-Sequenzen der miR-122 (graue Kästen). Die Domänen HCV-5'-NTR sind durch römische Ziffern (I - IV) gekennzeichnet. Ein Pfeil mit unterbrochener Linie kennzeichnet eine mögliche Interaktion der Nukleotide 21 - 27 mit Sequenzen der Domäne II der HCV-5'-NTR. Die Anlagerung der miRNP-Komplexe und der 43S-Präinitiationskomplexe ist schematisch dargestellt.

Allgemein haben RNA-bindende Proteine durch unspezifische Anlagerung, RNA-Chaperon-Funktion oder RNA-Helikase-Aktivität einen modulierenden Einfluss auf die Struktur der gebundenen RNA, was in den meisten Fällen zu einer Herstellung oder Stabilisierung einer biologisch aktiven Form der RNA führt (zusammengefasst in Rajkowitsch et al., 2007). Eine Struktur stabilisierende und translationsfördernde Wirkung wurde beispielsweise auch für die Bindung des Proteins PTB (Polypyrimidintrakt-bindendes Protein) an die IRES des Maul- und Klauenseuche-Virus (FMDV) gezeigt (Song et al., 2005) und wird für andere IRES-bindende, trans-aktivierende Faktoren (ITAFs) bei der IRES-vermittelten Translation von Picornaviren vermutet (Niepmann, 2009b). Denkbar wäre, dass auch die Bindung von miRNP-Komplexen vermittelt durch die miR-122 an den Sequenzbereich zwischen Domäne I und II der HCV-5'-NTR die Struktur der HCV-IRES stabilisiert. Einen Hinweis darauf geben Analysen der Sekundärstruktur der HCV-5'-NTR mittels des Programmes *mfold* (Zucker,

2003) (siehe Anhang). Diese zeigen eine mögliche Interaktion der Nukleotide 21 - 27 der HCV-5'-NTR mit Sequenzen der Domäne II in Abwesenheit der miR-122, was zu einer inkorrekten Faltung der Domäne II und III der IRES führt. Liegt der Sequenzbereich zwischen Domäne I und II dagegen wie im Fall einer Bindung von miRNP-Komplexen einzelsträngig vor, bilden sich bevorzugt Haarnadelstrukturen, die den funktionellen Domänen der HCV-IRES entsprechen. miRNP-Komplexe könnten folglich durch eine Wirkung auf die Struktur der HCV-IRES deren Zugänglichkeit für die Interaktion mit 43S-Präinitiationskomplexen erhöhen (Abb. 54) und damit zu einer gesteigerten Effizienz der Bildung von 48S-Komplexen beitragen.

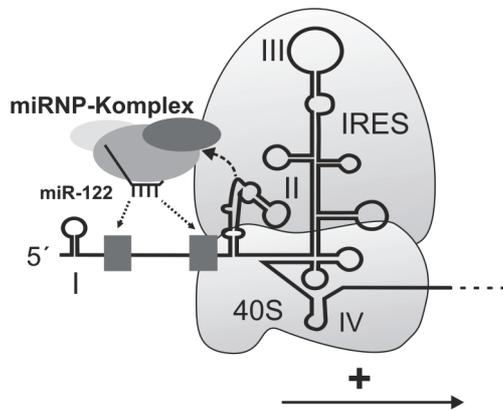
Bei den nächsten Schritten der Translationsinitiation sind des Weiteren Konformationsänderungen erforderlich, die Bildung von translations-kompetenten ribosomalen Komplexen an der HCV-IRES vermitteln. Auch hierbei wäre eine unterstützende Wirkung der Interaktion von miRNP-Komplexen mit den Ziel-Sequenzen der miR-122 vorstellbar.



**Abbildung 55: Die Bindung von miRNP-Komplexen könnte die Anlagerung der ribosomalen 60S-Untereinheit an die HCV-IRES durch Unterstützung einer Konformationsänderung vermittelt durch Domäne II fördern.** (A) Modell der Stimulation der Translationsinitiation durch miR-122. HCV-5'-NTR inklusive der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) und die Ziel-Sequenzen der miR-122 (graue Kästen). Die Domänen HCV-5'-NTR sind durch römische Ziffern (I - IV) gekennzeichnet. Die Anlagerung der miRNP-Komplexe und der ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten ist schematisch dargestellt. (B) HCV-5'-NTR (magenta) gebunden an die ribosomale 40S-Untereinheit (gelb) (verändert nach Boeringer et al. (2005)). Die Domänen der HCV-5'-NTR sind durch römische Ziffern (I - III) gekennzeichnet. Eine mögliche Anlagerung der miRNP-Komplexe und der Einfluss auf die Interaktion der Domäne II mit der ribosomalen 40S-Untereinheit sind schematisch dargestellt.

Die Anlagerung der ribosomalen 60S-Untereinheit an die HCV-IRES geht wie bei der Translationsinitiation an eukaryotischen mRNAs mit der Entlassung der eIFs aus dem 48S-Präinitiationskomplex einher (Unbehaun, 2004; Locker et al., 2007; Lukavsky, 2009). Bei der Initiation der HCV-Translation wird dies durch eine Konformationsänderung in der ribosomalen 40S-Untereinheit induziert (Locker et al., 2007). Diese wird im Wesentlichen durch die Domäne II der HCV-IRES vermittelt, die sich nach der Rekrutierung der 43S-Präinitiationskomplexe L-förmig an die ribosomale 40S-Untereinheit anlagert (Spahn et al., 2001; Locker et al., 2007; Kieft, 2008) (Abb. 55). Die Lokalisation der Ziel-Sequenzen der miR-122 in der HCV-5'-NTR zeigt, dass die Anlagerung von

miRNP-Komplexen einen direkten Einfluss auf die Position der Domäne II in Relation zur ribosomalen 40S-Untereinheit haben könnte (Abb. 55). Es wäre daher möglich, dass die Bindung von miRNP-Komplexen die Konformationsänderung in der ribosomalen 40S-Untereinheit vermittelt durch Domäne II der IRES unterstützt. Dies würde die Anlagerung der ribosomalen 60S-Untereinheit fördern und einen positiven Einfluss auf die Bildung von 80S-Komplexen an der HCV-RNA haben.



**Abbildung 56: Die Bindung von miRNP-Komplexen könnte den Übergang der Translationsinitiation in die Elongation fördern.** Modell der Stimulation der Translationsinitiation durch miR-122. HCV-5'-NTR inklusive der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) und den Ziel-Sequenzen der miR-122 (graue Kästen). Die Domänen HCV-5'-NTR sind durch römische Ziffern (I - IV) gekennzeichnet. Die Anlagerung der miRNP-Komplexe und der ribosomalen Untereinheiten ist schematisch dargestellt.

Ein weiterer kritischer Schritt für eine effiziente HCV-Translation ist wahrscheinlich die Ablösung der 80S-Komplexe von der Startstelle der Translation an der IRES und der Übergang in die Elongationsphase. Bei der Cap-Nukleotid vermittelten Translation eukaryotischer mRNAs findet die Rekrutierung der ribosomalen Untereinheiten hauptsächlich durch die Interaktion mit eIFs statt, die bei der Bildung der 80S-Komplexe dissoziieren (Jackson et al., 2010, Einleitung, Kapitel 2.1). Die Translationskomplexe liegen danach in einem aktiven Zustand vor, der den direkten Übergang in die Elongationsphase erlaubt. Die Rekrutierung der Ribosomen an die HCV-IRES wird dagegen im Wesentlichen durch direkte Interaktion mit der viralen RNA vermittelt, die mit hoher Affinität an die ribosomale 40S-Untereinheit bindet (Kolupaeva et al., 2000; Kieft et al., 2001b; Otto et al., 2002). Zudem wird durch die Interaktion der Domäne II mit der ribosomalen 40S-Untereinheit die Exit-Stelle des Ribosoms für die Entlassung der deacetylierten tRNA blockiert (Spahn et al., 2001) (siehe auch Abb. 55B). Die bei der Rekrutierung von Translationskomplexen an die HCV-IRES erforderlichen Interaktionen sind folglich hinderlich für eine effiziente Elongation und müssen zusätzlich zur Dissoziation der eIFs gelöst werden. Wie die Ablösung der HCV-IRES von den ribosomalen Untereinheiten erfolgt ist noch unklar. Es wird vermutet, dass dies durch eine weitere Konformationsänderung induziert wird (Spahn et al., 2001; Boehringer et al., 2005). Auch in dieser späten Phase der Translationsinitiation wäre ein positiver Einfluss von miRNP-Komplexen denkbar, indem deren Anlagerung wie zuvor beschrieben eine Konformationsänderung unterstützt oder die Affinität der HCV-RNA für die Bindung an ribosomale Untereinheiten herabsetzt (Abb. 56). Dies könnte den Übergang zwischen der Initiation und Elongation der Translation beschleunigen, so dass die HCV-IRES schneller für die Interaktion mit neuen ribosomalen Komplexen zur Verfügung steht (Abb. 56).

Insgesamt wird deutlich, dass die effiziente Initiation der HCV-Translation durch strukturelle Eigenschaften der HCV-IRES bestimmt wird, die wiederum die strukturellen Eigenschaften der Komponenten des zellulären Translationsapparates für den optimalen Ablauf der Translation modulieren. Es wäre daher denkbar, dass die durch miR-122 rekrutierten miRNP-Komplexe bei der Bildung translations-kompetenter ribosomaler Komplexe an der HCV-IRES als eine Art Chaperon fungieren und so die HCV-Translation stimulieren. Dabei kann spekuliert werden, dass die Anlagerung der miRNP-Komplexe allein, unabhängig von deren Protein-Zusammensetzung, eine fördernde Wirkung hat. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass durch die miR-122 bestimmte Proteine an die HCV-5'-NTR rekrutiert werden, die eine Chaperon-Funktion bei der Assemblierung der Translationskomplexe ausüben. Ein möglicher Faktor wäre das Hitzeschock-Protein Hsc70 (*Heat shock cognate 70*), welches durch UV-Crosslink-Experimente als Bindungspartner der HCV-RNA und der miR-122 identifiziert werden konnte (siehe Henke, Dissertation 2010). Möglich wäre auch eine Beteiligung von anderen RNA-bindenden Proteinen der Familie der heterogenen nukleären Ribonukleo-Proteine (hnRNPs), die sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma durch ihre RNA-Chaperon-Aktivität einen Einfluss auf die Prozessierung von RNAs haben (Rajkowitsch et al., 2007). Für einige dieser Proteine wie das hnRNP L oder hnRNP D wurde sowohl eine Interaktion mit der HCV-5'-NTR als auch eine stimulierende Wirkung auf die HCV-Translation nachgewiesen (Paek et al., 2008; Hwang et al., 2009). Zudem konnten hnRNPs als Bestandteile von miRNP-Komplexen identifiziert werden (Höck et al., 2007).

Neben einer stimulierenden Wirkung auf den Ablauf der Bildung von Translationskomplexen an der HCV-IRES gibt es einen weiteren möglichen Wirkmechanismus der miRNP-Komplexe bei der Stimulation der HCV-Translation. Bei der Translation in humanen Zellen konkurriert die HCV-RNA mit zellulären mRNAs um die Bindung von ribosomalen Untereinheiten. Die Verfügbarkeit von Komponenten des zellulären Translationsapparates an der HCV-IRES könnte daher ein limitierender Faktor für die Effizienz der Translationsinitiation sein. Es wäre möglich, dass Proteine des miRNP-Komplexes direkt an der Rekrutierung von ribosomalen Untereinheiten und eIFs an die HCV-IRES beteiligt sind. Neben einer Funktion bei der Repression der Translation beschrieben Vasudevan & Steitz (2007), dass Ago2-Proteine unter Zellzyklus-Arrest auch eine Stimulation der Translation eukaryotischer mRNAs vermitteln können. Interessanterweise wurde Ago2 (auch Co-eIF2-A oder eIF2C2 genannt) ursprünglich als Translations-Initiationsfaktor identifiziert (Roy et al., 1988; Zou et al. 1998). Es wurde gezeigt, dass Co-eIF2-A in Anwesenheit von RNA die Bildung des ternären Komplexes fördert und dessen Bindung an die ribosomale 40S-Untereinheit stabilisiert (Roy et al., 1988; Zou et al. 1998). Es wäre daher denkbar, dass durch eine Interaktion der an die Ziel-Sequenzen der miR-122 gebundenen Ago2-Proteine mit dem ternären Komplex eine verstärkte Rekrutierung von 43S-Präinitiationskomplexen an die HCV-IRES stattfindet. Ago2 könnte folglich die Bildung von 48S-Komplexen fördern und damit zu einer Stimulation der Initiation der HCV-Translation beitragen.

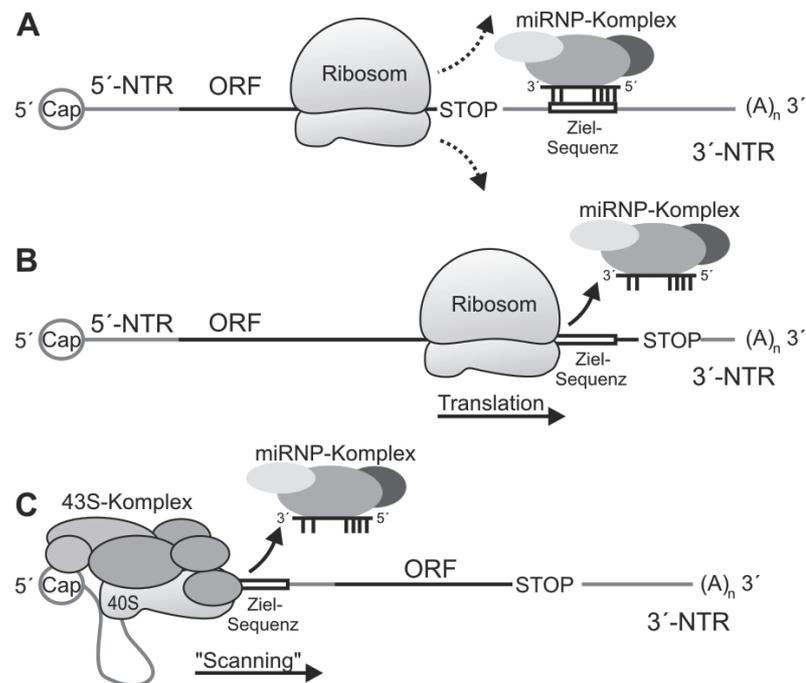
Zusammenfassend ist es sehr wahrscheinlich, dass die Stimulation der HCV-Translation durch die leberspezifische microRNA-122 in humanen Zellen aufgrund der Position der Ziel-Sequenzen in direkter Nähe zur IRES im Stadium der Initiation stattfindet. Dabei ist eine Wirkung von Komponenten der miRNP-Komplexe auf verschiedene Schritte der Translationsinitiation denkbar, die entweder durch eine Chaperon-Aktivität oder durch direkte Rekrutierung des zellulären Translationsapparates an die HCV-IRES stimuliert werden könnten. Welcher der möglichen Wirkmechanismen bei der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 in humanen Zellen tatsächlich genutzt wird und welche miR-122-assoziierten Proteine beteiligt sind, soll in weiterführenden Studien eingehender untersucht werden.

#### **4 Positionseffekte bei der Regulation der Translation durch microRNAs**

Die Stimulation der Translation durch die miR-122 und die Interaktion der miR-122 mit der 5'-NTR der Ziel-RNA stellen zwei Aspekte dar, die sowohl bei der Vermehrung des HCV in Leberzellen eine Rolle spielen als auch für das allgemeine Verständnis der Funktionsweise von microRNAs von Bedeutung sein können.

Über die Regulation der Translation durch Interaktion von microRNAs mit der 5'-NTR einer RNA in ist bisher wenig bekannt. Neben den Resultaten dieser Arbeit gibt es bisher nur eine weitere Publikation, die eine Stimulation der Translation durch Interaktion einer microRNA mit der 5'-NTR einer mRNA zeigt (Orom et al., 2008), während zwei andere Studien beschreiben, dass das Einfügen von bekannten microRNA Ziel-Sequenzen in die 3'-NTR oder 5'-NTR einer Reporter-RNA deren Translation gleichermaßen reprimiert (Kloosterman et al., 2004; Lytle et al., 2007). Dagegen gibt es eine Vielzahl von Publikationen über die Repression der Translation durch Interaktion von microRNAs mit Ziel-Sequenzen in der 3'-NTR einer RNA (Ambros, 2001; Bartel et al., 2004; Eulalio et al., 2008; Liu et al., 2008). Aus diesen Befunden ergibt sich zum einen die Frage, warum die Regulation der Translation durch microRNAs in tierischen Zellen hauptsächlich durch Interaktion mit der 3'-NTR stattfindet und unter welchen Voraussetzungen eine Regulation durch Interaktion von microRNAs mit der 5'-NTR erfolgt. Zum anderen stellt sich die Frage, welche Determinanten die Wirkung einer microRNA bei der Regulation der Translation bestimmen.

Die Entwicklung von Algorithmen zur Vorhersage von potentiellen miR-Bindestellen zeigt, dass 5'-NTRs zellulärer mRNAs theoretisch ebenso häufig komplementäre Sequenzen zur „seed“-Region von microRNAs enthalten wie 3'-NTRs (Zhou et al., 2009). Die Bindung von microRNAs an Ziel-Sequenzen in der 5'-NTR oder in Protein-kodierenden Sequenzen interferiert jedoch im Gegensatz zur Bindung an die 3'-NTR mit den Such- und Ablesevorgängen der Ribosomen. Dies könnte einerseits zu einer Störung des Vorgangs der Translation führen. Andererseits ist denkbar, dass translatierende Ribosomen die Anlagerung von miRNP-Komplexen an der Ziel-RNA stören und daher die Funktionalität der Ziel-Sequenzen in der 5'-NTR beeinträchtigen.



**Abbildung 57: Translatierende oder „scannende“ Ribosomen stören die Anlagerung von miRNP-Komplexen an die Ziel-RNA.** (A), (B) Schematische Darstellung der Resultate aus Gu et al. (2009). (A) Die Interaktion von miRNP-Komplexen mit der 3'-NTR reprimiert die Translation einer gecappten (Cap) und polyadenylierten ((A)<sub>n</sub>) RNA. Die Ribosomen terminieren und dissoziieren am Stop-Kodon des offenen Leserahmens (ORF). (B) Durch Verlagerung des Stop-Kodons nach stromabwärts der Ziel-Sequenz stören translatierende Ribosomen die Anlagerung der miRNP-Komplexe. (C) Die Anlagerung von miRNP-Komplexen an Ziel-Sequenzen in der 5'-NTR wird möglicherweise durch das „Scanning“ der 43S-Präinitiationskomplexe (43S-Komplex) behindert.

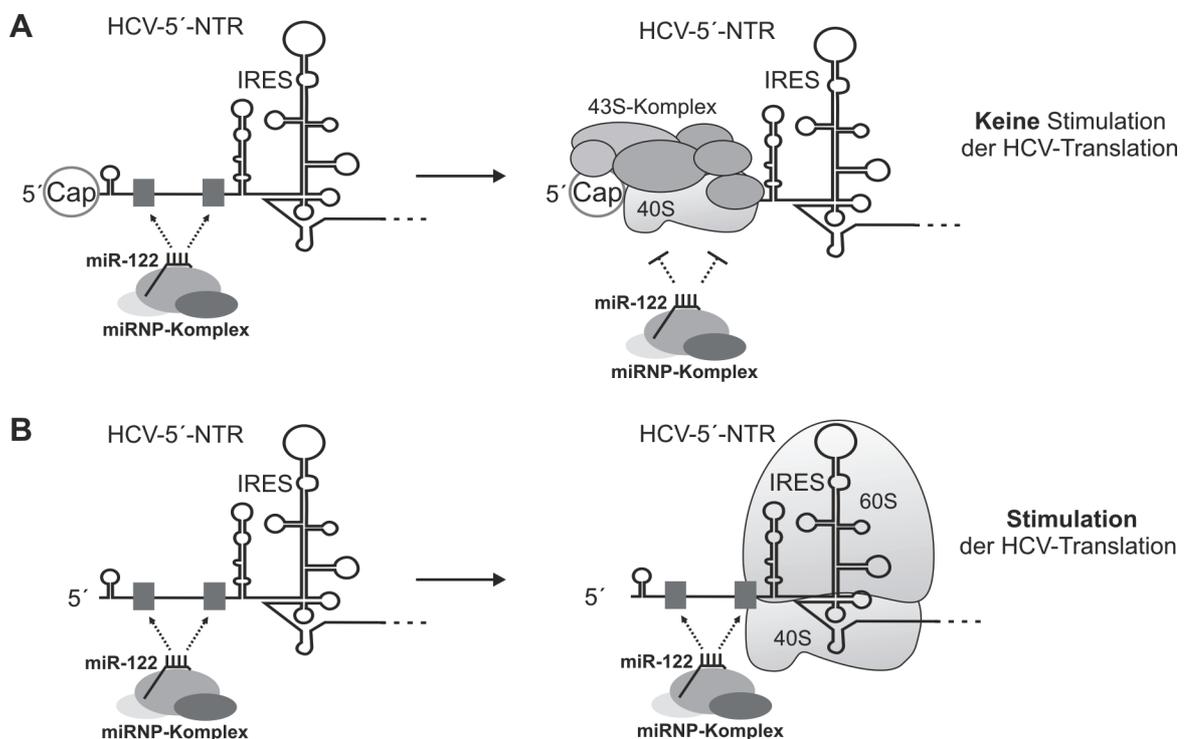
Gu et al. (2009) zeigten, dass die Translation einer Reporter-RNA durch Einfügen von Ziel-Sequenzen einer microRNA in der 3'-NTR zu einer Repression der Translation führt, wenn die translatierenden Ribosomen am vorgelagerten Stop-Kodon der Translation dissoziieren (Abb. 57A). Eine Verlagerung des Stop-Kodons nach stromabwärts der Ziel-Sequenzen der microRNA führt dagegen zu einem Verlust der Translationsrepression, da translatierende Ribosomen in dem Fall wahrscheinlich die stabile Anlagerung der miRNP-Komplexe verhindern (Abb. 57B). Die Interaktion von miRNP-Komplexen mit der 5'-NTR wird möglicherweise in ähnlicher Weise durch den Prozess des „Scanning“ des 43S-Präinitiationskomplexes an der 5'-NTR beeinträchtigt (Abb. 57C). Die für microRNAs in tierischen Zellen typische unvollständige Hybridisierung an die Ziel-RNA, die hauptsächlich durch die 5'-„seed“-Region vermittelt wird (Doench & Sharp, 2004; Brennecke et al., 2005; Lewis et al., 2005), ist folglich in abgelesenen Sequenzbereichen einer RNA nicht ausreichend für eine effiziente Anlagerung von miRNP-Komplexen. Dies erklärt, warum wirksame Interaktionen von microRNAs mit der Ziel-RNA wahrscheinlich hauptsächlich an der 3'-NTR stattfinden.

Da es dennoch Berichte über eine Regulation der Translation durch Interaktion mit der 5'-NTR gibt, stellt sich die Frage, unter welchen Bedingungen dies erfolgen kann.

Untersuchungen des Mechanismus der Stimulation der HCV-Translation in humanen Zelllinien in dieser Arbeit zeigten, dass die Interaktion der miR-122 mit der HCV-5'-NTR ebenfalls im Wesentlichen durch Hybridisierung der „seed“-Region vermittelt wird. Die Eigenschaften der

Bindung der miR-122 an die HCV-5'-NTR entsprechen also denen, die für die Interaktion von microRNAs mit der 3'-NTR ermittelt wurden (Doench & Sharp, 2004; Brennecke et al., 2005; Lewis et al., 2005). Danach würde man erwarten, dass die Ziel-Sequenzen der microRNA-122 in der 5'-NTR der HCV-RNA nicht funktionell sind.

Interessanterweise konnten Jopling et al. (2008) mit einer Reporter-RNA, die die HCV-IRES enthielt, aber zusätzlich am 5'-Ende gecappt war, übereinstimmend mit der oben beschriebenen Theorie keine stimulierende Wirkung der miR-122 auf die Translationseffizienz der Reporter-RNA feststellen. Möglicherweise stört hier die Bildung von ribosomalen Komplexen am 5'-Cap-Nukleotid die Interaktion der miR-122 mit den Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR und die Anlagerung von miRNP-Komplexen (Abb. 58A).



**Abbildung 58: Die Bindung der miR-122 an Ziel-Sequenzen stromaufwärts der HCV-IRES interferiert nicht mit Ablesevorgängen der Ribosomen.** (A) Eine nicht authentische 5'-gecappte HCV-RNA wird nicht durch miR-122 stimuliert, da die Bildung von ribosomalen Komplexen am Cap-Nukleotid (Cap) die Anlagerung der miRNP-Komplexe stört. (B) Das authentische HCV-RNA-Genom enthält kein 5'-Cap-Nukleotid. Die Ziel-Sequenzen der miR-122 liegen stromaufwärts der HCV-IRES, wodurch die Anlagerung der miR-122 enthaltenden miRNP-Komplexe nicht mit Ablesevorgängen ribosomaler Komplexe interferiert.

Das authentische HCV-RNA-Genom enthält jedoch kein Cap-Nukleotid am 5'-Ende (Abb. 58B). Der Vermehrungszyklus des HCV findet ausschließlich im Zytoplasma der Wirtszelle statt, so dass kein Zugang zu den im Kern agierenden Capping-Enzymen besteht. Bisher gibt es, im Gegensatz zu einigen anderen im Zytoplasma replizierenden Viren (Decroly et al., 2008; Li et al., 2008), zudem keinen Nachweis einer Capping-Funktion der viruskodierten Proteine.

Die funktionellen Ziel-Sequenzen der miR-122 sind stromaufwärts der internen Ribosomen-Eintrittsstelle lokalisiert. Dadurch interferiert die Bindung der miR-122 an die HCV-5'-NTR

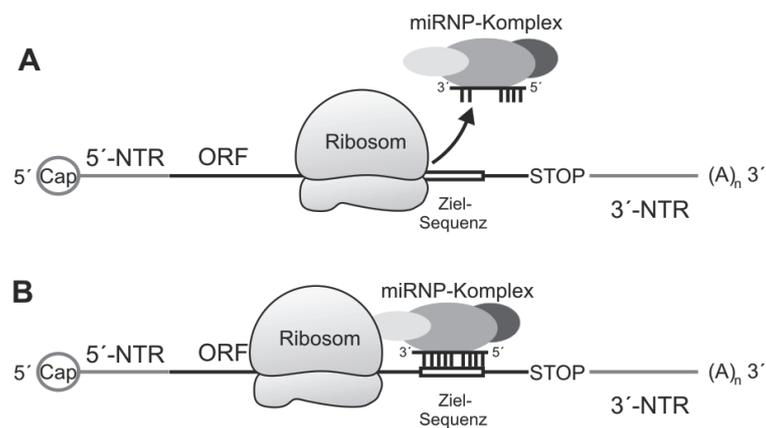
entsprechend der Interaktion von microRNAs mit der 3'-NTR nicht mit den Ablesevorgängen der Ribosomen (Abb. 58B). Übereinstimmend konnte in den Translationsstudien der vorliegenden Arbeit mit nicht gecappter genomischer HCV-RNA und HCV-Reporter-RNA eine Stimulation der Translation durch die miR-122 nachgewiesen werden.

Die Erkenntnisse aus der Untersuchung der Regulation der HCV-Translation durch die miR-122 zeigen, dass die Lokalisation von microRNA-Ziel-Sequenzen stromaufwärts einer internen Ribosomen-Eintrittsstelle eine Möglichkeit der Translationsregulation durch Interaktion von microRNAs mit der 5'-NTR einer RNA bietet, die sonst aufgrund der Bindungseigenschaften der microRNAs hauptsächlich an der 3'-NTR der Ziel-RNA stattfindet. Es besteht daher die Möglichkeit, dass auch die Effizienz der Translation anderer RNAs, die IRES-Elemente enthalten, durch die Interaktion von microRNAs mit der 5'-NTR moduliert wird. Da insbesondere die Translation vieler viraler RNAs durch IRES-Elemente initiiert wird (zusammengefasst in Doudna & Sarnow, 2007), wäre es interessant zu untersuchen, ob diese potentielle Ziel-Sequenzen für wirtsspezifische microRNAs in der 5'-NTR enthalten und deren Translationseffizienz durch diese beeinflusst wird.

Auch Lytle et al. (2007) zeigten, dass die Verlagerung von Ziel-Sequenzen für die microRNA let-7a (miR-let-7a) aus der 3'-NTR einer Reporter-RNA in die 5'-NTR stromaufwärts einer HCV-IRES deren Funktionalität nicht beeinträchtigt. Allerdings wurde anders als bei der Regulation der HCV-Translation durch die miR-122 die Wirkung der miR-let7a durch das zusätzliche Anfügen eines 5'-Cap-Nukleotids nicht vollständig inhibiert. Zudem beschreiben Kloosterman et al. (2004) einen Effekt der microRNA-let7a unabhängig von der Lokalisation der Ziel-Sequenzen in einer gecappten Reporter-RNA. Des Weiteren wiesen Orom et al. (2008) eine funktionelle Interaktion der miR-10a mit der 5'-NTR der für ribosomale Proteine kodierenden mRNA nach, die ebenfalls ein 5'-Cap-Nukleotid enthält. Diese Befunde zeigen, dass es eine weitere Möglichkeit der Translationsregulation durch Interaktion von microRNAs mit der 5'-NTR gibt.

Neuere Publikationen zeigen, dass eine Regulation der Translation in tierischen Zellen auch durch Interaktion von microRNAs mit protein-kodierenden Sequenzen stattfinden kann (zusammengefasst in Rigoutsos, 2009). Die Resultate aktueller Untersuchungen deuten allerdings darauf hin, dass dies eine nahezu vollständige Paarung der microRNA mit der Ziel-mRNA erfordert, was eine Ablösung der miRNP-Komplexe von der mRNA durch translatierende Ribosomen verhindern könnte (Abb. 59) (Duursma et al., 2008; Forman et al., 2008; Tay et al., 2008; Gu et al., 2009).

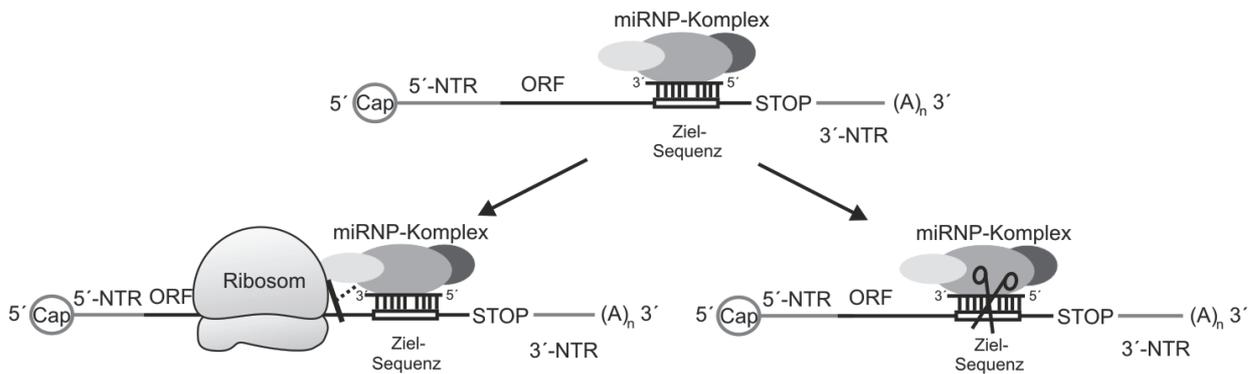
Übereinstimmend weisen die microRNAs in den oben genannten Studien eine verstärkte Komplementarität zur Sequenz der 5'-NTR der Ziel-RNA auf (Kloosterman et al., 2004, Lytle et al., 2007; Orom et al., 2008). Dies lässt vermuten, dass eine Regulation der Translation auch durch Interaktion von microRNAs mit der 5'-NTR einer gecappten mRNA erfolgen kann, wenn eine verstärkte Basenpaarung der microRNA mit der Ziel-RNA gegeben ist. Es wäre daher möglich, dass unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse weitere funktionelle Ziel-Sequenzen in den 5'-NTRs von mRNAs detektiert werden können, die eine Regulation der Translation durch microRNAs vermitteln.



**Abbildung 59: Die Regulation der Translation durch Interaktion von microRNAs mit translatierten Sequenzbereichen erfordert eine verstärkte Basenpaarung der microRNA an die Ziel-RNA. (A)** Bei unvollständiger Hybridisierung der microRNA an Ziel-Sequenzen in translatierten Sequenzbereichen (offener Leserahmen, ORF) stören translatierende Ribosomen die Anlagerung der miRNP-Komplexe. **(B)** Eine verstärkte Basenpaarung der microRNA mit der Ziel-Sequenz führt zu stabiler Anlagerung von miRNP-Komplexen an translatierte Sequenzbereiche der RNA.

Die Befunde zeigen insgesamt, dass die Regulation der Translation aufgrund der Bindungseigenschaften der meisten microRNAs in tierischen Zellen hauptsächlich durch Interaktion mit der 3'-NTR der RNAs stattfindet. Die Möglichkeit einer Translationsregulation durch Interaktion mit der 5'-NTR besteht jedoch bei einer Cap-unabhängigen Translation durch Lokalisation der Ziel-Sequenzen stromaufwärts einer IRES sowie bei der Cap-abhängigen Translation durch verstärkte Basenpaarung der microRNA. Die Funktionalität von microRNAs bei der Regulation der Translation wird folglich sowohl von der Position der Ziel-Sequenzen in der RNA als auch von der Bindungskapazität der microRNA an die Ziel-RNA bestimmt. Diese Faktoren könnten des Weiteren einen Einfluss darauf haben, ob eine microRNA reprimierend oder stimulierend auf die Translation einer RNA wirkt.

Nach den oben beschriebenen Kenntnissen erfordert die Regulation der Translation durch Interaktion von microRNAs mit Protein-kodierenden Sequenzen oder der 5'-NTR einer gecappten RNA eine verstärkte Basenpaarung der microRNAs mit der Ziel-RNA. Zum einen wurde gezeigt, dass die vollständige Hybridisierung einer microRNA eine Degradation der Ziel-RNA induziert, wie es auch von siRNAs bekannt ist (Abb. 60) (Hutvanger & Zamore, 2002; Meister & Tuschl, 2004; Yekta et al., 2004). Zum anderen könnte eine stabile Anlagerung von miRNP-Komplexen zu einer Beeinträchtigung der Ablesevorgänge der Ribosomen führen (Abb. 60). Dies lässt vermuten, dass eine wirksame Interaktion von microRNAs mit translatierten Sequenzbereichen und der 5'-NTR gecappter RNAs hauptsächlich in einer Repression der Proteinexpression resultiert. Übereinstimmend mit dieser Hypothese wurde in fast allen bisherigen Studien, die eine Interaktion von microRNAs mit entsprechenden Sequenzen beschreiben, eine reprimierende Wirkung auf die Proteinexpression beobachtet (Kloosterman et al., 2004; Duursma et al., 2008; Forman et al., 2008; Tay et al., 2008).

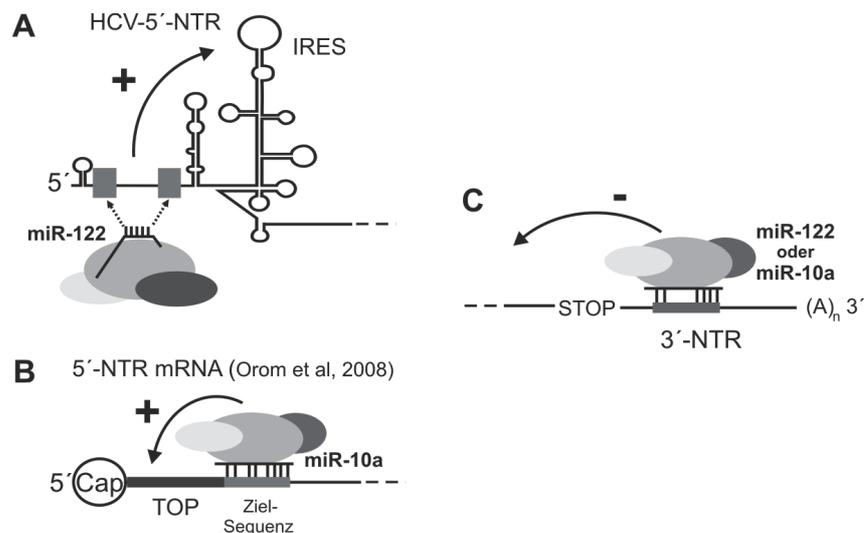


**Abbildung 60: Die verstärkte Basenpaarung von microRNAs mit translatierten Sequenzbereichen der Ziel-RNA reprimiert die Proteinexpression.** Eine wirksame Interaktion von microRNAs mit Ziel-Sequenzen in translatierten Sequenzbereichen (offener Leserahmen, ORF) erfordert eine nahezu vollständige Komplementarität der microRNA mit der Ziel-RNA, was zu einer Beeinträchtigung der Ablesevorgänge der Ribosomen oder zu einer Degradation der RNA führen kann.

Eine Ausnahme beschreibt die Studie von Orom et al. (2008), in der trotz verstärkter Basenpaarung der miR-10a mit der 5'-NTR der für ribosomale Proteine kodierenden mRNA eine Stimulation der Translation nachgewiesen wurde. Dass die Anlagerung von miRNP-Komplexen in diesem Fall nicht zur einer Translationsrepression durch Störung des „Scanning“ der Ribosomen führt, kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die 5'-NTR der mRNA ribosomaler Proteine nur eine Ziel-Sequenz für die miR-10a enthält (Orom et al. 2008), während an der Repression der Translation durch Interaktion von microRNAs mit translatierten Sequenzen mehrere aufeinander folgende Ziel-Sequenzen beteiligt sind (Kloosterman et al., 2004; Forman et al., 2008; Gu et al., 2009). Die Anlagerung eines einzelnen miRNP-Komplexes an die 5'-NTR stellt möglicherweise kein bedeutendes Hindernis für „scannende“ Translationskomplexe dar, während die Bindung mehrerer miRNP-Komplexe diesen Vorgang beeinträchtigt.

Die Stimulation der Translation der mRNA durch miR-10a wird möglicherweise durch vom Grad der Basenpaarung der microRNA unabhängige Effekte vermittelt. Wie für zahlreiche andere microRNAs gezeigt, hat auch die miR-10a bei Interaktion mit der 3'-NTR einer mRNA einen inhibitorischen Einfluss auf die Translation, während die Bindung an die 5'-NTR von mRNAs ribosomaler Proteine eine translationsfördernde Wirkung hat (Abb. 61B,C) (Orom et al., 2008). Auch die miR-122 reprimiert die Translation durch Bindung an die 3'-NTR einer mRNA (Chang et al., 2004; Henke, Goergen et al., 2008; Jopling et al., 2008) während die HCV-Translation durch Hybridisierung der miR-122 an die 5'-NTR stimuliert wird (Abb. 61A,C). Dies zeigt, dass eine Art microRNA unterschiedliche Wirkungen auf die Translation vermitteln kann. Diese duale Funktion der microRNAs könnte einerseits durch eine Rekrutierung verschiedener Proteine in miRNP-Komplexe hervorgerufen werden, die unterschiedliche Effektor-Funktionen vermitteln. Andererseits könnte auch die Position der Ziel-Sequenzen in der RNA einen Einfluss auf die Wirkung der microRNAs haben. Bei der HCV-Translation scheint, wie im vorigen Kapitel beschrieben, die Lokalisation der Ziel-Sequenzen in direkter Nähe der HCV-IRES entscheidend für die stimulatorische Wirkung der miR-122 zu sein (Abb. 61A). Für die Stimulation der Translation der mRNA ribosomaler Proteine durch

miR-10a wurde gezeigt, dass diese von einem terminalen Oligopyrimidin-Trakt (5'-TOP-Trakt) abhängig ist, der direkt stromaufwärts der microRNA-Ziel-Sequenz lokalisiert ist (Abb. 61B) (Orom et al., 2008). Der 5'-TOP-Trakt ermöglicht eine Regulation der Translation abhängig vom Wachstums-Status der Zelle (Hamilton et al., 2006; Orom et al., 2008). Unter Wachstumsarrest vermittelt dieser eine Repression der Translation, wobei unter anderem die Anlagerung von inhibitorischen Faktoren vermutet wird (Biberman & Meyuhas, 1999; Hamilton et al., 2006). Eine mögliche Erklärung für den stimulatorischen Effekt der miR-10a wäre daher, dass die Interaktion der microRNA mit der Ziel-RNA in direkter Nähe zum translationsregulierenden 5'-TOP-Trakt die Anlagerung von inhibitorischen Faktoren beeinträchtigt (Orom et al., 2008).



**Abbildung 61: Die Position der Ziel-Sequenzen hat einen Einfluss auf die Wirkung von microRNAs auf die Translation.** (A) miR-122 stimuliert die HCV-Translation durch Interaktion mit Ziel-Sequenzen (graue Kästen) in der HCV-5'-NTR direkt stromaufwärts der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES). (B) miR-10a stimuliert die Translation von für ribosomale Proteine kodierende mRNAs durch Interaktion einer Ziel-Sequenz (grauer Kasten) in der 5'-NTR direkt stromabwärts eines terminalen Oligopyrimidin-Traktes (TOP, dunkelgrauer Kasten). (C) miR-122 oder miR-10a reprimieren die Translation einer RNA durch Interaktion mit Ziel-Sequenzen in der 3'-NTR.

Die Erkenntnisse aus Untersuchungen der Translationsregulation durch miR-122 und miR10a geben folglich Hinweise darauf, dass die Wirkung einer microRNA auch unabhängig von deren Bindungseigenschaften durch die Position der Ziel-Sequenzen bestimmt wird, wobei eine Stimulation der Translation möglicherweise durch Lokalisation der Ziel-Sequenzen in direkter Nähe zu translationsregulatorischen Sequenzen in der 5'-NTR der Ziel-RNA vermittelt wird.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit in Zusammenhang mit anderen Untersuchungen, dass die Funktionalität und die Wirkung von microRNAs bei der Regulation der Translation wesentlich durch die Position der Ziel-Sequenzen der microRNA sowie deren Bindungseigenschaften an die Ziel-RNA bestimmt wird. Diese Erkenntnisse könnten in Zukunft sowohl bei der Auffindung von noch unbekanntenen funktionellen microRNA-Ziel-Sequenzen sowie bei der Aufklärung des Wirkmechanismus einer microRNA hilfreich sein.

## 5 Die microRNA-122 als Determinante für den Lebertropismus des HCV

Der Gewebetropismus eines Virus wird zum einen durch die Interaktion des Virus mit zellulären Oberflächenmolekülen bestimmt, die den Eintritt des Virus in die Wirtszelle ermöglichen. Diese werden jedoch nicht in allen Fällen gewebespezifisch exprimiert, sodass zum anderen auch Faktoren, die eine produktive intrazelluläre Vermehrung des Virus begünstigen, entscheidend zu einer Gewebespezifität beitragen können.

Das Hepatitis C Virus hat ein enges Wirtsspektrum und repliziert vorwiegend in humanen Hepatozyten (Lauer & Walker, 2001). Ein Aspekt, der möglicherweise zu einem Lebertropismus des HCV beiträgt, ist die verstärkte Assoziation der Viruspartikel mit Lipoproteinen, die vermutlich eine Aufnahme der im Blut zirkulierenden Virionen in der Leber über Lipoprotein-Rezeptoren fördern (Monazahian et al., 1999; Wunschmann et al., 2000). Lipoprotein-Rezeptoren sowie andere für den Eintritt des HCV in Hepatozyten relevante Kofaktoren werden zwar verstärkt, jedoch nicht ausschließlich in Leberzellen exprimiert, sodass theoretisch auch eine Aufnahme des Virus in andere Zellen möglich ist (Burlone & Budowska, 2009; Perrault & Pécheur, 2009). Einen weiteren Hinweis, dass nicht allein Faktoren, die den Viruseintritt in Hepatozyten begünstigen, die Gewebespezifität des HCV vermitteln, geben Versuche zur Etablierung eines HCV-Replikon-Systems in Zellkultur. Die Versuche zeigen, dass eine effiziente und stabile Replikation des HCV-Genoms in der humanen Hepatoma-Zelllinie Huh7 möglich ist, während diese in anderen Zelllinien mit geringerer Effizienz abläuft (Lohmann et al., 1999; Zhu et al., 2003; Ali et al., 2004; Date et al., 2004; Kato et al., 2005). Dies deutet auf eine Abhängigkeit der intrazellulären Vermehrungsschritte des HCV von leberspezifischen Faktoren hin.

Für das HCV konnten bisher einige zelluläre Proteine identifiziert werden, die die Translation sowie die Replikation der HCV-RNA positiv beeinflussen (zusammengefasst in Moriishi & Matsuura, 2007; Randall et al., 2007; Niepmann, 2009b). Allerdings werden diese, wie die bisher bekannten Rezeptoren, nicht gewebespezifisch exprimiert und können daher nur zu einer generellen Steigerung der Virusproduktion in humanen Zellen beitragen.

Die microRNA-122 wird dagegen spezifisch und mit sehr hohem Gehalt in ausdifferenzierten Hepatozyten (135000 Kopien/Zelle) sowie mit geringerem aber dennoch hohem Maße in der humanen Hepatoma-Zelllinie Huh7 (16000 Kopien/Zelle) exprimiert (Lagos-Quintana et al., 2002; Chang et al., 2004; Sempre et al., 2004; Landgraf et al., 2007). Knockdown-Studien der miR-122 in Leberzellen weisen auf eine Funktion bei der Regulation des Lipidmetabolismus sowie auf eine Beteiligung der miR-122 bei der Zelldifferenzierung zu Hepatozyten hin (Krützfeld et al., 2005; Esau et al., 2006), was deren zentrale Rolle bei der Ausprägung des terminal differenzierten Phänotyps der Hepatozyten verdeutlicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die miR-122 eine direkte stimulierende Wirkung auf der Translation der HCV-RNA hat. Es wurde gezeigt, dass sowohl die endogen in Huh7-Zellen exprimierte miR-122 als auch die zugefügte synthetische miR-122 in Nicht-Leberzellen die

Translationseffizienz der HCV-RNA steigert (Henke, Goergen et al., 2008). Die Translation der viralen RNA ist einer der ersten Schritte der intrazellulären Vermehrung des HCV und nach bisherigen Kenntnissen eine Voraussetzung für eine effiziente Virusreplikation. Die miR-122 könnte daher durch die Stimulation der Translation zur Etablierung einer produktiven Infektion von Hepatozyten durch HCV beitragen.

Andere Studien postulierten, dass die miR-122 die Synthese der viralen RNA fördert (Jopling et al., 2005; Chang et al., 2008), was zusätzlich die Effizienz der HCV-Vermehrung in Leberzellen steigern könnte. Randall et al. (2007) zeigten außerdem, dass ein Abfangen der miR-122 sowie ein Knockdown von Proteinen, die an der Prozessierung von microRNAs beteiligt sind, zu einer reduzierten Virusproduktion in humanen Hepatoma-Zellen führt. Dass die microRNA-122 ein entscheidender Faktor für die Effizienz der intrazellulären Vermehrungsschritte des HCV ist, wird weiterhin durch die Beobachtung unterstützt, dass die Vermehrung von subgenomischen HCV-Replikons in der Hepatoma-Zelllinie HepG2, in der miR-122 nur in sehr geringen Mengen (< 140 Kopien/Zelle) nachweisbar ist (Chang et al., 2004), im Vergleich zu Huh7-Zellen weniger effizient ist (Date et al., 2004). Erst die Fusion von HepG2-Zellen mit primären humanen Hepatozyten, die einen hohen Gehalt an miR-122 aufweisen, steigert deren Replikationseffizienz (Date et al., 2004).

Die Bedeutung der miR-122 für die Vermehrung des HCV in Leberzellen wird zudem durch die Erprobung des Einsatzes von modifizierten antisense-Oligonukleotiden zur Inhibition der miR-122 als antivirales Mittel gegen HCV deutlich (Lanford et al., 2010; Pfeffer & Baumert, 2010). Lanford et al. (2010) veröffentlichten vor kurzem Daten aus einer Studie in chronisch mit HCV infizierten Schimpansen, die zeigten, dass die wöchentliche Gabe von spezifisch gegen die miR-122 gerichteten LNA (*locked nucleic acid*)-Oligonukleotiden über einen Zeitraum von drei Monaten den HCV-RNA-Gehalt in der Leber sowie im Serum nachhaltig senkt. Während des gesamten Behandlungszeitraums konnte keine Anreicherung von adaptiven Mutationen in den Ziel-Sequenzen der miR-122 in der HCV-5'-NTR detektiert werden, was möglicherweise auf der generellen Konserviertheit dieses Sequenzbereiches der HCV-RNA zwischen den HCV-Genotypen und Subtypen beruht und gegen eine Resistenzentwicklung spricht (Lanford et al., 2010). Des Weiteren konnten während der Zeit der Therapie keine schwerwiegenden Nebeneffekte aufgrund der Gabe von antisense-LNA-Oligonukleotiden beobachtet werden (Lanford et al., 2010), wobei die Risiken einer Leberschädigung durch die Langzeitwirkung einer Reduktion der endogenen miR-122 auf den allgemeinen Leberzellmetabolismus noch nicht absehbar sind und weitere Untersuchungen erfordern. Die Sequenzspezifische Inhibition der miR-122 in der Leber stellt nach den Ergebnissen dieser Studie einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie von Hepatitis C Virus-Infektionen dar, was die Relevanz der miR-122 für die Vermehrung des HCV in Hepatozyten unterstreicht.

Die Befunde zeigen insgesamt, dass die leberspezifische miR-122 den Vermehrungszyklus des HCV positiv beeinflusst und daher zum Lebertropismus des Virus beiträgt.

## IV MATERIAL

### 1 Bakterienstämme und Zelllinien

***E. coli* XL1-Blue** *E. coli* XL1-Blue (F<sup>-</sup>:Tn10, proA<sup>+</sup> B<sup>+</sup> lac<sup>g</sup>, (lacZ), M15/recA1 end, A1 gyrA96, (Nal<sup>r</sup>)thi, hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>-</sup>), supE44, relA1 lac): Der EndA<sup>-</sup>-Phenotyp ermöglicht die Präparation von DNA mit sehr hoher Qualität.

**Naive Huh7-Zellen** permanente Zelllinie aus humanen Hepatoma-Zellen  
erhalten von AG Bartenschlager, Heidelberg

**HeLa-Zellen** permanente Zelllinie aus Zellen eines humanen Zervixkarzinoms  
bezogen von European Collection of Cell Cultures (ECACC)

### 2 Kulturmedien

Alle verwendeten Kulturmedien wurden selbst angesetzt. Agar-Platten wurden vom Universitätsklinikum Standort Gießen bezogen.

Beschreibung	Bestandteile	Endkonzentration	Firma
Standard-I Nährmedium	Pepton	15 g/l	Merck, Darmstadt
	Hefeextrakt	3 g/l	
	Natriumchlorid (NaCl)	6 g/l	
	D-Glucose	1 g/l	
Luria-Broth (LB)-Medium (pH 7,5)	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	Roth, Karlsruhe
	Trypsin-verdautes Pepton	1 % (w/v)	
	Natriumchlorid	1 % (w/v)	
Agar-Platten	LB-Medium		Klinikum Gießen
	Bacto Agar	1,5 % (w/v)	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	[+] Glucose		Invitrogen, Karlsruhe
	[+] L-Glutamine	4,5 g/l	
	[-] Pyruvate		

### 3 Nukleinsäuren

#### 3.1 Plasmide

Das Plasmid pHCV-CLX-CMV diente als Ausgangs-Konstrukt für die meisten in dieser Arbeit klonierten Plasmid-Konstrukte.

Name	Beschreibung	Kloniert von
pHCV-CLX-CMV	T7, HCV-5'-NTR, Core, Ubi, <i>Firefly</i> -Luziferase, HCV-3'-NTR	Y. Song
pHCV-CLX-sin	T7, HCV-5'-NTR, 96nt ORF, HCV-3'-NTR	Y. Song
pHCV-deltaVR	pHCV-CLX-CMV mit Deletion der variablen Region in HCV-3'-NTR	Y. Song
pHCVmut bulge	pHCV-CLX-CMV mit Mutation der variablen Region in HCV-3'-NTR	D. Goergen
pHCVclosed stem	pHCV-CLX-CMV mit Mutation der variablen Region in HCV-3'-NTR	D. Goergen
pHCV 5mut1	pHCV-CLX-CMV mit Mutation 1. miR-122-Zielseq. in HCV-5'-NTR	C. Jünemann
pHCV 5mut2	pHCV-CLX-CMV mit Mutation 2. miR-122-Zielseq. in HCV-5'-NTR	J. Henke

Name	Beschreibung	Kloniert von
pHCV 5mut1/2	pHCV-CLX-CMV mit Mutation 1.+2. miR-122-Zielseq. in HCV-5'-NTR	J. Henke
pHCVmut (24-38)	pHCV-CLX-CMV mit Mutation in Core-Zielseq. in HCV5'-NTR	D. Goergen
pHCVmut (428-442)	pHCV-CLX-CMV mit Mutation in Core-Sequenz	D. Goergen
pHCVmut comp	pHCV-CLX-CMV mit Mutation in Core-Zielseq. und Core-Sequenz	D. Goergen
pHCV5'mut3'	pHCV-CLX-CMV mit Mutation in miR-122-Zielseq. in HCV 5'-NTR	D. Goergen
pHCVFL	T7, HCV-5'-NTR, <i>Firefly</i> -Luziferase, HCV-3'-NTR	C. Jünemann
pHCVFmut122	pHCV-CLX-CMV mit Mutation in miR-122-Zielseq. in <i>Firefly</i> -Seq.	D. Goergen
pD5	Sp6, <i>Firefly</i> -Luziferase	M. Niepmann
pD5Fmut122	pD5 mit Mutation in miR-122-Zielsequenz in <i>Firefly</i> -Sequenz	D. Goergen
pM12	Sp6, FMDV-IRES, <i>Firefly</i> -Luziferase	M. Niepmann
pPTV-HCV	T7, PTV-IRES, <i>Firefly</i> -Luziferase, HCV-3'-NTR	C. Bung
phRLnull	T7, <i>Renilla</i> -Luziferase	Promega
pM12+HCV3'-NTR	T7, anti- <i>Firefly</i> -Sonde	Y. Song
pM12+NS5B	T7, anti-NS5B-Sonde	Y. Song
ph-anti-GAPDH	T7, anti-GAPDH-Sonde	J. Henke
pHCVFL-12868 (pFK1-our HCV1a)	T7, vollständiges HCV-Genom, Ribozym	Y. Song
pHCVFLdg	T7, vollst. HCV-Genom mit Mutation in NS5B-Polymerase, Ribozym	AG Bartenschlager Heidelberg

## 3.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers.net GmbH, Ulm oder Thermo Elektron bezogen. Das Oligonukleotid Bio-LNA-anti-ORF wurde von der Firma Eurogentec S.A., Köln hergestellt.

### 3.2.1 DNA-Oligonukleotide

Beschreibung	[bps]	Sequenz (5'-3')	Verwendung
HCMV_4986_for	27	CCA ATA GGC CGA AAT CGG CAA AAT CCC	DNA-Matrize für HCV-RNA
HCV_3X_rev	22	ACA TGA TCT GCA GAG AGG CCA G	DNA-Matrize für HCV-RNA
HCMV_Luc_rev	23	TTC ACA ATT TGG ACT TTC CGC CC	DNA-Matrize für HCV-RNA
HCVmut (24-38)_For1	23	GAC TTT CCA TTG ACG TCA ATG GG	Klonierung pHCVmut (24-38)
HCVmut (24-38)_For2	36	CGA CAC ACC TCC TTA TAT CAC TCC CCT GTG AGG AAC	Klonierung pHCVmut (24-38)
HCVmut (24-38)_Rev1	34	GAG TGA TAT AAG GAG GTG TGT CGC CCC CAA TCG G	Klonierung pHCVmut (24-38)
HCVmut (24-38)_Rev2	22	CAA CAG GTA AAC TCC ACC AAC G	Klonierung pHCVmut (24-38)
HCVmut (428-442)_For1	22	GAC ACT CCA CCA TAG ATC ACT C	Klonierung pHCVmut (428-442)
HCVmut (428-442)_For2	34	CAG ATA GTA GGA GGT GTT TAC CTG TTG CCG CGC A	Klonierung pHCVmut (428-442)
HCVmut (428-442)_Rev1	33	GTA AAC ACC TCC TAC TAT CTG ACC ACC GCC CGG	Klonierung pHCVmut (428-442)
HCVmut (428-442)_Rev2	22	CCT TGA CAT TCT CGA TGG TGT C	Klonierung pHCVmut (428-442)
HCV5'mut3'_For1	34	GCG ACA CTC CTT TAT AGA TCA CTC CCC TGT GAG G	Klonierung pHCV5'mut3'

Beschreibung	[bps]	Sequenz ( 5´- 3´)	Verwendung
HCV5´mut3´_Rev1	32	GAG TGA TCT ATA AAG GAG TGT CGC CCC CAA TC	Klonierung pHCV5´mut3´
Firefly forward	17	AGT GAC ACC ATC GAG AA	Klonierung pHCVFmut122
Flucmut122binsiderev	23	AAT ATC TAA CGT AGT AAA CAT TC	Klonierung pHCVFmut122
Fucmut122binside	24	GAA TGT TTA CTA CGT TAG GAT ATT	Klonierung pHCVFmut122
flucreverse	17	TTC CGG TAA GAC CTT TC	Klonierung pHCVFmut122
Seq_HCVFluc_mutmiRsite	20	CAC GTT CGT CAC ATC TCA TC	Sequenzierung pHCVFmut122
Bio-LNA-anti ORF <sup>1)</sup>	20	cTt CtT GGC CTt Tac CTg Tg <sup>2)</sup>	Isolierung Translationskomplexe

<sup>1)</sup> im Text der Arbeit bezeichnet als Biotin-gekoppeltes DNA/LNA-Oligonukleotid

<sup>2)</sup> die Kleinbuchstaben bezeichnen modifizierte Nukleotide (*locked nucleic acids*, LNAs)

### 3.2.2 RNA-Oligonukleotide

Beschreibung	[nts]	Sequenz ( 5´- 3´)
microRNA-122mat	22	(PHOS) UGG AGU GUG ACA AUG GUG UUU G
microRNA-122*	22	(PHOS) AAC GCC AUU AUC ACA CUA AAU A
microRNA-122mut3´mat	22	(PHOS) UGG AGU GUG ACA AUA AAG UUU G
microRNA-122mut3´*	22	(PHOS) AAC UUU AUU AUC ACA CUA AAU A
microRNA-122/18mat	18	(PHOS) UGG AGU GUG ACA AUG GUG
microRNA-122/18*	18	(PHOS) CCA UUA UCA CAC UAA AUA
microRNA-122/12mat	12	(PHOS) UGG AGU GUG ACA
microRNA-124mat	22	(PHOS) UUA AGG CAC GCG GUG AAU GCC A
microRNA-124*	22	(PHOS) GUG UUC ACA GCG GAC CUU GAU U
anti-microRNA-122 <sup>1)</sup>	31	AGA CAC AAA CAC CAU UGU CAC ACU CCA CAG C
anti-microRNA-124 <sup>1)</sup>	22	UGG CAU UCA CCG CGU GCC UUA A
15mer	15	GUG AUC UAU GGU GGA

<sup>1)</sup> Modifikation: 2´-O-Methylierung

\* Gegenstrang zur Herstellung von microRNA-Duplexen

### 3.3 Nukleotide

Bei den molekularbiologischen Methoden werden nicht modifizierte Nukleotide, radioaktiv markiertes Uridin-Triphosphat und Biotin-gekoppeltes Cytidin-Triphosphat verwendet.

Beschreibung	Firma
Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Roth, Karlsruhe
Ribonukleosid-Triphosphate (rNTPs)	Roth, Karlsruhe
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-rUTP (800 Ci/mmol, 1 mCi)	Perkin Elmer, USA
Biotin-14-rCTP	Invitogen, Karlsruhe
DIG-rUTP	Roche, Mannheim
M <sup>7</sup> -GpppG (Capping-Nukleotide)	Promega, Mannheim

## 4 Enzyme

### 4.1 Restriktionsendonukleasen

Alle Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer wurden von den Firmen New England Biolabs oder Fermentas bezogen. Die Enzyme wurden nach Angaben der Hersteller verwendet.

Enzym	Erkennungssequenz <sup>1)</sup>	Verwendung
AgeI	5' A↓ CCGGT3'	Klonierung pHCVmut (24-38), mut (428-442), mut comp
BamH I	5' G↓GATCC3'	Linearisierung ph-anti-GAPDH, pM12
Bgl II	5' A↓GATCT3'	Klonierung pHCVmut (428-442), pHCVmut (24-38)
BstEII	5' G↓GTNACC3'	Klonierung pD5Fmut122
EcoN I	5' CCTNN↓NNNAGG3'	Linearisierung pM12
EcoR V	5' GAT↓ATC3'	Klonierung pHCVFmut122, pD5Fmut122 Linearisierung pM12+HCV-3'-NTR
KpnI	5' GGTAC↓ C3'	Linearisierung pM12+NS5B
NdeI	5' CA↓TATG3'	Klonierung pHCVmut (24-38), pHCV5' mut3'
SmaI	5' CCC↓GGG3'	Linearisierung pD5 und pD5Fmut122
SpeI	5' A↓CTAGT3'	Linearisierung pHCVFL-12868
XbaI	5' T↓CTAGA3'	Klonierung pHCVFmut122
XmaI	5' C↓CCGGG3'	Linearisierung pMPolio

<sup>1)</sup> Die Pfeile in den Sequenzen geben die Schnittstellen des Enzyms an.

### 4.2 Andere modifizierende Enzyme

Enzym	Konzentration	Firma
Alkaline Phosphatase, Shrimp (SAP)	1 U/μl	Roche, Mannheim
CombiZyme DNA-Polymerase	4 U/μl	Invitex, Karlsruhe
DNase I (RNase frei)	10 U/μl	New England Biolabs, Frankfurt
GoTaq Flexi DNA-Polymerase	5 U/μl	Promega, Mannheim
Poly(A)-Polymerase	600U/μl	USB Corporation, USA
Proteinase K	10 μg/μl	Merck, Darmstadt
RNase A	10 μg/μl	New England Biolabs, Frankfurt
Sp6 RNA-Polymerase	20/μl	New England Biolabs, Frankfurt
T4 DNA-Ligase	400 U/μl	New England Biolabs, Frankfurt
T7 RNA-Polymerase	20 U/μl	Fermentas, St.Leon-Rot

## 5 Radioaktiv markierte Aminosäuren

Zur Markierung von *in vitro* translatierten Proteinen wurde L-[<sup>35</sup>S]-Methionin (>1000 Ci/mmol; 1mCi) der Firma Perkin Elmer, USA, verwendet.

## 6 Antikörper

Beschreibung	Firma
Anti-EIF2C2 (Ago2) Mouse IgG1 (monoklonal)	Abnova Corporation, Taiwan
Anti-eIF3-p110	hergestellt von E. Tzima
Goat anti-Mouse IgG-POD (polyclonal; Lumi-Light <sup>PLUS</sup> Westen Blotting Kit)	Roche, Mannheim

## 7 Protease- und Proteasom-Inhibitoren

Beschreibung	Firma
Hemin	Sigma, Taufkirchen
Lactacystin	Pepta Nova, Sandhausen
Proteaseinhibitor-Cocktail Tabletten (complete, EDTA-free)	Roche, Mannheim

## 8 Translationsinhibitoren

Beschreibung	Firma
Anisomycin	Sigma, Taufkirchen
Cycloheximid	Merck, Darmstadt
GMP-PNP (Guanosin-5'-[ $\beta$ , $\gamma$ -imido]triphosphat trisodium salt hydrate)	Sigma, Taufkirchen

## 9 *In vitro* Translationssysteme

Beschreibung	Firma
Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (engl. <i>rabbit reticulocyte lysate</i> , RRL)	Promega, Karlsruhe
HeLa-Zellextrakt	Cilbiotec, Belgien

## 10 Größenstandards für elektrophoretische Auftrennungen

### 10.1 DNA-Größenstandards

Die DNA-Größenstandards werden bei der Agarosegel-Elektrophorese für DNA und RNA verwendet.

Marker	Größen [bp]	Firma
HyperLadder I	10.000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200	Bioline, Luckenwalde

## 10.2 Protein-Größenstandards

Die Protein-Größenstandards werden für Polyacrylamidgele verwendet.

Marker	Proteine	Größe [kDa]	Firma
<sup>14</sup> C-Marker	Myosin	220	GE Healthcare, München
	Phosphorylase B	97,4	
	Bovines Serumalbumin (BSA)	69	
	Ovalbumin	45	
	Carboanhydrase	30	
	Lysozym	14,3	
PageRuler™ Prestained Protein Ladder		10-170	Fermentas, St. Leon-Rot

## 11 Kits

Name	Firma
Affinity Purification of Plasmid DNA, Nucleobond	Macherey-Nagel GmbH&CoKG, Düren
CombiZyme DNA Polymerase Mix	Invitek, Karlsruhe
DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids	Roche, Mannheim
GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, München
GoTaq Flexi DNA Polymerase Kit	Promega, Karlsruhe
Lumi Light <sup>PLUS</sup> Western Blotting Kit	Roche, Mannheim
Mini Quick Spin Columns Kit	Roche, Mannheim
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Quick Spin Columns Kit	Roche, Mannheim
Wizard <sup>Plus</sup> SV Minipreps DNA Purification System	Promega, Karlsruhe
WST-1	Roche, Mannheim

## 12 Spezielle Chemikalien und Reagenzien

Aufgelistet sind spezielle verwendete Chemikalien und Reagenzien, ausgenommen der Bestandteile von Puffern und Lösungen aus Kits. Alle nicht aufgelisteten gängigen Chemikalien wurden bei der Firma Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

Methoden	Beschreibung	Firma
Mikrobiologisch	Ampicillin	Roth, Karlsruhe
	Tetracyclin	Sigma, Taufkirchen
	Glycerol	Roth, Karlsruhe
Arbeit mit DNA/RNA	Acrylamid-Lösung (AA, 38,7 % Monoacrylamid, 1,3 % Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
	Agarose	Biozym, Oldendorf
	Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
	Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
	Chloroform	Sigma, Taufkirchen
	Dithiothreitol (DTT)	Biozym, Oldendorf

Methoden	Beschreibung	Firma
Arbeit mit DNA/RNA	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
	Ethidiumbromid (EtBr)	Merck, Darmstadt
	Formaldehyd (37 %)	Roth, Karlsruhe
	Formamid	Gibbco-BRL, Karlsruhe
	Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
	N-Laurolylsarcosin	Sigma, Taufkirchen
	Phenol	Sigma, Taufkirchen
	Sephadex G25-Medium	GE Healthcare, München
	Spermidin	Sigma, Taufkirchen
	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Merck, Darmstadt
	Trizol-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
	Tween <sup>®</sup> 20	Sigma, Taufkirchen
	Xylencyanolblau FF	Roth, Karlsruhe
Zellkultur	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
	Fetal Bovine Serum (fötales Rinderserum, FBS)	PAA GmbH, Cölbe
	100 x Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
	10 x Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
	WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche, Mannheim
Proteinbiochemisch	Aceton	Roth, Karlsruhe
	Acrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
	Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
	Coenzym A	Sigma, Taufkirchen
	Coelenterazin	Roche, Mannheim
	Coomassie-Brilliant-Blau R250	Serva, Heidelberg
	D-Luciferin	Promega, Mannheim
	Lipofectamine <sup>®</sup> 2000	Invitrogen, Karlsruhe
	Glycylglycin	Roth, Karlsruhe
	(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> x 5H <sub>2</sub> O (Magnesiumcarbonat-hydrat)	Sigma, Taufkirchen
	Passiver Lyse-Puffer (PLB)	Promega, Mannheim
	Rotiload	Roth, Karlsruhe
	SkimMilk	Difco BD, USA
	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Merck, Darmstadt
	Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Tricine	ICN Biomed., Frankfurt	
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma, Taufkirchen	
RNA-Protein Wechselwirkungen	BioMag Nuclease-Free Streptavidin Beads	Qiagen, Hilden
	Bovines Serumalbumin (BSA)	Promega, Mannheim
	Rotiszint eco plus	Roth, Karlsruhe
	Sucrose (D-Saccharose)	Roth, Karlsruhe
	tRNA	Sigma, Taufkirchen
Autoradiographie	Cronex MD-Developer	Du Pont, Bad Homburg
	Cronex MF-E Fixer	Du Pont, Bad Homburg

### 13 Spezielle Verbrauchsmaterialien

Beschreibung	Firma
Cryo-Röhrchen	TPP, Schweiz
Elektroporationsküvetten	Biorad, München
Kodak X-omat XAR5 Röntgenfilme	Eastman Kodak, Rochester, NY, USA
Luminometer-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
24-well Mikrotiterplatten	TPP, Deutschland
Nylonmembran Roti <sup>®</sup> Nylon Plus	Roth, Karlsruhe
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore Corp., Schwalbach
Quick-Seal-Röhrchen	Beckman Instruments, München
Szintillationsröhrchen	MAGV, Rabenau
Whatman <sup>®</sup> -Papier	Machery-Nagel GmbH&CoKG, Düren
Zellkulturflasche T25	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen 100mm x 20 mm	Corning, Wiesbaden
Zentrifugations-Röhrchen SW40	Beckmann Coulter, München (über: Konrad Beranek, Weinheim)

### 14 Geräte

Beschreibung	Firma
Blotapparatur, Fastblot B43/B44	Biometra, Göttingen
CO <sub>2</sub> -Inkubator Serie CB	Binder GmbH, Tuttlingen
Elektroporator, EQUIBIO EasyjecT Prima	Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA
Elisa-Reader, ELx800	BioTek, Bad Friedrichshall
Filmkassetten, Cronex Lightning Plus	Du Pont, USA
Gel-Dokumentationssystem, Gel-DocXR	Bio-Rad, München
Hera safe Sterilbank	Heraeus, Hanau
Heizblock, MBT 250	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Magna Rack	Invitrogen, Karlsruhe
Minigel-Systeme	von Keutz, Reiskirchen
Hybridisierungsöfen, HB-1000 Hybridiser	UVP, USA
Isopropanol-Tank	Quallilab/Olivet, Frankreich
Kippschüttler, Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Kühlzentrifuge J2-21, Rotor J14 und J20	Beckman Instruments, München
Luminometer, Lumat LB9507	Berthold Technologies, Schweiz
PCR-Maschine, Tprofessional	Biometra, Göttingen
Szintillations-Zähler, Tri-Carb 1500	Packard, Australien
Tischzentrifuge, Centrifuge 5415C und 5417R	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge, Optima <sup>™</sup> LE-80K	Beckman Instruments, München
UZ Rotoren, VTi 65.2; SW40	Beckman Instruments, München
Vortex Genie 2	Scientific Industries Bohemia, New York

## V **METHODEN**

### 1 **Mikrobiologische Methoden**

#### 1.1 **Kultivierung von *E.coli* XL1-Blue**

Die Kultivierung von *E.coli* XL1-Blue erfolgt auf Agar-Platten mit LB-Nährmedium oder in Flüssigkultur mit Standard I-Medium. Die gewünschten Klone werden über Antibiotika-Resistenzen selektiert. Der Selektionsmarker des *E.coli*-Stammes XL1-Blue ist eine Tetracyclin-Resistenz. Die verwendeten Plasmid-Konstrukte tragen die Erbinformation für eine Ampicillin-Resistenz. Die entsprechenden Antibiotika werden dem Medium zugesetzt (Tetracyclin Endkonzentration 5 µg/ml, Ampicillin Endkonzentration 150 µg/ml). Die Inkubation der Kulturen erfolgt, wenn nicht anders beschrieben, über Nacht bei 37 °C.

#### 1.2 **Herstellung von Glycerol-Stocks von Bakterien**

Glycerol-Stocks dienen der Langzeit-Lagerung von Transformanten und kompetenten Bakterienzellen. Dazu wird ein Volumen einer Übernacht-Kultur mit 1/4 Volumen Glycerol (60 - 80 %) gemischt und aliquotiert. Die Bakterien sind in dieser Form bei -70 °C mehrere Monate haltbar und rekultivierbar. Die Rekultivierung von Transformanten erfolgt durch Ausplattieren auf Antibiotika-Platten. Glycerolstocks kompetenter Bakterienzellen können direkt nach dem Auftauen für eine Transformation verwendet werden.

#### 1.3 **Transformation von *E.coli* XL1-Blue**

##### 1.3.1 **Herstellung elektrokompetenter Zellen**

Die Herstellung elektrokompetenter Zellen dient zur Vorbereitung der Bakterien auf die Transformation von Plasmid-DNA durch Elektroporation.

Eine am Vortag angesetzte Übernacht-Kultur (10 ml) von *E.coli* XL1-Blue wird mit Standard I-Medium (mit entsprechenden Antibiotika) 1 : 10 verdünnt. Die Kultur (100 ml) wird bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD) von ca. 0,6 auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation in einer vorgekühlten Zentrifuge (4 °C) bei ca. 5000 rpm (Kühlzentrifuge J2-21, Beckmann Instruments) für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Danach folgt das Waschen der Zellen. Dazu wird das Zellpellet in 50 ml eiskaltem bidestilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) durch Schütteln resuspendiert und anschließend wieder für 3 min bei ca. 5000 rpm (Kühlzentrifuge J2-21, Beckmann Instruments) in der vorgekühlten Zentrifuge abzentrifugiert. Nach dreimaliger Wiederholung des Waschschrilles wird das Pellet in ca. 2 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst.

Die elektrokompetenten Zellen können direkt für eine Transformation verwendet oder in Form von Glycerol-Stocks bei -70 °C aufbewahrt werden.

### 1.3.2 Transformation von DNA in kompetente Zellen durch Elektroporation

Die Elektroporation ist eine schnelle und effiziente Methode, um gewünschte Plasmid-DNA zur Vermehrung in Bakterienzellen zu transformieren. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wird die Permeabilität der Zellmembran erhöht, was zu einer gesteigerten Aufnahme der Plasmid-DNA führt. Für die Elektroporation werden 0,01 - 0,001 pmol Plasmid-DNA oder 0,05 - 0,1 pmol einer Ligationsreaktion mit 100 µl kompetenter Zellen gemischt und in eine Elektroporationsküvette überführt in die zuvor 50 µl ddH<sub>2</sub>O vorgelegt wurden. Anschließend erfolgt die Gabe des elektrischen Impulses im Elektroporator. Die Pulsdaten sind abhängig vom Zelltyp und betragen für *E.coli* XL1-Blue 25 µF, 200 - 400 Ohm, 2,5 kV. Danach werden die Zellen mit 1 ml Standard I-Nährmedium ohne Antibiotika versetzt, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden bei 5000 rpm (Centrifuge 5415C, Eppendorf) für 5 min pelletiert und der Überstand bis auf 1/5 Volumen abgenommen. Im restlichen Überstand werden die Zellen resuspendiert und auf Antibiotika-Platten ausplattiert.

## 2 Arbeiten mit DNA

Bei den hier beschriebenen Methoden werden alle Reaktionsansätze bei Bedarf mit bidestilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) auf das entsprechende Endvolumen gebracht.

### 2.1 DNA-Synthese

#### 2.1.1 Standard-Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der gezielten Vermehrung von DNA-Fragmenten. In dieser Arbeit wurden mit dieser Methode DNA-Matrizen zur Synthese von RNA amplifiziert.

Dazu benötigt man als Matrize Plasmid-DNA mit der gewünschten Sequenz, die vervielfältigt werden soll, und zwei Starter-DNA-Oligonukleotide (engl. *Primer*). Die Primer flankieren den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt in beiden Richtungen und sind komplementär zu dessen Sequenz. In der Reaktion liefern sie das freie 3'-OH-Ende, das die DNA-Polymerase zur Strangverlängerung benötigt.

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgt in einem Zyklus, bestehend aus der Strangtrennung (Denaturierung), der Anlagerung der Primer (Hybridisierung, Annealing) und der Verlängerung (Polymerisation, Elongation). Bei jedem Zyklus werden die DNA-Fragmente verdoppelt, sodass die DNA unter optimalen Bedingungen bei mehreren Zyklen etwa exponentiell vermehrt wird. Die Reaktion wird auf Eis pipettiert und in der PCR-Maschine TProfessional der Firma Biometra durchgeführt. Für die Reaktion wird das GoTaq Flexi-Polymerase Kit der Firma Promega verwendet.

<u>Standard-Programm</u>			<u>Standard-Reaktionsansatz</u>	
Schritt	Temperatur	Zeit	Bestandteile	Endkonzentrationen
Denaturierung	94 °C	2 min	GoTaq Flexi-Puffer	1 x
	94 °C	30 s	dNTPs	250 µM
Hybridisierung	nach Primer	1 min	MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
Polymerisation	72 °C	1 min	Primer A	1 µM
	72 °C	3 min	Primer B	1 µM
Kühlung	4 °C	nicht bestimmt	DNA-Matrize	10 ng/µl
			GoTaq Flexi-Polymerase	2 U/µl

### 2.1.2 Präparative Polymerase-Kettenreaktion

Die präparative PCR wird zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten genutzt, die anschließend für Klonierungen verwendet werden.

Statt der GoTaq-Polymerase der Firma Promega wird hier das CombiZyme DNA-Polymerase Kit der Firma Invitex eingesetzt. Die CombiZyme-Polymerase enthält eine Mischung aus Taq-Polymerase [ohne 3'-5'-Korrektur-Exonuklease-Aktivität] und einer Polymerase mit einer 3'-5'-Korrektur-Exonuklease-Aktivität wie die Pfu-Polymerase. Durch die hohe Lesegenauigkeit dieser Polymerase-Mischung und das Herabsetzen der Zyklenanzahl bei der PCR kann die Wahrscheinlichkeit von unerwünschten Mutationen in den enthaltenen Klonen verringert werden. Die Reaktionsbedingungen entsprechen denen der oben aufgeführten Standard-PCR (siehe Kapitel V.2.1.1) außer, dass statt des GoTaq-Flexi-Puffers der OptiPerform-Puffer III und OptiZyme Enhancer in einfacher Konzentration zugesetzt werden.

## 2.2 Modifikation von DNA (Mutagenese von DNA-Sequenzen und Klonierung)

Die folgenden Methoden dienen der Herstellung von Plasmid-Konstrukten mit mutierten Sequenzen.

### 2.2.1 Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR

Mit dieser PCR-Technik können punktgenaue Mutationen in Form von Deletionen, Insertionen und Substitutionen in eine bestimmte DNA-Sequenz eingefügt werden. Die Technik beruht auf einer zweistufigen PCR beschrieben in Hinguchi et al. (1988). In Abbildung 62 ist das Prinzip zur Einführung einer Mutation aufgezeigt.

Es werden vier Primer benötigt. Zwei Primer (Primer 2 und 3) dienen dazu, die Mutation zu setzen. Sie enthalten die mutierte Sequenz, flankiert von zur DNA-Matrize komplementären Sequenzabschnitten. Die zwei äußeren Primer (Primer 1 und 4) sind exakt komplementär zur DNA-Matrize und haben die Aufgabe, die Mutation in einen stabilen Bereich unmodifizierter DNA einzubinden und den entsprechenden DNA-Abschnitt anzureichern.

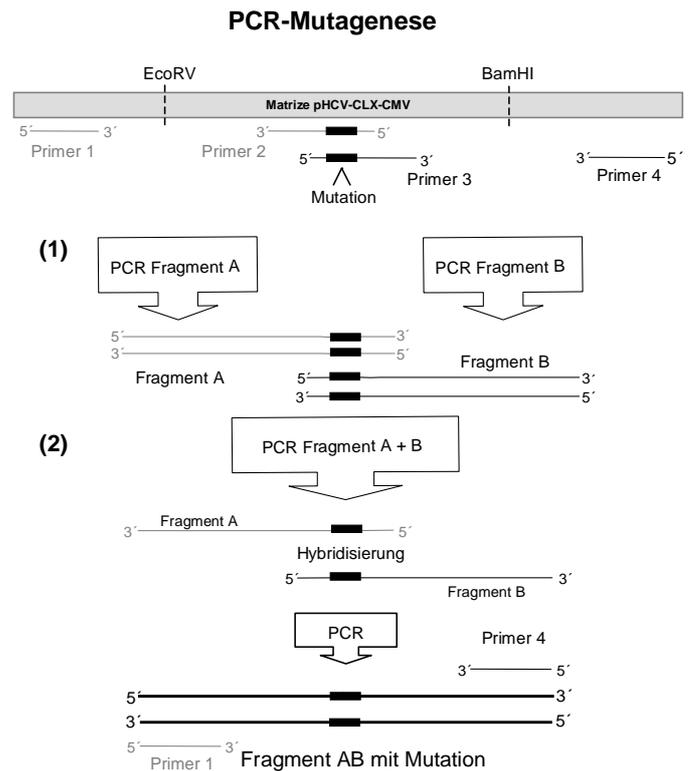
Mit je einem mutierten Primer und einem der äußeren Primer (1 plus 2 beziehungsweise 3 plus 4) werden in einer ersten PCR-Reaktion (1) zwei DNA-Fragmente, A und B, getrennt vervielfältigt. Die DNA-Fragmente A und B werden dann über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt, um die restlichen Primer und unspezifische PCR-Produkte zu entfernen. Die aufgereinigten DNA-Fragmente A und B werden anschließend 1 : 1 gemischt. Durch Komplementarität im Bereich der Mutation können die Fragmente in einer zweiten PCR-Reaktion (2) miteinander hybridisieren und verlängert werden. In Anwesenheit der beiden äußeren Primer erhält man dann das fusionierte Fragment AB, das die Mutation enthält. Das mutagenisierte DNA-Fragment AB wird anschließend mit ausgewählten Restriktionsenzymen

geschnitten, über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt und in den entsprechenden Vektor kloniert. Die Reaktionsbedingungen der PCR und das Programm für die PCR-Maschine entsprechen den unter Kapitel V.2.1.2 beschriebenen Angaben. Bei der zweiten PCR-Reaktion wurde im Programm die Zyklenzahl auf 20 herabgesetzt, um die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Mutationen zu verringern.

## 2.2.2 Enzymatische Modifikation von DNA

### 2.2.2.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion von Plasmid-DNA (Vektor) und PCR-Produkten dient der Klonierung von Plasmid-Konstrukten. Durch Restriktion werden passende DNA-Fragment- und Vektor-Enden generiert, die in einer Ligrationsreaktion zusammengefügt werden können. Die Reaktionsbedingungen für die endonukleolytische Spaltung von DNA werden je nach Enzym nach den Angaben des Herstellers gewählt. Der zu verwendende Restriktionspuffer wird vom Hersteller mit dem Enzym geliefert.



**Abbildung 62: Schematische Darstellung der zielgerichteten PCR-Mutagenese.** In grau dargestellt die DNA-Matrize, in die die Mutation eingefügt werden soll, mit Position der Primer. (1) Erste PCR-Stufe, bei der Fragmente A und B getrennt amplifiziert werden. (2) Zweite PCR-Stufe, bei der das mutierte Fragment A,B amplifiziert wird.

Standard-Restriktionsansatz

Bestandteile	Endkonzentration
Restriktionspuffer	1 x
BSA	1 x
DTT	1 mM
DNA	variabel
Restriktionsendonuklease	nach DNA-Menge

Die Konzentration der zu verdauenden DNA wird zuvor über ein analytisches Agarosegel bestimmt. Anhand der Menge der zu verdauenden DNA und der Enzymaktivität wird die einzusetzende Enzymmenge und die Inkubationsdauer berechnet.

Formel zur Berechnung der Enzymmenge für eine Inkubationsdauer von einer Stunde

$$\text{Menge der Schnittstellen [pmol/}\mu\text{l]} / \text{Aktivität des Enzyms [pmol hits/}\mu\text{l]} = \text{Enzymmenge [}\mu\text{l]}$$

Bei entsprechender Stabilität des Enzyms kann auch länger als eine Stunde inkubiert und entsprechend die Menge an Enzym reduziert werden. Der Restriktionsansatz wird auf Eis pipettiert und je nach Temperaturoptimum des Enzyms im Wasserbad inkubiert.

**2.2.2.2 Entfernung von 5'-Phosphatresten**

Die Enden von Vektoren werden durch alkalische Phosphatasen (Alkaline Shrimp Phosphatase, SAP) dephosphoryliert, um in einer Ligationsreaktion die Wahrscheinlichkeit einer Rückligation der Vektoren zu verringern. Die DNA-Fragmente werden dann mit einer höheren Effizienz in den Vektor eingebaut.

Für die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten werden 1 U alkalischer Phosphatase (1 U/ $\mu$ l) pro 0,2 pmol DNA zugegeben. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C für 1 h. Die alkalische Phosphatase (Shrimp) kann durch Inkubation für 15 min bei 65 °C inaktiviert werden. Anschließend können die DNA-Fragmente direkt in eine Ligationsreaktion eingesetzt werden.

**2.2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten**

DNA-Moleküle mit überstehenden Enden werden mit der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 ligiert. Es werden verschiedene Ligationsansätze mit unterschiedlichem Vektor-Fragment-Verhältnis pipettiert. Dabei bleibt die Vektorkonzentration konstant, die Fragmentkonzentration variiert. Das Größenverhältnis (Anzahl der Basenpaare) von Vektor und Fragment kann als Anhaltspunkt für das Konzentrationsverhältnis in der Reaktion dienen.

Standard-Ligationsansatz

Bestandteile	Endkonzentration
Ligasepuffer (10x)	1 x
rATP	0,5 mM
Vektor-DNA	0,03 pmol/10 µl
Fragment-DNA	variabel
T4-Ligase	20 U/µl

Der zu verwendende Ligasepuffer wird in 10-facher Konzentration angesetzt und enthält als Endkonzentration in der Reaktion 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT und 50 µg/ml BSA. Der Reaktionsansatz wird 4 h bei Raumtemperatur, dann bei 4 °C über Nacht inkubiert und anschließend in *E.coli* XL1-Blue transformiert.

**2.3 Präparation und Aufreinigung von DNA****2.3.1 Aufreinigung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)**

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wird das Wizard *Plus* SV Minipreps DNA Purification System (Promega) verwendet. Hiermit ist eine schnelle Plasmid-Präparation aus 1 – 10 ml Kulturen durch alkalische Lyse der Zellen mit einer Ausbeute von etwa 3 - 6 µg Plasmid-DNA/ml Bakterienkultur möglich. Die Aufreinigung erfolgt aus einer 1,5 ml Übernacht-Kultur transformierter Bakterien nach der im Präparations-Kit enthaltenen Anleitung. Alle benötigten Puffer und Materialien sind Bestandteile des Präparations-Kits.

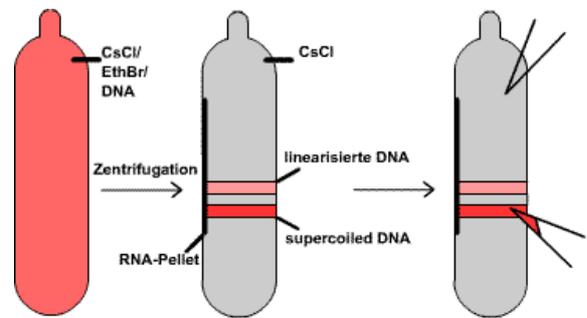
**2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxipräparation)**

Zur Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA wird ein Präparations-Kit mit Nucleobond AX 100-Affinitätssäulen der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Aufreinigung basiert auf einer alkalischen/SDS-Lyse der Bakterienzellen mit anschließender Selektion der Plasmid-DNA über Anionen-Austauscher-Säulen. Dabei können aus 100 ml Bakterienkultur bis zu 200 µg Plasmid-DNA aufgereinigt werden. Die Aufreinigung erfolgt aus einer 100 ml Übernacht-Kultur transformierter Bakterien nach der im Präparations-Kit enthaltenen Anleitung. Alle benötigten Puffer und Materialien sind Bestandteile des Präparations-Kits.

**2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA über Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation**

Bei der Aufreinigung von DNA über Cäsiumchlorid-Gradienten werden Nukleinsäuren anhand ihrer Dichte getrennt. Dieses Verfahren liefert hochreine, kovalent geschlossene Plasmid-DNA mit sehr guten Ausbeuten. In dieser Arbeit wurden Plasmide kodierend für das vollständige HCV-Genom mit dieser Methode gereinigt.

Vorausgehend werden große Mengen Plasmid-DNA aus einer 400 ml Übernacht-Kultur mittels des Maxipräparations-Kits (Machery-Nagel) vorgereinigt. Die Plasmid-DNA wird anschließend mit Hilfe einer Spritze in Quick-Seal-Röhrchen (für Rotor VTi 65.2, Beckman Instruments) überführt, die zuvor mit 4,11 g Cäsiumchlorid (CsCl) gefüllt wurden. Nach dem Einfüllen der DNA wird das Röhrchen zu 2/3 mit 1 x Tris-EDTA (TE; 10 mM Tris (pH 8,0), 0,1 mM EDTA) befüllt. Durch invertieren wird anschließend das CsCl vollständig gelöst. Dann erfolgt die Zugabe von 500 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) und das Auffüllen der Röhrchen mit 1 x TE bis zum Beginn des Gefäßhalses. Die Röhrchen werden mit Hilfe einer Waage auf ca. 0,01 g genau austariert und anschließend zugeschweißt (Abb. 63). Danach erfolgt die Ultrazentrifugation (Optima™LE-80K, Rotor VTi 65.2; Beckman Instruments) bei 60.000 rpm für 4,5 h bei 20 °C. Wichtig ist hierbei, die Temperatur (20 °C) zu beachten, da das CsCl anderenfalls ausfällt und die Zentrifugation stört (führt zu Schäden an Rotor und Zentrifuge!).



**Abbildung 63: Schematische Darstellung zur Lokalisation von Plasmid-DNA vor und nach der Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation in Quick-Seal-Röhrchen.**

Bildquelle: <http://www.chemgapedia.de>

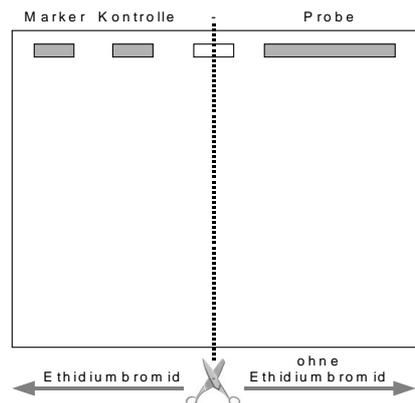
Nach der Zentrifugation können aufgrund des eingelagerten Ethidiumbromids unter einer UV-Lampe zwei DNA-Banden im Gradienten detektiert werden (Abb. 63). Die obere Bande entspricht linearisierter DNA, die aufgrund erhöhter Zugänglichkeit mehr Ethidiumbromid einlagert und langsamer sedimentiert als zirkularisierte Plasmid-DNA (supercoiled DNA), welche daher in der unteren Bande detektiert wird. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wird mit der Kanüle einer Spritze im oberen Teil des Röhrchens ein Lüftungsloch gestochen. Anschließend kann die Phase mit supercoiled DNA durch erneutes Durchstechen der Röhrchen an entsprechender Stelle mit einer Spritze abgesaugt werden (Abb. 63). Die Plasmid-DNA wird in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA-Lösung wird zur Entfernung des Ethidiumbromids 3 – 5 x mit 1 Volumen CsCl-gesättigtem Isopropanol (100 %) extrahiert. Im Anschluss wird die DNA-Lösung in einen Dialyseschlauch überführt und dreimal gegen 1 Liter 1 x TE für 1 h dialysiert. Die im Dialyseschlauch verbleibende Plasmid-DNA wird anschließend in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

#### 2.3.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten über präparative Agarosegele

Diese Technik dient der Isolierung und Aufreinigung von bestimmten DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau oder der Polymerase-Kettenreaktion. Die Elektrophorese erfolgt nach der Methode der analytischen Agarosegel-Elektrophorese (siehe Kapitel V.4.1.1) außer, dass präparative Agarosegele 0,5 – 1 cm dick gegossen werden. Die Proben werden wie in Abbildung 64 aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 150 mA für ca. 1 h, bis der Farbmarker Bromphenolblau auf der Mitte des Gels läuft. Die anschließende Färbung im Ethidiumbromidbad und Bestrahlung mit UV-Licht

können ein störender Faktor bei Folgeversuchen sein und Mutationen in der DNA-Sequenz verursachen. Deshalb wird das Gel nach dem Lauf an der markierten Stelle geteilt und nur Marker- und Kontrollspur im Ethidiumbromidbad für 30 min gefärbt.

Auf dem UV-Tisch wird aus der Kontrollspur die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Der im Ethidiumbromid gefärbte Teil des Gels wird an den ungefärbten Teil mit der Probe angelegt und das gewünschte Fragment auf Höhe der entfernten Kontrollbande „blind“ ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Kontrolle wird das ganze Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend fotografiert.



**Abbildung 64: Darstellung eines präparativen Agarosegels.**

Probe: Restriktions- oder PCR-Ansatz  
Kontrolle: je nach DNA-Gehalt und Größe des Fragments 5 – 10 µl der Probe

Das gewünschte DNA-Fragment wird über das GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE-Healthcare) nach enthaltener Anleitung aus der Agarose extrahiert. Alle benötigten Puffer und Materialien sind Bestandteile des Präparations-Kits. Anschließend wird der Erfolg der Aufreinigung durch analytische Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

### 2.3.5 Aufreinigung von DNA-Matrizen für die *in vitro* Transkription

#### 2.3.5.1 Proteinase K-Verdau

Proteinase K ist eine Serinprotease, die von dem Pilz *Tritirachium album* gebildet wird. Das Enzym spaltet die Proteine endolytisch am Carboxyterminus aliphatischer, aromatischer und hydrophober Aminosäuren und eignet sich deshalb zur Entfernung von DNA-bindenden Proteinen und Enzymen wie RNasen aus einer Nukleinsäure-Lösung. Die Aktivität der Proteinase K wird durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stimuliert. Die PCR-Produkte und Plasmide, die als Matrize für eine *in vitro* Transkription verwendet werden, werden für mindestens 30 min (maximal über Nacht) bei 37 °C mit Proteinase K verdaut.

#### Standard-Reaktionsansatz

Bestandteile	Endkonzentration
DNA-Matrize	variabel
$\text{CaCl}_2$	2 mM
Tris-Cl pH 7,5	50 mM
Proteinase K	0,2 µg/µl

Zur Entfernung der Aminosäuren und des Enzyms werden die PCR-Produkte danach mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-Präzipitation gereinigt.

### 2.3.5.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Bei der Reinigung von Nukleinsäuren mittels organischer Lösungsmittel wie Phenol und Chloroform erfolgt die Trennung der Proteine von der Nukleinsäure durch Phasenbildung der Lösungen. Proteine werden durch das Phenol denaturiert und sammeln sich in der organischen unteren Phase und in der Interphase der Flüssigkeit, während die Nukleinsäure in der wässrigen Phase im oberen Teil des Gefäßes verbleibt. Durch das Chloroform werden zusätzlich Fette aus der wässrigen Phase entfernt und die Phasenauftrennung verbessert. Dazu werden 1 Volumen der Nukleinsäure-Lösung mit 1 Volumen Phenol und 1 Volumen Chloroform sorgfältig gemischt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 4 min bei 13000 rpm (Centrifuge 5417R, Eppendorf) bei dem die Phasenbildung stattfindet. Die obere Phase mit der Nukleinsäure wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um verbleibendes Phenol zu entfernen, wird 1 Volumen Chloroform zugegeben und gut gemischt. Nach 2 min Zentrifugation bei 13000 rpm (Centrifuge 5417R, Eppendorf), wird die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Durch eine anschließende Alkohol-Fällung (siehe Kapitel V.2.3.5.3) wird restliches Phenol aus der Lösung entfernt und die Nukleinsäure bei Bedarf konzentriert.

### 2.3.5.3 Alkoholfällung von Nukleinsäuren (Ethanol-Präzipitation)

Die Alkohol-Fällung dient der Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren. Der Nukleinsäure-Lösung werden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat sowie das dreifache Volumen Ethanol (99 %) zugesetzt. In Anwesenheit von einwertigen Kationen und Alkohol bilden Nukleinsäuren unlösliche Salze, die ausfallen. Die Präzipitation erfolgt je nach Nukleinsäuregehalt der Lösung innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur ( $> 250 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) oder 30 min bis 24 h bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $< 250 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ). Anschließend wird die Nukleinsäure durch Zentrifugation bei 13000 rpm (Centrifuge 5417R, Eppendorf) für 30 min pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit 500  $\mu\text{l}$  Ethanol (80 %) wird der Überstand restlos entfernt. Die Nukleinsäure wird anschließend bei Raumtemperatur und offenem Reaktionsgefäß getrocknet. Dann wird die Nukleinsäure in ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.3.5.4 Aufreinigung von Nukleinsäuren über Sephadex G25-Säulen

Die Aufreinigung von Nukleinsäuren über Sephadex G25-Säulen diente in dieser Arbeit der Trennung von Nukleotiden und kleineren DNA-Stücken von DNA-Matrizen für die Synthese von vollständigen HCV-Genomen. Das Säulenmaterial Sephadex G25-Medium (GE-Healthcare) wird zum Vorquellen über Nacht in Tris-EDTA-Puffer (TE; 10 mM Tris (pH 8,0), 0,1 mM EDTA) inkubiert. Die Säulen werden anschließend in mit etwas Glaswolle gestopften Pasteur-Pipetten gegossen. Die zu reinigende Nukleinsäure wird zur visuellen Kontrolle der Elution mit etwas Proben-Puffer (BX-Puffer; 75 % (v/v) Glycerol, 50 mM EDTA, 2 mg/ml Bromphenolblau, 4 mg/ml Xylencyanolblau FF) gemischt und auf die Säule gegeben. Die Elution erfolgt in 150  $\mu\text{l}$  Fraktionen durch Gabe von TE auf die Säule, bis das hellblaue Xylencyanolblau aus der Säule austritt. 5 – 10  $\mu\text{l}$  jeder Fraktion werden anschließend auf

einem analytischen Agarosegel aufgetrennt. Die Fraktionen, die die gereinigte Nukleinsäure enthalten, werden anschließend vereinigt und bei Bedarf über Ethanol-Präzipitation aufkonzentriert.

### 3 Arbeiten mit RNA

#### 3.1 RNA-Synthese

##### 3.1.1 Herstellung von DNA-Matrizen für die *in vitro* Transkription

Für die Synthese von RNA definierter Länge dienen linearisierte Plasmid-DNA oder PCR-Produkte als Matrize. Die linearisierte Plasmid-DNA und die PCR-Produkte werden vor der Transkription über Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation gereinigt. DNA-Matrizen für die Herstellung vollständiger HCV-Genome werden zusätzlich über G25-Säulen gereinigt.

##### 3.1.2 Standard *in vitro* Transkription

Bei der *in vitro* Transkription erfolgt die Synthese von RNA durch die SP6-, T3- oder T7-RNA-Polymerase. Die RNase-freien Bestandteile der Reaktion werden bei Raumtemperatur pipettiert, da das Spermidin im Transkriptionspuffer bei 0 °C zur Präzipitation der Matrizen-DNA führen würde.

##### Standard-Transkriptionsansatz

Bestandteile	Endkonzentration
Transkriptionspuffer	1 x
DTT	10 mM
rNTPs	500 µM
DNA (Matrize)	20 - 40 ng/µl
RNA-Polymerase	1 U/µl

Der zu verwendende Transkriptionspuffer wird vom Hersteller mit der Polymerase geliefert und enthält üblicherweise in Endkonzentration 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM Spermidin. Die Inkubation der Reaktion erfolgt für eine Stunde bei 37 °C (T3-, T7-Pol.) oder 42 °C (Sp6-Pol.) im Wasserbad. Die Transkriptionsreaktion wird anschließend auf einem Agarosegel überprüft.

##### 3.1.3 *In vitro* Transkription radioaktiv markierter RNA

Für die Detektion von z. B. RNA-Protein-Komplexen nach einer Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation wird die RNA durch Einbau von radioaktiv markierten Nukleotiden während der Transkription markiert. Für die Synthese radioaktiv markierter RNA wurden in dieser Arbeit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-rUTP (800 Ci/mmol, 1 mCi/ml) eingesetzt.

Transkriptionsansatz

Bestandteile	Endkonzentration
Transkriptionspuffer (Bestandteile siehe V.2.2.1.2)	1 x
DTT	10 mM
rNTPs (A, C, G)	500 $\mu$ M
rUTP	10 $\mu$ M
[ $\alpha^{32}$ P]-rUTP	2,5 $\mu$ M
DNA (Matrize)	20 - 40 ng/ $\mu$ l
RNA-Polymerase	1 U/ $\mu$ l

Der Transkriptionsansatz wird je nach Temperaturoptimum im Wasserbad für eine Stunde inkubiert. Anschließend wird die radioaktiv markierte RNA auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie überprüft. Die anschließende Reinigung der RNA zur Entfernung von überschüssigen radioaktiven Nukleotiden erfolgt über das mini Quick Spin Columns Kit (Roche) oder eine Sephadex G25-Säule.

**3.1.4 Synthese von RNA mit 5'-Cap-Nukleotid und 3'-Poly(A)-Schwanz**

Zur Herstellung von eukaryotischer mRNA entsprechenden Reporter-RNAs wird eine „Capping-Transkription“ mit anschließender Polyadenylierung der RNA durchgeführt. Zum Anfügen der 7-methyl-Guanosin-Kappe (Cap-Nukleotid) an das 5'-Ende der RNA wird in einer Standard *in vitro* Transkriptionsreaktion (siehe Kapitel V.3.1.2) die Konzentration des rGTP auf 50  $\mu$ M herabgesetzt und „Capping-Nukleotide“ (m7-GpppG, Promega) mit einer Endkonzentration von 500  $\mu$ M zugefügt. Anschließend wird die RNA über das RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen) gereinigt. Die Polyadenylierung erfolgt durch Inkubation des unten aufgeführten Reaktionsansatzes für 10 min bei 37 °C im Wasserbad und anschließender Inkubation für 2 min auf Eis.

Polyadenylierungsreaktion

Bestandteile	Endkonzentration
Poly(A)-Puffer	1 x
rATP	1 mM
gereinigte RNA	variabel
Poly(A)-Polymerase	6 U/ $\mu$ l

Der verwendete Poly(A)-Puffer wird vom Hersteller der Poly(A)-Polymerase mitgeliefert. Nach der Polyadenylierungs-Reaktion wird die RNA erneut über das RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit aufgereinigt.

**3.1.5 Synthese von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden für Northern Blot**

Die Herstellung und Markierung von RNA-Sonden für Northern Blot durch Einbau von Digoxigenin (DIG)-gekoppelten Nukleotiden während der Transkriptions-Reaktion. Zum Einbau der DIG-gekoppelten Nukleotide wird in einer Standard-Transkriptionsreaktion der rUTP-Gehalt auf eine

Endkonzentration von 75  $\mu\text{M}$  herabgesetzt und DIG-rUTP in einer Endkonzentration von 175  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Nach der Transkriptionsreaktion erfolgt ein DNase-Verdau und die anschließende Reinigung der RNA-Sonden über das RNeasy<sup>®</sup>Mini Kit.

### 3.1.6 Synthese von intern biotinylierter RNA

Die Synthese von intern biotinylierter RNA erfolgt durch Einbau von Biotin-gekoppelten Nukleotiden während der Transkriptionsreaktion. Dazu wird, je nach gewünschtem Biotinylierungsgrad in einer Standard-Transkriptionsreaktion der rCTP-Gehalt herabgesetzt und Bio-14-rCTP in entsprechenden Mengen zugefügt. Die RNA wird anschließend über das RNeasy<sup>®</sup>Mini Kit aufgereinigt, um überschüssige Nukleotide zu entfernen.

### 3.1.7 Synthese von vollständigen HCV-Genomen

Die Synthese von vollständigen HCV-Genomen erfolgt wie eine Standard-Transkriptionsreaktion. Die Endkonzentration der Nukleotide (rNTPs) wird auf 3,75 mM erhöht und zusätzlich  $\text{MgCl}_2$  in einer Endkonzentration von 5 mM zugefügt. Die Inkubation der Transkriptionsreaktion erfolgt hier für 2 h bei 37 °C.

## 3.2 Präparation und Aufreinigung von RNA

### 3.2.1 DNase-Verdau

Der DNase-Verdau einer RNA-Lösung dient der Entfernung von DNA-Matrizen-Resten nach einer *in vitro* Transkriptionsreaktion. Dazu wird der Reaktionsansatz mit DNase I (Endkonzentration 0,1 U/ $\mu\text{l}$ ) versetzt und  $\text{MgCl}_2$  (Endkonzentration 1 mM) zugegeben. Die Inkubation erfolgt für 1 h bei 37 °C im Wasserbad. Um das Enzym und die verdauten DNA-Reste zu entfernen erfolgt anschließend eine Aufreinigung der RNA über das RNeasy<sup>®</sup>Mini Kit (Qiagen).

### 3.2.2 Aufreinigung von RNA über RNeasy<sup>®</sup>Mini-Säulen

Zur Entfernung von Enzymen, Resten von DNA-Matrizen und freien Nukleotiden, die bei Folgereaktionen stören könnten, wird die RNA mittels des RNeasy<sup>®</sup>Mini Kits (Qiagen) aufgereinigt. Des Weiteren wurde das RNeasy<sup>®</sup>Mini Kit in dieser Arbeit für die Aufreinigung radioaktiv markierter HCV-Reporter-RNA aus transfizierten Zellen genutzt, um anschließend deren Integrität nachzuweisen. Die Aufreinigung erfolgt nach der im Kit enthaltenen Anleitung. Alle benötigten Materialien und Lösungen sind Bestandteile des Kits. Die aufgereinigte RNA kann anschließend über Monate bei -20 °C gelagert werden.

### 3.2.3 Aufreinigung von RNA über mini Quick Spin Columns

Zur Entfernung von nicht eingebauten radioaktiv markierten Nukleotiden nach der *in vitro* Transkription, wenn keine Entfernung der DNA-Matrize durch DNase-Verdau notwendig ist, wird die RNA nach der im mini Quick Spin Columns Kit (Roche) enthaltenen Anleitung aufgereinigt. Alle verwendeten Materialien sind im Kit enthalten.

### 3.2.4 Präparation von RNA mittels Trizol-Reagenz

Für Northern Blot-Analysen wird die eingebrachte RNA aus Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (engl. *rabbit reticulocyte lysate*, RRL) oder eukaryotischen Zellen mittels Trizol-Reagenz (Invitrogen) reextrahiert. Die Reextraktion erfolgt nach Angaben des Herstellers. Sollte die RNA anschließend nicht vollständig rein von Proteinen sein, wie oft nach der Inkubation in RRL der Fall, kann eine Reinigung über das RNeasy<sup>®</sup>Mini Kit angeschlossen werden.

## 3.3 Hybridisierung von RNA

### 3.3.1 Herstellung von microRNA-Duplexen

Für die Transfektion in eukaryotische Zellen werden microRNA-Duplexe *in vitro* hergestellt. Dazu werden equimolare Mengen einzelsträngige reife microRNA (miR mat) mit dem einzelsträngigen komplementären Gegenstrang (miR\*) gemischt und in einem Wasserbad mit einer Anfangstemperatur von etwa 80 °C inkubiert, bis das Wasser auf Raumtemperatur abgekühlt ist. Die microRNA-Duplexe können anschließend bei -20 °C gelagert werden.

### 3.3.2 Hybridisierung von RNA mit Biotin-gekoppelten DNA/LNA-Oligonukleotiden

Die Hybridisierung von RNA mit Biotin-gekoppelten DNA/LNA-Oligonukleotiden diente in dieser Arbeit der anschließenden Aufreinigung von HCV-Translationskomplexen aus Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (RRL) über Streptavidin-Beads.

LNAs (engl. *locked nucleic acids*) sind Nukleotide, bei denen die C2- und C4-Atome der Ribose durch eine Sauerstoff-Methylen-Brücke verbunden sind. Die Nukleotide sind dadurch in der C3'-endo-Konformation arretiert und weniger strukturell flexibel und paaren mit RNA oder DNA mit erhöhtem Schmelzpunkt. Durch Verwendung von Oligonukleotiden mit LNAs kann daher die Effizienz und Spezifität in Hybridisierungs-Experimenten stark erhöht werden.

Für die Biotinylierung der HCV-RNA wird gereinigte RNA mit der 3-fachen molaren Menge Biotin-gekoppeltem DNA/LNA-Oligonukleotid (Bio-LNA-anti ORF) gemischt und im Wasserbad mit einer Ausgangstemperatur von etwa 60 °C inkubiert, bis das Wasser auf Raumtemperatur abgekühlt ist. Das RNA-LNA-Hybrid wird anschließend über das RNeasy<sup>®</sup>Mini Kit aufgereinigt, um nicht hybridisierte Oligonukleotide zu entfernen.

## 4 Nachweis von Nukleinsäuren

### 4.1 Elektrophorese

#### 4.1.1 Analytische Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese eignet sich zur Analyse von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten sowie von RNA im Größenbereich von 0,5 - 25 kb. Für die Auftrennung von RNA sollten autoklavierte Agarose und Puffer verwendet werden, um ein möglichst RNase-freies Arbeiten sicher zu stellen. Je nach Größe des zu analysierenden Fragments werden 1 - 2 %-ige Agarosegele 0,5 cm dick in einer Gelapparatur (Mini-Gelsystem, von Keutz) gegossen. Als Laufpuffer wird TAE-Puffer (40 mM Tris-OH (pH 8,0), 40 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA) verwendet, die angelegte Stromstärke beträgt 220 mA für 10 - 20 min. Die Nukleinsäure wird mit einem nativen Probenpuffer (BX-Puffer; 75 % (v/v) Glycerol, 50 mM EDTA, 2 mg/ml Bromphenolblau, 4 mg/ml Xylencyanolblau FF) etwa 1 : 1 gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Dieser Puffer enthält Glycerol, das ein Absinken der Nukleinsäure in die Taschen ermöglicht. Zudem liefern die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanolblau eine visuelle Kontrolle über das Laufverhalten des Gels.

Nach der Auftrennung über das Gel werden die DNA- bzw. RNA-Fragmente nach Färbung des Gels im Ethidiumbromidbad (2 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer) für ca. 20 min unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht und fotografiert.

#### 4.1.2 Denaturierende Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen wurde in dieser Arbeit verwendet, um reextrahierte RNA aus eukaryotischen Zellen oder RRL für die Northern Blot-Analyse aufzutrennen. Alle Arbeiten sollten aufgrund des Formaldehyd-Gehaltes des Puffers unter dem Abzug durchgeführt werden.

##### Standard-Zusammensetzung eines Gels

Bestandteile	Endkonzentration
Agarose	1 %
10 x Formaldehyd-Laufpuffer <sup>-FA</sup> (200 mM MOPS, 50 mM NaAc, 10 mM EDTA, pH 7,0)	1 x
37 % Formaldehyd	0,75 %

Die Proben werden vor dem Auftragen mit einem denaturierenden Probenpuffer (NB-Puffer, 1 Volumen BX-Puffer (75 % (v/v) Glycerol, 50 mM EDTA, 2 mg/ml Bromphenolblau, 4 mg/ml Xylencyanolblau FF) plus 2 Volumen SB-Puffer (4 x Formaldehyd-Laufpuffer<sup>-FA</sup>, 30 % Formamid, 11,25 % Glycerol, 3 % Formaldehyd)) gemischt. Als Laufpuffer wird 1 x Formaldehyd-Laufpuffer<sup>+FA</sup> (1 x Formaldehyd-Laufpuffer<sup>-FA</sup>, 0,74 % Formaldehyd) verwendet, die angelegte Stromstärke beträgt 100 mA für ca. 45 min.

### 4.1.3 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur Auftrennung von RNA

Die denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde in dieser Arbeit zum Nachweis der Integrität der RNA, des erfolgten Einbaus von radioaktiv markierten Nukleotiden nach *in vitro* Synthese und der Bindung von biotinylierter RNA an Streptavidin-Beads verwendet.

#### Standard-Zusammensetzung eines Gels

Bestandteile	Endkonzentration
TBE (autoklaviert)	1 x
Acrylamid	6 %
Harnstoff	7 M
Ammoniumpersulfat (APS)	0,1 % (w/v)
TEMED	0,1 % (v/v)

1 x TBE-Puffer (90 mM Tris-Borat (pH 8,3), 2,5 mM EDTA), Acrylamid, Harnstoff und Ammoniumpersulfat werden gemischt. Die Zugabe von TEMED startet die Polymerisation. Die Polymerisation ist meist nach ca. 20 min abgeschlossen.

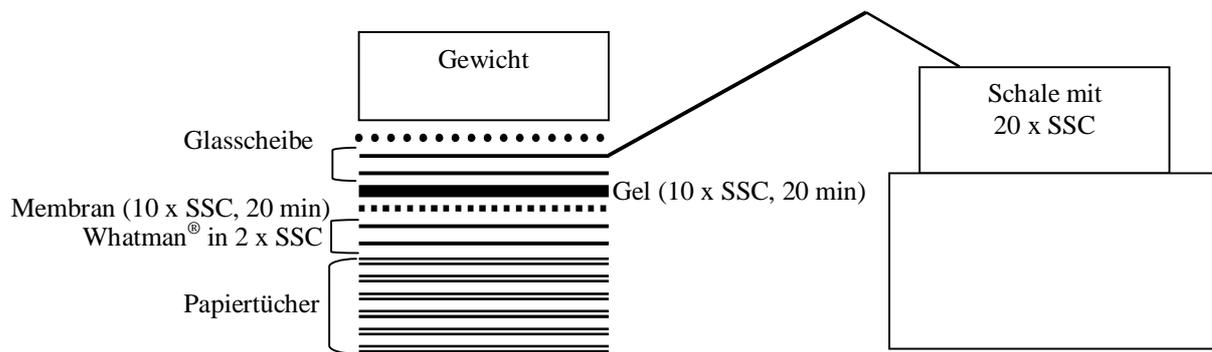
Die Proben werden vor dem Auftragen mit etwa 10 µl denaturierendem Probenpuffer (FA-Puffer; 80 % Formamid, 0,1 mM EDTA, 2 mg/ml Bromphenolblau, 4 mg/ml Xylencyanolblau FF) gemischt und für 3 min bei 80 °C denaturiert. Als Laufpuffer wird 1 x TBE verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei 30 mA für 8 - 10 min, bis der Farbstoff Bromphenolblau die Mitte des Gels erreicht hat. Die radioaktiv markierte RNA wird durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Der Nachweis nicht radioaktiv markierter RNA erfolgt durch Inkubation des Gels im Ethidiumbromidbad (siehe Agarosegel-Elektrophorese) und UV-Bestrahlung.

## 4.2 Northern Blot

Der Northern Blot diente in dieser Arbeit zum Nachweis der Integrität von *in vivo* und *in vitro* translatierter RNA. Die RNA wird nach der Translationsreaktion mittels Trizol-Reagenz oder RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit isoliert und über denaturierende Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgt der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (Roti<sup>®</sup> Nylon Plus, Roth).

Dazu werden ein Stapel Papiertücher, Whatman<sup>®</sup>-Papier (Filterpapier) und die Nylon-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Komponenten werden wie in der Abbildung 65 in SSC-Puffer (20 x SSC (pH 7,0) enthält 3 M NaCl, 0,3M Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) verschiedener Konzentrationen getränkt, geschichtet und fixiert. Der Kapillartransfer erfolgt für mindestens 4 h. Im Anschluss wird die RNA auf der Nylon-Membran durch 5 min Bestrahlung mit UV-Licht fixiert. Der Nachweis einer bestimmten RNA-Spezies erfolgt anschließend durch Hybridisierung mit spezifischen Sonden, die Digoxigenin (DIG)-gekoppelt sind (siehe auch Kapitel V.3.1.5). Dazu wird die Nylon-Membran in einem Hybridisierungsofen bei 68 °C mit Hybridisierungspuffer (2 % (w/v) Block-Reagenz, 0,1 % (v/v) N-Laurolylsarcosin, 0,02 % SDS, 5 x SSC, 50 % Formamid) für mind. 1 h inkubiert, um

unspezifische Bindungen der Sonde zu blocken. Im Anschluss erfolgt die Hybridisierung mit der Sonde in Hybridisierungs-Puffer bei 68 °C im Hybridisierungssofen über Nacht (16 h).



**Abbildung 65: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Kapillar-Transfers für Northern Blot.** Die in Puffer getränkten Bestandteile werden auf einem Stapel geschichtet und mit einem Gewicht beschwert. Das oberste in 20 x SSC getränkte Whatman®-Papier (Filterpapier) wird als langer Streifen zugeschnitten, der mit dem Ende in eine Schale gefüllt mit 20 x SSC getaucht wird. Die Schale steht auf einer Erhöhung, um ein Gefälle in der Laufrichtung des Puffers zu erzeugen.

Danach folgen mehrere Waschschriffe bei 68 °C im Hybridisierungssofen, um überschüssige Sonden zu entfernen (2 x 20min in 2 x SSC + 0,1 % SDS, dann 2 x 20 min in 0,5 x SSC + 0,1 % SDS). Es folgt der Nachweis von Digoxigenin über einen Alkaline-Phosphatase-gekoppelten Antikörper (DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids, Roche). Dazu wird die Membran für mind. 30 min bei Raumtemperatur in DIG-Block-Puffer (1,5 % Blockreagenz, 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5) auf dem Kippschüttler geblockt. Danach erfolgt die Inkubation mit dem anti-DIG-Antikörper (Verdünnung 1 : 10.000) in DIG-Block-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Kippschüttler. Nach 3 x Waschen für 10 min mit DIG-Wasch-Puffer (0,3 % (v/v) Tween®20, 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5) erfolgt die Nachweisreaktion. Die Membran wird dazu für 2 min in DIG-Detektions-Puffer (100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl) equilibriert und anschließend für 5 min unter Lichtabschluss mit 1 ml 1 % CSPD in DIG-Detektions-Puffer bedeckt. Anschließend wird die Membran kurz auf Whatman-Papier getrocknet und in Frischhaltefolie eingeschlagen. Die Detektion erfolgt über Autoradiographie.

## 5 Zellkultur-Methoden

### 5.1 Kultivierung von adhärenenten eukaryotischen Zellen

Zellen der Linie Huh7 und HeLa werden in sterilen Kulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, Sarstedt) in 5 ml auf 37 °C vorgewärmtem DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) angezogen. Dem DMEM werden vor Gebrauch 1 % Antibiotika (100 x Penicillin-Streptomycin-Lösung; 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin) und 10 % fötales Rinderserum (FBS) zugesetzt (DMEM<sup>+/+</sup>). Dieses Medium und die angegebenen Kulturflaschen werden, soweit nicht anders beschrieben, bei allen Zellkulturmethoden verwendet. Die optimalen Wachstumsbedingungen für die Zellen sind bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator gegeben. Die Zellen werden inkubiert, bis sie eine adhärenente Einzelschicht

bilden, die etwa 90 % des Bodens der Kulturflasche bedeckt (90 % Konfluenz). Dann können die Zellen passagiert, für eine Transfektion ausgesät oder eingefroren werden.

## 5.2 Passagieren von adhärennten Zellen

Das Aufteilen der Zellen auf neue Kulturflaschen wird nötig, wenn die Zellen eine Konfluenz von etwa 90 % erreicht haben. Dazu wird das Medium abgesaugt, und die Zellen werden mit 1/2 Volumen PBS (4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) gewaschen, um restliches Medium zu entfernen (alle Volumenangaben beziehen sich auf das Ausgangsvolumen des Mediums). Es folgt die Inkubation mit 1/5 Volumen 1 x Trypsin-EDTA (10 x Trypsin-EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA)) für 5 min bei 37 °C, um die adhärennten Zellen vom Boden des Kulturgefäßes zu lösen. Die gelösten Zellen werden in frischem Medium aufgenommen. Das enthaltene FBS stoppt die Trypsin-Reaktion. Die Zellen werden in neue Kulturflaschen mit vorgelegtem Medium gegeben. Die neu auszusäende Zellmenge hängt von der Teilungsrate der Zellen und dem gewünschten Zeitpunkt der Weiterverarbeitung ab.

## 5.3 Aussäen von adhärennten Zellen

Für Transfektionsversuche mit HCV-Reporter-RNAs werden zu 80 - 90 % konfluente Zellen in Mikrotiterplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät. Das Vorgehen entspricht dem des Passagierens von adhärennten Zellen. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wird 500 µl Zellsuspension gegeben. Die Zellen werden 24 h inkubiert, bevor sie für eine Transfektion eingesetzt werden.

## 5.4 Einfrieren von Zellen

Das Einfrieren von Zellen dient dem Erhalt der Zelllinie und der längerfristigen Lagerung in Flüssigstickstoff. Da sich die Zelleigenschaften bei häufiger Passage verändern, werden nach 1 - 5 Passagen zu 80 % konfluente Zellen gewaschen und trypsinisiert (siehe Kapitel V.5.4). Die Zellsuspension wird in einem sterilen Zentrifugenröhrchen bei 4 °C und 550 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 1/5 Volumen eiskaltem Einfrier-Medium (DMEM<sup>-</sup>, 20 % FBS, 20 % DMSO) resuspendiert. Die Inkubation erfolgt für 10 min auf Eis. Die Zellen werden in vorgekühlte Cryo-Röhrchen (1 ml/Gefäß) aliquotiert und in einem Isopropanol-Tank über Nacht bei -20 °C aufbewahrt. Das Isopropanol gewährleistet die Abkühlung der Zellen um ca. 1 °C/h, sodass ein Teil der Zellen das Einfrieren unbeschadet überlebt. Am nächsten Tag werden die gefrorenen Zellen in einen Flüssigstickstoff-Tank überführt, wo sie über Jahre haltbar sind.

## 5.5 Auftauen von Zellen

Die in Flüssigstickstoff gelagerten Zellen werden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die aufgetauten

Zellen werden direkt in eine Kulturflasche mit vorgewärmtem Medium gegeben. Nach 4 - 5 Stunden im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wird das Medium gewechselt, da das im Einfrier-Medium enthaltene DMSO toxisch wirkt. Die weitere Kultivierung erfolgt wie oben beschrieben.

## 6 Proteinbiochemische Methoden

### 6.1 Expression von Reporter-Proteinen

#### 6.1.1 *In vitro* Translation

Zur Messung der Translationseffizienzen von *in vitro* transkribierten Reporter-RNAs in An- oder Abwesenheit von microRNAs werden Translationsreaktionen in HeLa-Zellextrakt und Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (RRL) durchgeführt.

Das von der Firma Promega gelieferte Kaninchen-Retikulozyten-Lysat hat eine Salzkonzentration von 113 mM; bei HeLa-Zellextrakt geht man aufgrund des Volumenverhältnisses von Zellen zu Puffer bei der Präparation des Extraktes von einer Salzkonzentration von 75 mM aus. Um eine effiziente Translation der RNAs in den Zelllysaten zu erzielen, wird die Salzkonzentration in den Reaktionen mit Kaliumchlorid (KCl) auf den physiologischen Wert von 130 mM angeglichen. Der *in vitro* Translations-Ansatz wird für 60 min bei 30 °C inkubiert.

#### Standard- *in vitro* Translationsansatz

Bestandteile	Endkonzentration/ Menge
KCl	130 mM
Zelllysate	8 µl / 20 µl Reaktionsansatz
Reporter-RNA	200 ng
microRNA	50 ng - 200 ng

Im Anschluss wird der Expressionsgrad der translatierten Reporter-Proteine gemessen, der als direktes Maß für die Translationseffizienzen der RNAs dient. Dies erfolgt entweder durch Messung der Substratumsetzung der Reporter-Proteine im Luminometer (Luziferase-Assay, siehe auch Kapitel V.6.3.1) oder durch radioaktive Markierung während der Translation. Für die radioaktive Markierung *in vitro* translaterter Reporter-Proteine werden der Translationsreaktion L-[<sup>35</sup>S]-Methionin (0,8 µl / 20 µl Reaktionsansatz) zugesetzt. Zum Nachweis erfolgt hier eine SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie.

#### 6.1.2 *In vivo* Translation - Transfektion von RNA in eukaryotische Zellen

##### 6.1.2.1 Transfektion von Reporter-RNAs

Für die Messung von Translationseffizienzen *in vitro* synthetisierter RNA in An- oder Abwesenheit von microRNAs in lebenden Zellen werden *in vitro* synthetisierte Reporter-RNA und microRNA in humane Zelllinien Huh7 und HeLa transfiziert.

Dazu wird Lipofectamine<sup>®</sup>2000 der Firma Invitrogen verwendet. Diese Lösung basiert auf positiv geladenen Lipidmolekülen, die mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des RNA-Rückgrats interagieren und die Aufnahme der RNA in die Zelle vermitteln.

Für die Transfektion werden die am Vortag in Mikrotiterplatten ausgesäten Zellen (siehe Kapitel V.5.3) mit 150 µl 1x PBS (4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) gewaschen und mit 200 µl DMEM ohne FBS und ohne Antibiotika (DMEM<sup>-/-</sup>) versetzt. Das Lipofectamine und die RNA werden in separaten Ansätzen wie folgt mit DMEM<sup>-/-</sup> gemischt.

#### Standard-RNA-Ansatz für eine 24-well-Platte pro Vertiefung

Bestandteile	Menge
DMEM <sup>-/-</sup>	50 µl
Reporter-RNA (mit IRES)	400 ng
microRNA	400ng
Reporter-RNA (mit 5'-Cap, 3'-Poly(A))	50 ng

#### Standard-Lipofectamine-Ansatz für eine 24-well-Platte pro Vertiefung

Bestandteile	Menge
DMEM <sup>-/-</sup>	50 µl
Lipofectamine <sup>®</sup> 2000	2 µl

Der Lipofectamine-Ansatz wird 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit dem RNA-Ansatz gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur wird das Gemisch auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubation für 4 h bei 37 °C im Brutschrank werden die Zellen lysiert.

Die Zellen werden dazu mit 200 µl 1 x PBS/Vertiefung gewaschen und mit Lysepuffer (150 µl/Vertiefung, Promega) auf dem Schüttler bewegt, bis die Zellen sich vom Boden der Mikrotiterplatte ablösen. Der Lysepuffer enthält nichtionische Detergenzien, die die Plasmamembran, jedoch nicht die Kernmembran auflösen. Nach diesem Schritt wird auf Eis gearbeitet. Das Zelllysate wird in Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 5000 rpm in der Kühlzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf) bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird in neue Reaktionsgefäße pipettiert und die Aktivität der exprimierten Reporter-Proteine gemessen.

#### **6.1.2.2 Transfektion von vollständigen HCV-Genomen**

Die Transfektionen von vollständigen HCV-Genomen wird im Labor der Sicherheitsstufe 3 durchgeführt. Der Ablauf entspricht dem der Transfektion von Reporter-RNAs. Die zu transfizierenden Zellen werden einige Tage zuvor in gleichen Mengen in Zellkulturschalen (10 cm x 2 cm) ausgesät. Die Transfektion erfolgt, wenn die Zellen eine Konfluenz von etwa 90 % erreicht haben. Nach Abnahme des Mediums und Waschen der Zellen mit 1 x PBS werden die Zellen mit 2 ml DMEM<sup>-/-</sup> pro Zellkulturschale versetzt. Dann erfolgt die Zugabe des Transfektions-Gemisches.

Standard-RNA-Ansatz für eine Zellkulturschale

Bestandteile	Menge
DMEM <sup>-/-</sup>	500 µl
HCV-RNA	2µg
microRNA	2µg
anti-miR	3µg
Reporter-RNA (mit 5'-Cap, 3'-Poly(A))	400 ng

Standard-Lipofectamine-Ansatz für eine Zellkulturschale

Bestandteile	Menge
DMEM <sup>-/-</sup>	500 µl
Lipofectamine®2000	20 µl

Die Inkubation erfolgt für 6 h bei 37 °C im Brutschrank. Die Zellen werden anschließend mit 1 x PBS gewaschen und mit 1 ml Lysepuffer lysiert. Anschließend erfolgt Messung der Translationseffizienz durch Nachweis des Core-Proteins mittels Chemilumineszenz Mikropartikel Immunoassay (CMIA, Abbott). Die Messung wurde freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Dr. med. Christian G. Schüttler, Institut für Medizinische Virologie in Gießen, durchgeführt.

**6.1.2.3 Kotransfektion eines zweiten Reporters und WST-1-Test**

Um Schwankungen der Zellzahl, Zellviabilität und Transfektionseffizienz zwischen verschiedenen Vertiefungen der 24-Well-Platten bei der Auswertung der Transfektionsergebnisse ausgleichen zu können, wird eine zweite gecappte und polyadenylierte RNA, die für das Reporter-Protein *Renilla*-Luziferase kodiert, kotransfiziert und außerdem der Zell-Viabilitäts-Test WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche) durchgeführt.

Die Kotransfektion erfolgt durch Zugabe der zweiten RNA zum Transfektionsansatz. Das weitere Verfahren erfolgt wie in Kapitel V.6.1.2.1 beschrieben.

Der WST-1 Test misst die metabolische Aktivität der Zellen über die Substratumsetzung mitochondrialer Dehydrogenasen und zeigt daher die Viabilität der Zellen an. Für den Test wird 1/2 h vor Lyse der Zellen das Medium abgenommen und mit 1 x PBS (4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) gewaschen. Nach Zugabe von 200 µl WST-Lösung (WST-1-Reagenz 1 : 50 verdünnt in farblosem DMEM<sup>-/-</sup>) pro Vertiefung erfolgt eine weitere Inkubation für 30 min bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend werden 100 µl des Überstandes in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und die Substratumsetzung, die durch eine gelbe Färbung des Mediums sichtbar wird, im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Zur Messung der Expression der Reporter-Proteine wird mit den verbleibenden Zellen in der 24-Well-Platte wie in Kapitel V.6.1.2.1 beschrieben verfahren.

## 6.2 Fällung von Proteinen mittels Trichloressigsäure (TCA) und Aceton

Die Fällung von Proteinen dient der Aufkonzentrierung und Entfernung von Lösungsbestandteilen wie Sucrose, die in nachfolgenden Reaktionen stören.

Die Probe wird mit 4 Volumen eiskaltem Aceton (100 %) oder einer Endkonzentration von 10 % TCA versetzt und anschließend für mind. 30 min bei -20 °C inkubiert. Danach erfolgt die Zentrifugation bei 4 °C bei 13000 rpm (Centrifuge 5417R, Eppendorf) für 10 min. Das Proteinpellet wird 3 x mit Ethanol (80 %) gewaschen und dann bei geöffnetem Eppendorf-Gefäß getrocknet. Anschließend kann das Pellet in Probenpuffer (Rotiload, Roth) aufgenommen und für die SDS-PAGE verwendet werden.

## 6.3 Nachweis von Proteinen

### 6.3.1 Nachweis der Expression von Reporter-Proteinen (Luziferase-Assay)

Zur Messung der Translationseffizienz enthalten die meisten, in dieser Arbeit verwendeten *in vitro* transkribierten RNAs kodierende Sequenzen für die Reporter-Proteine *Firefly*-Luziferase (Fluc) oder *Renilla*-Luziferase (Rluc).

Die *Firefly*-Luziferase ist ein Enzym des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*, das in Anwesenheit von ATP,  $Mg^{2+}$  und Coenzym A die Oxidation von D-Luciferin katalysiert. Das Enzym *Renilla*-Luziferase stammt aus der Qualle *Renilla reniformis* und katalysiert die Oxidation von Coelenterazin.

Durch die Umsetzung der Substrate werden Photonen freigesetzt, die bei einer Wellenlänge von 560 nm im Luminometer gemessen werden können (de Wet et al., 1987). Das emittierte Licht dieser Reaktion ist direkt proportional zur Anzahl der gebildeten Luziferase-Moleküle und damit ein Maß für die Translationseffizienz der RNAs.

Für die Messung der Luziferase-Aktivität werden 20 µl des Zelllysates in ein Luminometer-Röhrchen pipettiert und je nach Luziferase-Art 100 µl *Firefly*-Luziferase-Reagens (*Firefly*-Luziferase-Substrat 1 : 5 in *Firefly*-Luziferase-Puffer) oder 20 µl *Renilla*-Luziferase-Reagens (*Renilla*-Luziferase-Substrat 1 : 100 in *Renilla*-Luziferase-Puffer) zugegeben. Direkt nach dem Mischen wird die Lichtintensität für 20 Sekunden in einem Luminometer (Berthold Lumat 9507 oder 9501) gemessen.

#### Bestandteile der Luziferase-Reagenzien

Reagenz	Bestandteil	Endkonzentration
<i>Firefly</i> -Luziferase-Puffer (pH 7,8)	Glycylglycin	25 mM
	MgSO <sub>4</sub>	15 mM
	DTT	33,3 mM
	EDTA	0,1 mM
	rATP	1 mM

Reagenz	Bestandteil	Endkonzentration
<i>Firefly</i> -Luziferase-Substat	Tricine	20 mM
	(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> x 5H <sub>2</sub> O	1,07 mM
	MgSO <sub>4</sub>	2,67 mM
	EDTA	0,1 mM
	DTT	33,3 mM
	Coenzym A	0,27 mM
	D-Luziferin	0,47 mM
	rATP	0,53 mM
<i>Renilla</i> -Luziferase-Puffer (pH 7,4)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 M
	NaCl	0,5 M
	EDTA	1 mM
<i>Renilla</i> -Luziferase-Substrat	Coelenterazin in Methanol	0,5 mg/ml

### 6.3.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen, die anschließend durch Coomassie-Färbung des Gels, durch Autoradiographie oder Western Blot nachgewiesen werden können.

#### Standard-Zusammensetzung von 10 %igen SDS-Gelen

Sammelgel	Endkonzentration	Trenngel	Endkonzentration
4 x SG-Puffer (125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % (w/v) SDS)	1 x	4 x TG-Puffer (375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % (w/v) SDS)	1 x
Acrylamid (40 %)	5 %	Acrylamid (40 %)	10 %
APS	0,1 % (w/v)	APS (10 %)	0,1 % (w/v)
TEMED	0,1 % (w/v)	TEMED	0,1 % (w/v)

Zum Giessen des Trenngels werden ddH<sub>2</sub>O, Trenngel-Puffer, Acrylamid und APS gemischt. Die Zugabe von TEMED startet die Polymerisation (Dauer ca. 20 min). Wenn das Trenngel vollständig auspolymerisiert ist, wird das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm für die Geltaschen gesteckt.

Die Proben werden mit Probenpuffer (Rotiload, Roth) gemischt und 5 min bei 80 - 90 °C gekocht. SDS-Polyacrylamidgele laufen zuerst bei 80 V, bis der Farbmärker eine gleichmäßige horizontale Linie bildet. Anschließend wird die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese dauert ca. 1 h, bis der blaue Farbstoff des Probenpuffers ausläuft. Das Gel wird anschließend je nach Verwendungsart weiter behandelt. Für die Detektion aller Proteine wird das Gel mit Coomassie-Lösung gefärbt (siehe Kapitel V.6.3.3). Für die Detektion von radioaktiv markierten Proteinen wird das Gel 2 x für 15 min in Entfärber (5 % Ethanol, 7,5 % Essigsäure) auf dem Schüttler fixiert und vor der Autoradiographie

getrocknet. Zum Nachweis von spezifischen Proteinen über Western Blot wird das Gel für den Transfer der Proteine auf eine Membran verwendet.

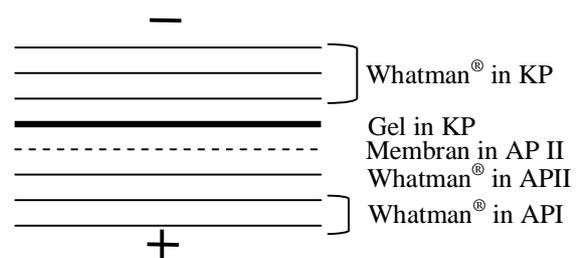
### 6.3.3 Coomassie-Färbung

Zum Nachweis von Proteinen nach einer SDS-PAGE wird das Gel anschließend für etwa 1 h in Coomassie-Lösung (50 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau) auf dem Schüttler inkubiert. Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau bindet dabei unspezifisch an alle Proteine. Anschließend erfolgt eine Fixierung der Färbung der Proteinbanden und Entfärbung des restlichen Gels durch Inkubation in Entfärber (5 % Ethanol, 7,5 % Essigsäure) auf dem Schüttler.

### 6.3.4 Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis spezifischer Proteine über Antikörper-Bindung. Dazu werden die Proteine zunächst über SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluss erfolgt ein Elektro-Transfer der Proteine in einer Blotapparatur (Biometra) auf eine PVDF-Membran. Zur Vorbereitung werden Whatman<sup>®</sup>-Papiere (Filterpapiere) und eine PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Das Gel wird für 10 min in Kathodenpuffer (KP; 25 mM Tris-HCl (pH 9,4), 40 mM Glycin, 10 % Methanol) bei Raumtemperatur auf dem Kippschüttler inkubiert. Die Membran wird für 15 s in Methanol (100 %) getaucht und anschließend für 2 min in ddH<sub>2</sub>O und 5 min in Anoden-Puffer II (AP II; 25 mM Tris-HCl (pH 10,4), 10 % Methanol) auf dem Kippschüttler inkubiert. Die Whatman<sup>®</sup>-Papiere werden nach Abbildung 66 in KP, AP I (300 mM Tris-HCl (pH 10,4), 10 % Methanol) oder AP II getränkt und mit dem Gel und der Membran in der Transfer-Kammer geschichtet.

Der Transfer erfolgt für 75 min bei je nach Größe des Gels entsprechender Stromstärke, die wie folgt berechnet wird: Gelbreite (cm) x Gellänge (cm) x 2,5 = anzulegende mA. Nach dem Transfer erfolgt das Blocken der Membran in 5 % SkimMilk in 1 x TBST (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,1 % Tween<sup>®</sup>20) über Nacht bei 4 °C, anschließend für 20 min bei Raumtemperatur auf dem Kippschüttler. Nach 2 x Waschen der Membran für 2 min in 1 x TBST



**Abbildung 66: Schematische Darstellung der Schichtung der Komponenten für den Elektro-Transfer beim Westernblot.** Die in Puffer getränkten Bestandteile werden wie angezeigt in der Blotapparatur geschichtet.

folgt die Inkubation des Erst-Antikörpers 1: 1000 verdünnt in 1 % SkimMilk in 1 x TBST für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Kippschüttler. Danach wird die Membran für mind. 1 h in 1 x TBST gewaschen, wobei alle 15 min der Puffer gewechselt wird. Die Zweit-Antikörper-Inkubation erfolgt wie die des ersten, außer, dass dieser 1 : 10.000 verdünnt wird. Im Anschluss wird das Waschen wie nach Erst-Antikörper-Inkubation wiederholt.

Die Detektion der Antikörper-Bindung erfolgt über den Nachweis der Substratumsetzung des an den Zweit-Antikörper gekoppelten Enzyms HRP (engl. *horse radish peroxidase*) mittels des Lumi-Light Westernblotting Kit (Roche). Die Lösungen werden nach der im Kit enthaltenen Anleitung gemischt und auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubation von 5 min unter Lichtausschluss wird die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen. Es folgt die Autoradiographie.

## **7 RNA-Protein-Wechselwirkungen**

### **7.1 Sucrose- Dichtegradienten- Zentrifugation**

Die Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation beruht auf dem Prinzip der Trennung von Molekülen durch unterschiedliche Sedimentationseigenschaften abhängig von Größe und Dichte der Moleküle. So können unter anderem RNA-Proteinkomplexe wie Translationskomplexe aufgetrennt werden (Anthony & Merrick, 1992). In dieser Arbeit wurde die Methode genutzt, um die Bildung von Translations-Initiationskomplexen an der HCV-RNA in An- oder Abwesenheit von microRNAs zu untersuchen.

#### **7.1.1 Herstellung von Sucrose-Dichtegradienten**

Zur Herstellung von Sucrose-Dichtegradienten werden verschieden prozentige Sucrose-Lösungen (10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % und 35 % (w/v) Sucrose in 1 x Sucrose-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 8,4), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 mM NaCl, 10 mM DTT)) angesetzt, die anschließend, um RNase-freies Arbeiten zu gewährleisten, autoklaviert werden.

Zur Herstellung der Sucrose-Dichtegradienten werden die verschieden prozentigen Sucrose-Lösungen in Gradienten-Röhrchen (SW40, Beckmann) geschichtet. Angefangen mit der 35 %-Lösung werden je 2 ml der Sucrose-Lösungen (35 % - 10 %) in die Gradientenröhrchen pipettiert, wobei die Lösungen nicht durchmischt werden dürfen. Zum Schluss werden die Gradienten-Röhrchen bis 3 - 4 mm unter den Rand mit 10 %-Sucrose-Lösung aufgefüllt und auf einer Waage genau austariert. Durch anschließendes Einfrieren der Gradienten über Nacht bei -20 °C und das Auftauen direkt vor der Verwendung bildet sich im Gradienten-Röhrchen ein gleichmäßiger Sucrose-Gradient.

#### **7.1.2 Auftrennung von Translationskomplexen**

Der erste Schritt zum Nachweis der Bildung von Translationskomplexen an einer RNA ist die Komplexbildungs-Reaktion in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (RRL) ähnlich einer *in vitro* Translation. Die eingesetzte RNA ist radioaktiv markiert, was anschließend der Lokalisation der RNA-Protein-Komplexe im Sucrose-Dichtegradienten dient.

Standard-Komplexbildungs-Reaktion (Endvolumen 150 µl)

Bestandteile	Endkonzentration/ Menge
5 x Gradientenpuffer (autoklaviert)	1 x
DTT	1 mM
RRL	50 µl
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]- Reporter-RNA	1 pmol
microRNA	27,5 pmol
ddH <sub>2</sub> O	variabel

Der zu verwendende Gradientenpuffer enthält als Endkonzentration 15 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 80 mM KCl. Die Komplexbildungs-Reaktion wird auf Eis pipettiert und anschließend bei 30 °C für 10 min (Nachweis der Bildung von Initiationskomplexen) oder 5min (Nachweis der Bildung von Polysomen) inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion auf Eis oder durch Zugabe von MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 30 mM) wird diese auf die im Eisbad aufgetauten Sucrose-Gradienten pipettiert. Es folgt die Zentrifugation bei 40000 rpm bei 4 °C für 5,5 h (Nachweis der Bildung von Initiationskomplexen) oder 2,5 h (Nachweis der Bildung von Polysomen) in einer Ultrazentrifuge (Optima™LE-80K, Beckman Instruments, SW40 Rotor). Nach der Zentrifugation werden die Gradienten vom Boden des Gradienten-Röhrchens beginnend in 500 µl Fraktionen in Szintillations-Röhrchen (MAGV) ausgetropft. Nach Zugabe von 2,5 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus) pro Röhrchen wird die Menge der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen im Szintillations-Zähler gemessen. Die Menge der gemessenen Radioaktivität in den entsprechenden Fraktionen ist ein Maß für die Menge an gebildeten Translationskomplexen. Die Position der Fraktionen im Gradienten, in denen die Radioaktivität detektiert wird, gibt Aufschluss über die Größe der RNA-Proteinkomplexe. So findet man größere ribosomale 80S-Komplexe in den Fraktionen mit höherer Sucrose-Konzentration (Fraktionen 4 - 8) als kleinere ribosomale 48S-Komplexe (Fraktionen 10 - 14).

### **7.1.3 Einsatz von Translationsinhibitoren zur Anreicherung und Identifizierung von Translations-Initiationskomplexen**

Eine Identifizierung der aufgetrennten Translationskomplexe erfolgt durch Zugabe von spezifischen Translationsinhibitoren zur Komplexbildungs-Reaktion. Zur Identifizierung der 48S-Komplexe wird GMP-PNP, ein nicht-hydrolysierbares GTP-Analog, in einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. GMP-PNP verhindert die Dissoziation der eIFs von den 48S-Präinitiationskomplexen und damit die Anlagerung der ribosomalen 60S-Untereinheit und reichert demnach die 48S-ribosomalen Komplexe an. Die Identifizierung der ribosomalen 80S-Komplexe erfolgt über Anreicherung durch Elongationsinhibitoren wie Anisomycin oder Cycloheximid. Diese Inhibitoren werden auch bei Analyse der Bildung von Initiationskomplexen verwendet. Um die Wirkung dieser Inhibitoren zu gewährleisten, werden diese vor Zugabe der RNA zur Komplexbildungs-Reaktion zugegeben (Anisomycin 0,17 mM Endkonzentration, Cycloheximid 2 mM Endkonzentration) und für 5 min bei

30 °C vorinkubiert. Nach anschließender Zugabe der RNA wird eigentliche Komplexbildungs-Reaktion wie in Kapitel V.7.1.2 beschrieben durchgeführt.

#### 7.1.4 Nachweis der Kosedimentation bestimmter Proteine mit Translationskomplexen

Für einen Nachweis der Kosedimentation bestimmter Proteine mit Translationskomplexen im Sucrose-Dichtegradienten wird ein vierfacher Ansatz einer Komplexbildungs-Reaktion über Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation getrennt. Um eine Degradation der Proteine durch Kosedimentation von Proteasen und Proteasomen während der Ultrazentrifugation zu vermeiden, werden den Sucrose-Lösungen die Proteasom-Inhibitoren Lactacystin (Endkonzentration 10 µM) und Hemin (Endkonzentration 25 µM) und ein kommerzieller Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche; Endkonzentration 1 x) zugesetzt. Hemin (Endkonzentration 25 µM) und Lactacystin (Endkonzentration 10 µM) werden zusätzlich zu den Komplexbildungs-Reaktionen zugegeben. Die Zugabe zum Reaktionsansatz erfolgt nach der Inkubation, um eine Störung der Bildung der Translationskomplexe zu vermeiden. Nach der Ultrazentrifugation und Fraktionierung werden für die Lokalisierung der Translationskomplexe 100 µl jeder Fraktion im Szintillations-Zähler gemessen, aus den übrigen 400 µl die Proteine mittels TCA oder Aceton gefällt (siehe Kapitel V.6.2). Anschließend erfolgt der Nachweis bestimmter Proteine über SDS-PAGE und Western Blot.

#### 7.2 Isolierung von HCV-Translationskomplexen aus Kaninchen-Retikulozyten-Lysat mittels Streptavidin-Beads

Die Isolierung („Fischen“) von HCV-Translationskomplexen aus Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (RRL) mittels Streptavidinbeads sollte in dieser Arbeit zur Identifizierung von Proteinen dienen, die möglicherweise eine Funktion bei dem stimulatorischen Effekt der microRNA-122 auf die HCV-Translation haben.

In Vorbereitung für die Isolierung von Translationskomplexen aus RRL wird wie in Kapitel V.3.3.2 beschrieben, HCV-Reporter-RNA mit Biotin-gekoppelten DNA/LNA-Oligonukleotiden hybridisiert. Durch Kopplung der DNA/LNA-Oligonukleotide mit Biotin kann die HCV-RNA anschließend über Streptavidinbeads aufgereinigt werden. Die verwendeten Streptavidin-Beads (BioMag<sup>®</sup>Nuclease-Free Streptavidin Beads, Qiagen) sind magnetisch und können mit Hilfe des MagnaRack (Invitrogen) ohne Zentrifugation pelletiert werden.

Für die Bindung von biotinylierter HCV-RNA an Streptavidin-Beads werden pro Reaktionsansatz 20 µg magnetische Beads mit je 20 µl Bindepuffer<sup>+tRNA/+BSA</sup> (20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 130 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µg/µl tRNA, 1 µg/µl BSA) gewaschen und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur in 20 µl Bindepuffer<sup>+tRNA/+BSA</sup> geblockt. Die Beads werden erneut pelletiert und in je 20 µl Bindepuffer<sup>-tRNA/-BSA</sup> (20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 130 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) aufgenommen. Für die Bindungsreaktion werden pro Ansatz 2 pmol biotinylierte HCV-RNA zu den Beads gegeben

und anschließend die Salzkonzentration in der Reaktion durch Zugabe von KCl etwa auf den physiologischen Wert von 130 mM angeglichen. Die Inkubation erfolgt für 15 min bei Raumtemperatur. Währenddessen werden die sich am Boden absetzenden Beads durch gelegentliches Schütteln des Reaktionsgefäßes wieder in Lösung gebracht. Im Anschluss werden die Beads pelletiert und 2 x mit je 50 µl Bindepuffer<sup>-tRNA/-BSA</sup> gewaschen. Das Pellet des letzten Waschschrilles kann für die Analyse der Bindung biotinylierter HCV-RNA an Streptavidin-Beads über Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Kapitel V.4.1.3) oder für die folgende Komplexbildungs-Reaktion zur Aufreinigung von HCV-Translationskomplexen aus RRL verwendet.

#### Standard-Komplexbildungs-Reaktion

Bestandteile	Endkonzentration/ Menge
HCV-RNA gekoppelt an Beads	Pellet
RRL	16 µl / 40 µl Reaktionsansatz
Cycloheximid	2 mM
KCl	130 mM
microRNA	60 pmol

Um die Translations-Initiationskomplexe anzureichern, erfolgt die Reaktion in Anwesenheit des Elongationsinhibitors Cycloheximid. Um dessen Wirkung zu gewährleisten, wird dieser vor Zugabe der RNA zur Komplexbildungs-Reaktion zugegeben und für 5 min bei 30 °C vorinkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe der RNA und Inkubation für 10 min bei 30 °C. Dann werden die Beads pelletiert und 3 x mit 20 µl Bindepuffer<sup>-tRNA/-BSA</sup> gewaschen. Danach wird das Pellet in 10 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, mit 5 µl Protein-Probenpuffer (Rotiload, Roth) gemischt und für 10 min bei 80 °C inkubiert. Dabei dissoziiert die Biotin-Streptavidin-Bindung und die Proteine werden denaturiert. Im Anschluss erfolgt der Nachweis bestimmter Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot. Als Negativ-Kontrolle erfolgt die parallele Durchführung des Versuches mit nicht biotinylierter HCV-RNA sowie nicht hybridisierten DNA/LNA-Oligonukleotiden, die von der Hybridisierungsreaktion an wie die Biotin-gekoppelte HCV-RNA behandelt werden.

## **8 Autoradiographie**

Die Autoradiographie wird genutzt, um radioaktive Markierungen oder Substratumsetzungen nach enzymatischen Nachweisreaktionen sichtbar zu machen. Dazu werden die Gele auf einem Kodak-Röntgenfilm bei Raumtemperatur exponiert. Die Expositionsdauer ist abhängig von Art und Strahlungsstärke der nachzuweisenden Substanz. Anschließend werden die Filme 3 min in Entwickler (Du Pont) getaucht, mit Wasser gespült und für 15 - 30 min in Fixier-Lösung (Du Pont) fixiert.

## VI LITERATURVERZEICHNIS

- Agnello V**, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX (1999) Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12766-12771
- Ali N, Siddiqui A** (1995) Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J Virol* 69(10): 6367-6375
- Ali N, Siddiqui A** (1997) The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6): 2249-2254
- Ali S**, Pellerin C, Lamarre D, Kukolj G (2004) Hepatitis C virus subgenomic replicons in the human embryonic kidney 293 cell line. *J Virol* 78(1): 491-501
- Alter MJ** (2007) Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 13(17): 2436-2441
- Ambros V** (2001) microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 107(7): 823-826
- Andre P**, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, Pol S, Brechot C, Paranhos-Baccala G, Lotteau V (2002) Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 76(14): 6919-6928
- Anthony DD, Merrick WC** (1992) Analysis of 40 S and 80 S complexes with mRNA as measured by sucrose density gradients and primer extension inhibition. *J Biol Chem* 267(3): 1554-1562
- Arava Y**, Boas FE, Brown PO, Herschlag D (2005) Dissecting eukaryotic translation and its control by ribosome density mapping. *Nucleic Acids Res* 33(8): 2421-2432
- Bachler M**, Schroeder R, von Ahsen U (1999) StreptoTag: a novel method for the isolation of RNA-binding proteins. *RNA* 5(11): 1509-1516
- Balvay L**, Soto Rifo R, Ricci EP, Decimo D, Ohlmann T (2009) Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta* 1789(9-10): 542-557
- Bartel DP** (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2): 281-297
- Bartenschlager R**, Frese M, Pietschmann T (2004) Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63: 71-180
- Barth H**, Schnober EK, Zhang F, Linhardt RJ, Depla E, Boson B, Cosset FL, Patel AH, Blum HE, Baumert TF (2006) Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J Virol* 80(21): 10579-10590
- Belsham GJ** (2009) Divergent picornavirus IRES elements. *Virus Res* 139(2): 183-192
- Benne R**, Brown-Luedi ML, Hershey JW (1979) Protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes: purification, characterization, and radiochemical labeling. *Methods Enzymol* 60: 15-35
- Bergamini G**, Preiss T, Hentze MW (2000) Picornavirus IRESes and the poly(A) tail jointly promote cap-independent translation in a mammalian cell-free system. *RNA* 6(12): 1781-1790
- Biberman Y, Meyuhas O** (1999) TOP mRNAs are translationally inhibited by a titratable repressor in both wheat germ extract and reticulocyte lysate. *FEBS Lett* 456(3): 357-360
- Blanchard E**, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouille Y (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80(14): 6964-6972

- Blight KJ, Rice CM** (1997) Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 71(10): 7345-7352
- Boehringer D, Thermann R, Ostareck-Lederer A, Lewis JD, Stark H** (2005) Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES. *Structure* 13(11): 1695-1706
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D** (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10(2): 185-191
- Borman AM, Michel YM, Kean KM** (2000) Biochemical characterisation of cap-poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: the eIF4G-PABP interaction increases the functional affinity of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. *Nucleic Acids Res* 28(21): 4068-4075
- Bradrick SS, Walters RW, Gromeier M** (2006) The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase. *Nucleic Acids Res* 34(4): 1293-1303
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM** (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3(3): e85
- Brown EA, Zhang H, Ping LH, Lemon SM** (1992) Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res* 20(19): 5041-5045
- Bung C, Bochkaeva Z, Terenin I, Zinovkin R, Shatsky IN, Niepmann M** (2010) Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation. *FEBS Lett* 584(4): 837-842
- Burlone ME, Budkowska A** (2009) Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* 90(Pt 5): 1055-1070
- Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, Taylor JM** (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
- Chang J, Guo JT, Jiang D, Guo H, Taylor JM, Block TM** (2008) Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *J Virol* 82(16): 8215-8223
- Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G** (2007) Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* 81(24): 13783-13793
- Chekulaeva M, Filipowicz W** (2009) Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol* 21(3): 452-460
- Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R** (2007) MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447(7146): 823-828
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M** (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244(4902): 359-362
- Date T, Kato T, Miyamoto M, Zhao Z, Yasui K, Mizokami M, Wakita T** (2004) Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *J Biol Chem* 279(21): 22371-22376
- Decroly E, Imbert I, Coutard B, Bouvet M, Selisko B, Alvarez K, Gorbalenya AE, Snijder EJ, Canard B** (2008) Coronavirus nonstructural protein 16 is a cap-0 binding enzyme possessing (nucleoside-2'O)-methyltransferase activity. *J Virol* 82(16): 8071-8084
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ** (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432(7014): 231-235

- De Wet JR**, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S (1987) Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7:725-737
- Diamandis EP**, Christopoulos TK (1991) The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* 37(5): 625-636
- Diaz-Toledano R**, Ariza-Mateos A, Birk A, Martinez-Garcia B, Gomez J (2009) In vitro characterization of a miR-122-sensitive double-helical switch element in the 5' region of hepatitis C virus RNA. *Nucleic Acids Res* 37(16): 5498-5510
- Diviney S**, Tuplin A, Struthers M, Armstrong V, Elliott RM, Simmonds P, Evans DJ (2008) A hepatitis C virus cis-acting replication element forms a long-range RNA-RNA interaction with upstream RNA sequences in NS5B. *J Virol* 82(18): 9008-9022
- Doench JG, Sharp PA** (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18(5): 504-511
- Doudna JA, Sarnow P** (2007) Translation initiation by viral internal ribosome entry sites; In: Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N, (eds.) Translational control of gene expression. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY* pp 129-154
- Duursma AM**, Kedde M, Schrier M, le Sage C, Agami R (2008) miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA* 14(5): 872-877
- Egger D**, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76(12): 5974-5984
- El-Serag HB** (2002) Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology* 36(5 Suppl 1): S74-83
- Elmen J**, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, Wahren B, Liang Z, Orum H, Koch T, Wahlestedt C (2005) Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res* 33(1): 439-447
- Esau C**, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP (2006) miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 3(2): 87-98
- Eulalio A**, Huntzinger E, Izaurralde E (2008) Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132(1): 9-14
- Eulalio A**, Huntzinger E, Nishihara T, Rehwinkel J, Fauser M, Izaurralde E (2009) Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 15(1): 21-32
- Evans MJ**, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446(7137): 801-805
- Feinstone SM**, Mihalik KB, Kamimura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH (1983) Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun* 41(2): 816-821
- Filipowicz W**, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 15(3): 331-341
- Filipowicz W**, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9(2): 102-114
- Forman JJ**, Legesse-Miller A, Collier HA (2008) A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39): 14879-14884

- Forstemann K**, Horwich MD, Wee L, Tomari Y, Zamore PD (2007) Drosophila microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. *Cell* 130(2): 287-297
- 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
- Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R** (2001) Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75(24): 12047-12057
- Friebe P, Boudet J, Simorre JP, 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
- Fukushi S, Katayama K, Kurihara C, Ishiyama N, Hoshino FB, Ando T, Oya A** (1994) Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 199(2): 425-432
- Gadgil H, Oak SA, Jarrett HW** (2001) Affinity purification of DNA-binding proteins. *J Biochem Biophys Methods* 49(1-3): 607-624
- Gallie DR** (1991) The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev* 5(11): 2108-2116
- Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC** (2003) L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8): 4498-4503
- Garrey JL, Lee YY, Au HH, Bushell M, Jan E** (2010) Host and viral translational mechanisms during cricket paralysis virus infection. *J Virol* 84(2): 1124-1138
- Garry RF, Dash S** (2003) Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virology* 307(2): 255-265
- Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV** (2008) Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* 82(5): 2120-2129
- George AD, Tenenbaum SA** (2006) MicroRNA modulation of RNA-binding protein regulatory elements. *RNA Biol* 3(2): 57-59
- Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW, Zarski JP, Drouet E** (2002) Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J Med Virol* 68(2): 206-215
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N** (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68: 913-963
- Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A** (2008) miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol* 48(4): 648-656
- Goergen D** (2006) Untersuchung der Rolle der variablen Region des Hepatitis C Virus bei der Translation des Virusgenoms. *Diplomarbeit, Gießen*
- Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D** (2003) Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77(9): 5487-5492
- Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM** (1993) A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(22): 10583-10587
- Grassmann CW, Yu H, Isken O, Behrens SE** (2005) Hepatitis C virus and the related bovine viral diarrhea virus considerably differ in the functional organization of the 5' non-translated region: implications for the viral life cycle. *Virology* 333(2): 349-366

- Griffiths-Jones S**, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36(Database issue): D154-158
- Grünweller A, Hartmann RK** (2007) Locked nucleic acid oligonucleotides: the next generation of antisense agents? *BioDrugs* 21(4): 235-243
- Gu S**, Jin L, Zhang F, Sarnow P, Kay MA (2009) Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 16(2): 144-150
- Hamilton TL**, Stoneley M, Spriggs KA, Bushell M (2006) TOPs and their regulation. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 1): 12-16
- Han J**, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125(5): 887-901
- Harris D**, Zhang Z, Chaubey B, Pandey VN (2006) Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. *Mol Cell Proteomics* 5(6): 1006-1018
- Hegarar N**, Francois JC, Praseuth D (2008) Modern tools for identification of nucleic acid-binding proteins. *Biochimie* 90(9): 1265-1272
- Henke JI, Goergen D**, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 27(24): 3300-3310
- Henke JI** (2010) Einfluss der leberspezifischen microRNA-122 auf die Regulation der Translation der Hepatitis C Virus-RNA. *Dissertation, Gießen*
- Hershey JWB, Merrick WC** (2000) Pathway and mechanisms of initiation of protein synthesis; In: Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N, (eds.) Translational control of gene expression. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY* pp 33-88
- Hijikata M**, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K (1993a) Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 67(8): 4665-4675
- Hijikata M**, Mizushima H, Tanji Y, Komoda Y, Hirowatari Y, Akagi T, Kato N, Kimura K, Shimotohno K (1993b) Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(22): 10773-10777
- Hinguchi R**, Kummel B, Saiki KR (1988) A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein an DNA interaction. *Nucl Acid Res* 16:7357-7367
- Höck J**, Weinmann L, Ender C, Rudel S, Kremmer E, Raabe M, Urlaub H, Meister G (2007) Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep* 8(11): 1052-1060
- Holmberg A**, Blomstergren A, Nord O, Lukacs M, Lundeberg J, Uhlen M (2005) The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* 26(3): 501-510
- Honda M**, Brown EA, Lemon SM (1996) Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* 2(10): 955-968
- Honda M**, Beard MR, Ping LH, Lemon SM (1999a) A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* 73(2): 1165-1174

- Honda M**, Rijnbrand R, Abell G, Kim D, Lemon SM (1999b) Natural variation in translational activities of the 5' nontranslated RNAs of hepatitis C virus genotypes 1a and 1b: evidence for a long-range RNA-RNA interaction outside of the internal ribosomal entry site. *J Virol* 73(6): 4941-4951
- Houghton M** (2009) Discovery of the hepatitis C virus. *Liver Int* 29(Suppl 1): 82-88
- Humphreys DT**, Westman BJ, Martin DI, Preiss T (2005) MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(47): 16961-16966
- Hutvagner G, Zamore PD** (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297(5589): 2056-2060
- Hutvagner G, Simard MJ** (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(1): 22-32
- Hwang B**, Lim JH, Hahm B, Jang SK, Lee SW (2009) hnRNP L is required for the translation mediated by HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun* 378(3): 584-588
- Ina Y**, Mizokami M, Ohba K, Gojobori T (1994) Reduction of synonymous substitutions in the core protein gene of hepatitis C virus. *J Mol Evol* 38(1): 50-56
- 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
- Iwasaki S, Tomari Y** (2009) Argonaute-mediated translational repression (and activation). *Fly (Austin)* 3(3): 204-206
- Jackson RJ, Hunt T** (1983) Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA. *Methods Enzymol* 96: 50-74
- Jackson RJ**, Hellen CU, Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(2): 113-127
- Jacobson A** (1996) Poly(A) metabolism and translation: the closed loop model; In: Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N, (ed.) Translational control. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY* pp 451-480
- Jang SK**, Kräusslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62(8): 2636-2643
- 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
- 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
- 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
- Kahvejian A**, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N (2005) Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* 19(1): 104-113
- Kaito M**, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M (1994) Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 75 ( Pt 7): 1755-1760

- Kato T**, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Mizokami M, Wakita T (2005) Nonhepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon. *J Virol* 79(1): 592-596
- Kieft JS**, Grech A, Adams P, Doudna JA (2001a) Mechanisms of internal ribosome entry in translation initiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66: 277-283
- Kieft JS**, Zhou K, Jubin R, Doudna JA (2001b) Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA* 7(2): 194-206
- Kieft JS** (2008) Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends Biochem Sci* 33(6): 274-283
- Kim CS**, Seol SK, Song OK, Park JH, Jang SK (2007) An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, septin 6, facilitate hepatitis C virus replication. *J Virol* 81(8): 3852-3865
- Kim YK**, Kim CS, Lee SH, Jang SK (2002) Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochem Biophys Res Commun* 290(1): 105-112
- Kim YK**, Lee SH, Kim CS, Seol SK, Jang SK (2003) Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *RNA* 9(5): 599-606
- Kiriakidou M**, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z (2007) An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129(6): 1141-1151
- Kisselev L**, Ehrenberg M, Frolova L (2003) Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *EMBO J* 22(2): 175-182
- Kloosterman WP**, Wienholds E, Ketting RF, Plasterk RH (2004) Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic Acids Res* 32(21): 6284-6291
- Kolupaeva VG**, Pestova TV, Hellen CU (2000) An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol* 74(14): 6242-6250
- Kolupaeva VG**, Unbehaun A, Lomakin IB, Hellen CU, Pestova TV (2005) Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association. *RNA* 11(4): 470-486
- Kolykhalov AA**, Feinstone SM, Rice CM (1996) Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 70(6): 3363-3371
- Kolykhalov AA**, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM (2000) Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* 74(4): 2046-2051
- Komar AA**, Hatzoglou M (2005) Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J Biol Chem* 280(25): 23425-23428
- Kozak M** (1989a) Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Mol Cell Biol* 9(11): 5073-5080
- Kozak M** (1989b) The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 108(2): 229-241
- Krützfeldt J**, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438(7068): 685-689
- Kunkel M**, Lorinczi M, Rijnbrand R, Lemon SM, Watowich SJ (2001) Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J Virol* 75(5): 2119-2129

- Kuo G**, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, et al. (1989) An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244(4902): 362-364
- Lagos-Quintana M**, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12(9): 735-739
- Landgraf P**, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129(7): 1401-1414
- Lanford RE**, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S, Orum H (2010) Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327(5962): 198-201
- Lauer GM, Walker BD** (2001) Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 345(1): 41-52
- Lavillette D**, Pecheur EI, Donot P, Fresquet J, Molle J, Corbau R, Dreux M, Penin F, Cosset FL (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
- Lee Y**, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23(20): 4051-4060
- LeFebvre AK**, Korneeva NL, Trutschl M, Cvek U, Duzan RD, Bradley CA, Hershey JW, Rhoads RE (2006) Translation initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit. *J Biol Chem* 281(32): 22917-22932
- 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
- Li J**, Rahmeh A, Morelli M, Whelan SP (2008) A conserved motif in region v of the large polymerase proteins of nonsegmented negative-sense RNA viruses that is essential for mRNA capping. *J Virol* 82(2): 775-784
- Lingel A**, Simon B, Izaurralde E, Sattler M (2004) Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat Struct Mol Biol* 11(6): 576-577
- Lingel A**, Sattler M (2005) Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway. *Curr Opin Struct Biol* 15(1): 107-115
- Liu J** (2008) Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol* 20(2): 214-221
- Liu S**, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T (2009) Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83(4): 2011-2014
- Liu X**, Fortin K, Mourelatos Z (2008) MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol* 18(1): 113-121
- Locker N**, Easton LE, Lukavsky PJ (2006) Affinity purification of eukaryotic 48S initiation complexes. *RNA* 12(4): 683-690

- 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
- Loeffler F, Frosch P** (1964) Report of the commission for research on foot and mouth disease virus. *Zentralb Bacteriol Paras Infec Krankh* 23:371-391
- Lohmann V**, Körner F, Herian U, Bartenschlager R (1997) Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* 71(11): 8416-8428
- Lohmann V**, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285(5424): 110-113
- Lohmann V**, Roos A, Körner F, Koch JO, Bartenschlager R (2000) Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 7(3): 167-174
- Lomakin IB**, Kolupaeva VG, Marintchev A, Wagner G, Pestova TV (2003) Position of eukaryotic initiation factor eIF1 on the 40S ribosomal subunit determined by directed hydroxyl radical probing. *Genes Dev* 17(22): 2786-2797
- Lozach PY**, Amara A, Bartosch B, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Cosset FL, Altmeyer R (2004) C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 279(31): 32035-32045
- Lu H**, Li W, Noble WS, Payan D, Anderson DC (2004) Riboproteomics of the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *J Proteome Res* 3(5): 949-957
- Lukavsky PJ** (2009) Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res* 139(2): 166-171
- Luo G**, Hamatake RK, Mathis DM, Racela J, Rigat KL, Lemm J, Colonno RJ (2000) De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J Virol* 74(2): 851-863
- Luo G**, Xin S, Cai Z (2003) Role of the 5'-proximal stem-loop structure of the 5' untranslated region in replication and translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 77(5): 3312-3318
- Lytle JR**, Yario TA, Steitz JA (2007) Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(23): 9667-9672
- Ma JB**, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ (2005) Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 434(7033): 666-670
- MacRae IJ**, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA (2008) In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(2): 512-517
- Maniataki E**, Mourelatos Z (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 19(24): 2979-2990
- Marintchev A**, Edmonds KA, Marintcheva B, Hendrickson E, Oberer M, Suzuki C, Herdy B, Sonenberg N, Wagner G (2009) Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell* 136(3): 447-460
- Mathonnet G**, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317(5845): 1764-1767
- McMullan LK**, Grakoui A, Evans MJ, Mihalik K, Puig M, Branch AD, Feinstone SM, Rice CM (2007) Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(8): 2879-2884

- Meister G**, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15(2): 185-197
- Meister G, Tuschl T** (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431(7006): 343-349
- Merrick WC**, Barth-Baus D (2007) Use of reticulocyte lysates for mechanistic studies of eukaryotic translation initiation. *Methods Enzymol* 429: 1-21
- Michel YM**, Borman AM, Paulous S, Kean KM (2001) Eukaryotic initiation factor 4G-poly(A) binding protein interaction is required for poly(A) tail-mediated stimulation of picornavirus internal ribosome entry segment-driven translation but not for X-mediated stimulation of hepatitis C virus translation. *Mol Cell Biol* 21(13): 4097-4109
- Miranda KC**, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I (2006) A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 126(6): 1203-1217
- Miyanari Y**, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9(9): 1089-1097
- Molina S**, Castet V, Fournier-Wirth C, Pichard-Garcia L, Avner R, Harats D, Roitelman J, Barbaras R, Graber P, Ghersa P, Smolarsky M, Funaro A, Malavasi F, Larrey D, Coste J, Fabre JM, Sa-Cunha A, Maurel P (2007) The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* 46(3): 411-419
- Molina S**, Castet V, Pichard-Garcia L, Wychowski C, Meurs E, Pascussi JM, Sureau C, Fabre JM, Sacunha A, Larrey D, Dubuisson J, Coste J, McKeating J, Maurel P, Fournier-Wirth C (2008) Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *J Virol* 82(1): 569-574
- Monazahian M**, Bohme I, Bonk S, Koch A, Scholz C, Grethe S, Thomssen R (1999) Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* 57(3): 223-229
- Moradpour D**, Gosert R, Egger D, Penin F, Blum HE, Bienz K (2003) Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res* 60(2): 103-109
- Moradpour D**, Penin F, Rice CM (2007) Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5(6): 453-463
- Moriishi K, Matsuura Y** (2007) Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev Med Virol* 17(5): 343-354
- Murakami K**, Abe M, Kageyama T, Kamoshita N, Nomoto A (2001) Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. *Arch Virol* 146(4): 729-741
- Nielsen SU**, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeekochchai W, Toms GL (2006) Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* 80(5): 2418-2428
- Niepmann M**, Petersen A, Meyer K, Beck E (1997) Functional involvement of polypyrimidine tract-binding protein in translation initiation complexes with the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 71(11): 8330-8339
- Niepmann M** (2009a) Activation of hepatitis C virus translation by a liver-specific microRNA. *Cell Cycle* 8(10): 1473-1477

- Niepmann M** (2009b) Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochim Biophys Acta* 1789(9-10): 529-541
- Nottrott S**, Simard MJ, Richter JD (2006) Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* 13(12): 1108-1114
- Ochs K**, Rust RC, Niepmann M (1999) Translation initiation factor eIF4B interacts with a picornavirus internal ribosome entry site in both 48S and 80S initiation complexes independently of initiator AUG location. *J Virol* 73(9): 7505-7514
- Ochs K**, Saleh L, Bassili G, Sonntag VH, Zeller A, Niepmann M (2002) Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus internal ribosome entry site. *J Virol* 76(5): 2113-2122
- Oh JW**, Ito T, Lai MM (1999) A recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase capable of copying the full-length viral RNA. *J Virol* 73(9): 7694-7702
- Okamoto H**, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Iizuka H, Machida A, Miyakawa Y, Mayumi M (1991) Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* 72 ( Pt 11): 2697-2704
- Olsen DS**, Savner EM, Mathew A, Zhang F, Krishnamoorthy T, Phan L, Hinnebusch AG (2003) Domains of eIF1A that mediate binding to eIF2, eIF3 and eIF5B and promote ternary complex recruitment in vivo. *EMBO J* 22(2): 193-204
- Orom UA**, Nielsen FC, Lund AH (2008) MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 30(4): 460-471
- Otto GA**, Lukavsky PJ, Lancaster AM, Sarnow P, Puglisi JD (2002) Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S interaction. *RNA* 8(7): 913-923
- Otto GA**, Puglisi JD (2004) The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* 119(3): 369-380
- Pacheco A**, Reigadas S, Martinez-Salas E (2008) Riboproteomic analysis of polypeptides interacting with the internal ribosome-entry site element of foot-and-mouth disease viral RNA. *Proteomics* 8(22): 4782-4790
- Paek KY**, Kim CS, Park SM, Kim JH, Jang SK (2008) RNA-binding protein hnRNP D modulates internal ribosome entry site-dependent translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 82(24): 12082-12093
- Parker JS**, Roe SM, Barford D (2005) Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 434(7033): 663-666
- Paulin FE**, Campbell LE, O'Brien K, Loughlin J, Proud CG (2001) Eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) acts as a classical GTPase-activator protein. *Curr Biol* 11(1): 55-59
- Paulous S**, Malnou CE, Michel YM, Kean KM, Borman AM (2003) Comparison of the capacity of different viral internal ribosome entry segments to direct translation initiation in poly(A)-dependent reticulocyte lysates. *Nucleic Acids Res* 31(2): 722-733
- Pawlotsky JM** (2003) Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis* 7(1): 45-66
- Pelham HR**, Jackson RJ (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* 67(1): 247-256
- Pelletier J**, Kaplan G, Racaniello VR, Sonenberg N (1988) Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5' noncoding region. *Mol Cell Biol* 8(3): 1103-1112

- Peng J**, Murray EL, Schoenberg DR (2008) In vivo and in vitro analysis of poly(A) length effects on mRNA translation. *Methods Mol Biol* 419: 215-230
- Penin F** (2003) Structural biology of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* 7(1): 1-21, vii
- Perrault M, Pécheur EI** (2009) The hepatitis C virus and its hepatic environment: a toxic but finely tuned partnership. *Biochem J* 423(3): 303-314
- Pestova TV**, Borukhov SI, Hellen CU (1998a) Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* 394(6696): 854-859
- Pestova TV**, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CU (1998b) A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 12(1): 67-83
- Pestova TV**, Lomakin IB, Lee JH, Choi SK, Dever TE, Hellen CU (2000) The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403(6767): 332-335
- Pestova TV, Kolupaeva VG** (2002) The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* 16(22): 2906-2922
- Pestova TV**, de Breyne S, Pisarev AV, Abaeva IS, Hellen CU (2008) eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II. *EMBO J* 27(7): 1060-1072
- Petersen CP**, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 21(4): 533-542
- Peterson DT**, Merrick WC, Safer B (1979a) Binding and release of radiolabeled eukaryotic initiation factors 2 and 3 during 80 S initiation complex formation. *J Biol Chem* 254(7): 2509-2516
- Peterson DT**, Safer B, Merrick WC (1979b) Role of eukaryotic initiation factor 5 in the formation of 80 S initiation complexes. *J Biol Chem* 254(16): 7730-7735
- Pfeffer S, Baumert TF** (2010) Antagonizing microRNA-122 and treatment of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 51(4): 1461-1463
- Pileri P**, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282(5390): 938-941
- Pillai RS** (2005) MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* 11(12): 1753-1761
- Pillai RS**, Bhattacharyya SN, Filipowicz W (2007) Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol* 17(3): 118-126
- Pisarev AV**, Kolupaeva VG, Pisareva VP, Merrick WC, Hellen CU, Pestova TV (2006) Specific functional interactions of nucleotides at key -3 and +4 positions flanking the initiation codon with components of the mammalian 48S translation initiation complex. *Genes Dev* 20(5): 624-636
- Pisarev AV**, Hellen CU, Pestova TV (2007) Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* 131(2): 286-299
- Poch O**, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* 8(12): 3867-3874
- Poyry TA**, Kaminski A, Jackson RJ (2004) What determines whether mammalian ribosomes resume scanning after translation of a short upstream open reading frame? *Genes Dev* 18(1): 62-75
- Rajkowitsch L**, Chen D, Stampfl S, Semrad K, Waldsich C, Mayer O, Jantsch MF, Konrat R, Blasi U, Schroeder R (2007) RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases. *RNA Biol* 4(3): 118-130

- Randall G**, Panis M, Cooper JD, Tellinghuisen TL, Sukhodolets KE, Pfeffer S, Landthaler M, Landgraf P, Kan S, Lindenbach BD, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Brownstein MJ, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T, Rice CM (2007) Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(31): 12884-12889
- Rehwinkel J**, Behm-Ansmant I, Gatfield D, Izaurralde E (2005) A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 11(11): 1640-1647
- Reynolds JE**, Kaminski A, Kettinen HJ, Grace K, Clarke BE, Carroll AR, Rowlands DJ, Jackson RJ (1995) Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J* 14(23): 6010-6020
- Rigoutsos I** (2009) New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer Res* 69(8): 3245-3248
- Rijnbrand R**, Bredenbeek P, van der Straaten T, Whetter L, Inchauspe G, Lemon S, Spaan W (1995) Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation. *FEBS Lett* 365(2-3): 115-119
- Rivas FV**, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2005) Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 12(4): 340-349
- Rogers GW, Jr.**, Richter NJ, Merrick WC (1999) Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *J Biol Chem* 274(18): 12236-12244
- Roingard P**, Hourieux C, Blanchard E, Brand D, Ait-Goughoulte M (2004) Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol Cell* 96(2): 103-108
- Roy AL**, Chakrabarti D, Datta B, Hileman RE, Gupta NK (1988) Natural mRNA is required for directing Met-tRNA(f) binding to 40S ribosomal subunits in animal cells: involvement of Co-eIF-2A in natural mRNA-directed initiation complex formation. *Biochemistry* 27(21): 8203-8209
- Scarselli E**, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21(19): 5017-5025
- Schreier MH**, Erni B, Staehelin T (1977) Initiation of mammalian protein synthesis. I. Purification and characterization of seven initiation factors. *J Mol Biol* 116(4): 727-753
- Sempere LF**, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V (2004) Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 5(3): R13
- Shimizu YK**, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H (1996) Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 23(2): 205-209
- Simmonds P**, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS (1993) Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 74 ( Pt 11): 2391-2399
- Simmonds P** (1995) Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 21(2): 570-583
- 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
- Song JJ**, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2003) The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 10(12): 1026-1032

- Song JJ**, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305(5689): 1434-1437
- Song Y**, Tzima E, Ochs K, Bassili G, Trusheim H, Linder M, Preissner KT, Niepmann M (2005) Evidence for an RNA chaperone function of polypyrimidine tract-binding protein in picornavirus translation. *RNA* 11(12): 1809-1824
- Song Y**, Friebe P, Tzima E, Jünemann C, Bartenschlager R, Niepmann M (2006) The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol* 80(23): 11579-11588
- Spahn CM**, Kieft JS, Grassucci RA, Penczek PA, Zhou K, Doudna JA, Frank J (2001) Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 291(5510): 1959-1962
- Standart N**, Jackson RJ (2007) MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation. *Genes Dev* 21(16): 1975-1982
- Svitkin YV**, Ovchinnikov LP, Dreyfuss G, Sonenberg N (1996) General RNA binding proteins render translation cap dependent. *EMBO J* 15(24): 7147-7155
- Takamizawa A**, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, Onishi E, Andoh T, Yoshida I, Okayama H (1991) Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 65(3): 1105-1113
- Tanaka T**, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K, Shimotohno K (1996) Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 70(5): 3307-3312
- Tang H**, Grisé H (2009) Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci (Lond)* 117(2): 49-65
- Tay Y**, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I (2008) MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 455(7216): 1124-1128
- 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
- Thoma C**, Ostareck-Lederer A, Hentze MW (2004) A poly(A) tail-responsive in vitro system for cap- or IRES-driven translation from HeLa cells. *Methods Mol Biol* 257: 171-180
- Tomari Y**, Zamore PD (2005) Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19(5): 517-529
- Tomari Y**, Du T, Zamore PD (2007) Sorting of Drosophila small silencing RNAs. *Cell* 130(2): 299-308
- Trachsel H**, Erni B, Schreier MH, Staehelin T (1977) Initiation of mammalian protein synthesis. II. The assembly of the initiation complex with purified initiation factors. *J Mol Biol* 116(4): 755-767
- Tscherne DM**, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM (2006) Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* 80(4): 1734-1741
- 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
- Tuplin A**, Wood J, Evans DJ, Patel AH, Simmonds P (2002) Thermodynamic and phylogenetic prediction of RNA secondary structures in the coding region of hepatitis C virus. *RNA* 8(6): 824-841
- Tuplin A**, Evans DJ, Simmonds P (2004) Detailed mapping of RNA secondary structures in core and NS5B-encoding region sequences of hepatitis C virus by RNase cleavage and novel bioinformatic prediction methods. *J Gen Virol* 85(Pt 10): 3037-3047

- Unbehaun A**, Borukhov SI, Hellen CU, Pestova TV (2004) Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev* 18(24): 3078-3093
- Van Regenmortel MHV**, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (2000) Virus taxonomy; In: “ The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses”. *Academic Press, San Diego*
- Vassilaki N**, Friebe P, Meuleman P, Kallis S, Kaul A, Paranhos-Baccala G, Leroux-Roels G, Mavromara P, Bartenschlager R (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
- Vasudevan S, Steitz JA** (2007) AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 128(6): 1105-1118
- Vasudevan S**, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318(5858): 1931-1934
- Vester B, Wengel J** (2004) LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry* 43(42): 13233-13241
- Wakita T**, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11(7): 791-796
- Walker SC**, Scott FH, Srisawat C, Engelke DR (2008) RNA affinity tags for the rapid purification and investigation of RNAs and RNA-protein complexes. *Methods Mol Biol* 488: 23-40
- Wang B**, Love TM, Call ME, Doench JG, Novina CD (2006) Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol Cell* 22(4): 553-560
- Wang B**, Doench JG, Novina CD (2007) Analysis of microRNA effector functions in vitro. *Methods* 43(2): 91-104
- 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
- Wang TH**, Rijnbrand RC, Lemon SM (2000) Core protein-coding sequence, but not core protein, modulates the efficiency of cap-independent translation directed by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Virol* 74(23): 11347-11358
- Windbichler N**, Schroeder R (2006) Isolation of specific RNA-binding proteins using the streptomycin-binding RNA aptamer. *Nat Protoc* 1(2): 637-640
- Wu L**, Fan J, Belasco JG (2006) MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(11): 4034-4039
- Wunschmann S**, Medh JD, Klinzmann D, Schmidt WN, Stapleton JT (2000) Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol* 74(21): 10055-10062
- Yamada N**, Tanihara K, Takada A, Yorihuzi T, Tsutsumi M, Shimomura H, Tsuji T, Date T (1996) Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology* 223(1): 255-261
- Yan KS**, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou MM (2003) Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 426(6965): 468-474
- Yekta S**, Shih IH, Bartel DP (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304(5670): 594-596

- Yi M, Lemon SM** (2003a) 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 77(6): 3557-3568
- Yi M, Lemon SM** (2003b) Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA* 9(3): 331-345
- Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q, Tomari Y** (2010) ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol* 17(1): 17-23
- You S, Stump DD, Branch AD, Rice CM** (2004) A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 78(3): 1352-1366
- Yuan YR, Pei Y, Ma JB, Kuryavyi V, Zhadina M, Meister G, Chen HY, Dauter Z, Tuschl T, Patel DJ** (2005) Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell* 19(3): 405-419
- Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Doffoel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF** (2007) Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 46(6): 1722-1731
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W** (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118(1): 57-68
- Zhou X, Duan X, Qian J, Li F** (2009) Abundant conserved microRNA target sites in the 5'-untranslated region and coding sequence. *Genetica* 137(2): 159-164
- Zhu Q, Guo JT, Seeger C** (2003) Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J Virol* 77(17): 9204-9210
- Zou C, Zhang Z, Wu S, Osterman JC** (1998) Molecular cloning and characterization of a rabbit eIF2C protein. *Gene* 211(2): 187-194
- Zuker M** (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31(13): 3406-3415

## VII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS UND GLOSSAR

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ago	Protein der Argonaute-Familie
Amp	Ampicillinresistenz
anti-miR	2'-O-methylierte RNA-Oligoribonukleotide komplementär zur reifen microRNA
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp(s)	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Cap	m <sup>7</sup> -Gppp (am 5'-Ende der mRNA über eine 5'-5'-Bindung angefügtes 7-Methylguanosin)
Ci	Curie, 1 Ci = 3,7 x 10 <sup>10</sup> Bq (Bequerel)
CMV	Cytomegalievirus
cpm	<i>counts per minute</i> (registrierte Zerfälle pro Minute)
CSPD	Dinatrium-3-[4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan}-4-yl] phenylphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DIG	Digoxygenin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dupl	Duplex (Doppelstrang)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
FBS	Fötales Rinderserum
Fluc	<i>Firefly-Luziferase</i> (Luziferase aus dem Leuchtkäfer <i>Photinus pyralis</i> )
FMDV	<i>foot and mouth disease virus</i> (Maul- und Klauenseuche-Virus)
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GMP-PNP	Guanosin-5'-[β,y-imido]triphosphat trisodium salt hydrate
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HCV	Hepatitis C Virus
HDV	Hepatitis Delta Virus
IRES	<i>internal ribosome entry site</i> (interne Ribosomen-Eintrittsstelle)
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LNA	<i>locked nucleic acids</i> (Ribonukleotide, bei denen die C2- und C4-Atome der Ribose durch eine Sauerstoff-Methylen-Brücke verbunden sind)
M	mol/l (molar)

mat	<i>mature</i> (reif)
Met	Met-tRNA <sub>i</sub> <sup>Met</sup> (Methionyl-beladene Initiator-tRNA)
μM	μmol/l
mM	mmol/l
min	Minute(n)
miR	microRNA
miR*	zur microRNA komplementärer Gegenstrang in microRNA-Duplexen
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
mut	Mutante
n=	Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Experimente
NS	Nicht-Struktur-Protein
nt(s)	Nukleotid(e)
NTP	Nukleosidtriphosphat
NTR	nicht-translatierte Region
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
Peak	Hochpunkt, Spitze
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration)
Primer	Einzelsträngiges DNA-Oligonukleotid mit einer freien 3'-OH-Gruppe, die als Startstelle zur DNA-Kettenverlängerung genutzt werden kann.
PTB	Polypyrimidin-Trakt-bindendes Protein
PTV	Porzines Teschovirus
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r-	Ribo-
Rluc	<i>Renilla</i> -Luziferase (Luziferase aus der Qualle <i>Renilla reniformis</i> )
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RRL	<i>rabbit reticulocyte lysate</i> (Kaninchen-Retikulozyten-Lysat)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sin	short and inframe (kurz und im Leserahmen)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-Essigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer ribonucleic acid (Transfer-Ribonukleinsäure)
U	Unit (Enzym-Einheit)
U	Uracil
Ubi	Ubiquitin-Sequenz
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumen/Volumen)
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i> (Gewicht/Volumen)

## VIII ANHANG

## Alignment der HCV-5'-NTR und angrenzender Core-kodierender Sequenz verschiedener HCV-Genotypen

Quelle Sequenzen und Alignment: HCV-Datenbank (<http://hcv.lanl.gov/content/index>).

Komplementäre Sequenzen zur „seed“-Region der microRNA-122 in der HCV-5'-NTR sind durch graue Kästen gekennzeichnet. Die interagierenden Sequenzen der HCV-5'-NTR und der Core-kodierenden Region sind durch schwarze Kästen gekennzeichnet. Die microRNA-Ziel-Sequenzen in der HCV-5'-NTR sowie die interagierenden Sequenzen der HCV-5'-NTR und der Core-kodierenden Region sind unter den HCV-Genotypen und Subtypen konserviert. Für die in der HCV-Datenbank unvollständigen Referenzsequenzen des Genotyps 4a und 5a siehe auch Lanford et al. (2010).

```

pHCVFL12868      GCCAGCCCCGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGA
1a.H77.AF009606  GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGA
1b.AB016785.AB016785  GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGA
2a.JFH-1.AB047639    ACCTGCCCC--TAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGA
2b.HC-J8.D10988     GCCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGA
3a.NZL1.D17763      ACCTGCCTC--TTACGAGGGCGACACTCCACCATGGATCACTCCCCTGTGA
3b.HCV-Tr.D49374    ACCTGCCTC--TTTCGAGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGA
4a.ED43.NC_009825   -----
5a.EUH1480.NC_009826 -----
6b.Th580.D84262    GCCAGCCCC--TTAACGGGGCGACACTCCACCATGA--TCACTCCCCTGTGA

pHCVFL12868      GGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAG
1a.H77.AF009606    GGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAG
1b.AB016785.AB016785  GGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAG
2a.JFH-1.AB047639    GGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGCTTAGCCATGGCGTTAGTATGAG
2b.HC-J8.D10988     GGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAG
3a.NZL1.D17763      GGAACTTCTGTCTTCACGCAGAAAGCGCTTAGCCATGGCGTTAGTACGAG
3b.HCV-Tr.D49374    GGAACTTCTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTACGAG
4a.ED43.NC_009825   -----TTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAG
5a.EUH1480.NC_009826 -----TTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAG
6b.Th580.D84262    GGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAG

pHCVFL12868      TGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTG
1a.H77.AF009606    TGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTG
1b.AB016785.AB016785  TGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTG
2a.JFH-1.AB047639    TGTCGTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTG
2b.HC-J8.D10988     TGTCGTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTG
3a.NZL1.D17763      TGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTG
3b.HCV-Tr.D49374    TGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTG
4a.ED43.NC_009825   TGTTGTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTT
5a.EUH1480.NC_009826 TGTCGAACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTG
6b.Th580.D84262    TGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTG

pHCVFL12868      CGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTTC---
1a.H77.AF009606    CGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTTC---
1b.AB016785.AB016785  CGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTTC---
2a.JFH-1.AB047639    CGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGAAAGACTGGGTCTTTTC---
2b.HC-J8.D10988     CGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTACCGGAAAGACTGGGTCTTTTC---
3a.NZL1.D17763      CGGAACCGGTGAGTACACCGGAATCGCTGGGGTGACCGGGTCTTTTC---
3b.HCV-Tr.D49374    CGGAACCGGTGAGTACACCGGAATCGCCGGGATGACCGGGTCTTTTC---
4a.ED43.NC_009825   CGGAACCGGTGAGTACACCGGAATCGCCGGGATGACCGGGTCTTTTC---
5a.EUH1480.NC_009826 CGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGATGACCGGGTCTTTTC---
6b.Th580.D84262    CGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTTCCA-

pHCVFL12868      TTGGATC---AA---CCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCG
1a.H77.AF009606    TTGGATA---AA---CCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCG
1b.AB016785.AB016785  TTGGATC---AAT---CCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCG
2a.JFH-1.AB047639    TTGGATA---AA---CCCACTCTATGCCCGGCCATTTGGGCGTGCCCCCG
2b.HC-J8.D10988     TTGGATA---AA---CCCACTCTATGTCCGGTCAATTTGGGCACGCCCCCG
3a.NZL1.D17763      TTGGAGC---AA---CCCGCTCAATACCCAGAAATTTGGGCGTGCCCCCG
3b.HCV-Tr.D49374    TTGGAAC---AA---CCCGCTCAATGCCCGGAAATTTGGGCGTGCCCCCG
4a.ED43.NC_009825   TTGGATT---AA---CCCGCTCAATGCCCGGAAATTTGGGCGTGCCCCCG
5a.EUH1480.NC_009826 TTGGATA---AA---CCCGCTCAATGCCCGGAGATTTGGGCGTGCCCCCG
6b.Th580.D84262    TTGGATCA--AA---CCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCG

```

pHCVFL12868 CGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTG  
 1a.H77.AF009606 CAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTG  
 1b.AB016785.AB016785 CGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTG  
 2a.JFH-1.AB047639 CAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTG  
 2b.HC-J8.D10988 CAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTG  
 3a.NZL1.D17763 CGAGATCACTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTG  
 3b.HCV-Tr.D49374 CGAGATCACTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTG  
 4a.ED43.NC\_009825 CAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTG  
 5a.EUH1480.NC\_009826 CGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTG  
 6b.Th580.D84262 CAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTG

pHCVFL12868 CCTGATAGGGTGCTTGCAGTGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACC  
 1a.H77.AF009606 CCTGATAGGGTGCTTGCAGTGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACC  
 1b.AB016785.AB016785 CCTGATAGGGTGCTTGCAGTGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACC  
 2a.JFH-1.AB047639 CCTGATAGGGTGCTTGCAGTGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACC  
 2b.HC-J8.D10988 CCTGATAGGGTGCTTGCAGTGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACC  
 3a.NZL1.D17763 CCTGATAGGGTGCTTGCAGTGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACC  
 3b.HCV-Tr.D49374 CCTGATAGGGTGCTTGCAGTGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACC  
 4a.ED43.NC\_009825 CCTGATAGGGTGCTTGCAGTGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACC  
 5a.EUH1480.NC\_009826 CCTGATAGGGTGCTTGCAGTGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACC  
 6b.Th580.D84262 CCTGATAGGGTGCTTGCAGTGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACC

pHCVFL12868 ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCG  
 1a.H77.AF009606 ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCG  
 1b.AB016785.AB016785 ATGAGCACAAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCG  
 2a.JFH-1.AB047639 ATGAGCACAAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGAAACACCAACCG  
 2b.HC-J8.D10988 ATGAGCACAAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGAAACACCAACCG  
 3a.NZL1.D17763 ATGAGCACACTTCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGAAACACCATCCG  
 3b.HCV-Tr.D49374 ATGAGCACACTTCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGAAACACCACTCCG  
 4a.ED43.NC\_009825 ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCG  
 5a.EUH1480.NC\_009826 ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGAAACACCAACCG  
 6b.Th580.D84262 ATGAGCACACTTCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGAAACACCAACCG

Start

pHCVFL12868 CCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGTGGTCA GATCGTTCGGTGGAG  
 1a.H77.AF009606 TCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGTCA GATCGTTGGTGGAG  
 1b.AB016785.AB016785 CCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGTGGTCA GATCGTTGGTGGAG  
 2a.JFH-1.AB047639 TCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGCGCA GATCGTTGGCGGAG  
 2b.HC-J8.D10988 CCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGTCA GATCGTTGGCGGAG  
 3a.NZL1.D17763 TCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGCA GATCGTTGGTGGAG  
 3b.HCV-Tr.D49374 CCGCCAAAGAAGCTTAAGTTCCCGGCTGGCGGGCA GATCGTTGGTGAAG  
 4a.ED43.NC\_009825 CCGCCCAATGGACGTCAAGTTCCCGGGTGGTGGCA GATCGTTGGCGGAG  
 5a.EUH1480.NC\_009826 CCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGTGGTCA GATCGTTGGTGGAG  
 6b.Th580.D84262 TCGCCCAATGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGCGCA GATCGTTGGTGGAG

pHCVFL12868 TTTACCTGTTGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGGACTAGG  
 1a.H77.AF009606 TTTACTTGTGTCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGGACGAGG  
 1b.AB016785.AB016785 TTTACCTGTTGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGGACTAGG  
 2a.JFH-1.AB047639 TATACTTGTGTCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCACGACAAGG  
 2b.HC-J8.D10988 TTTACTTGTGTCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGGACAAGG  
 3a.NZL1.D17763 TATACGTGTTGCCGCGCAGGGGCCACGATTGGGTGTGCGCGGACGCGT  
 3b.HCV-Tr.D49374 TATATGCTGTCGCGGTAGGGGCCACAATTGGGTGTGCGCGAAGTACGT  
 4a.ED43.NC\_009825 TTTACTTGTGTCGCGCAGGGGCCCCAGATTGGGTGTGCGCGGACTCGG  
 5a.EUH1480.NC\_009826 TTTACTTGTGTCGCGCAGGGGCCCTAAATTGGGTGTGCGCGGACTCGG  
 6b.Th580.D84262 TTTACTTGTGTCGCGCAGGGGCCACGATTGGGTGTGCGCGGACAAGA

## Alignment der HCV-3'-NTR verschiedener HCV-Genotypen

Quelle Sequenzen und Alignment: HCV-Datenbank (<http://hcv.lanl.gov/content/index>).

Komplementäre Sequenzen zur „seed“-Region der microRNA-122 in der HCV-3'-NTR sind durch graue Kästen gekennzeichnet.

```
pHCVFL12868      ACCGATGAAGGTTGGGGT-----AAACACTCCGGCCTCTTAAGCCATTTTC
1a.H77.AF009606  ACCGATGAAGGTTGGGGT-----AAACACTCCGGCCTCTTAGGCCATTTTC
1b.AB016785.AB016785  ACCGGTGAACGGGGAGCT-----AAACACTCCAGGCCAATAGGCCGT--C
2a.JFH-1.AB047639     CTCGGTAGAGCGGCACACACTAGGTACACTCCATAGCTAAGTGTTC---
2b.HC-J8.D10988      CTCGGTAGAGCGGCAAACCTAGCTACACTCCATAGCTAGTTTCC-----
3a.NZL1.D17763       CTCGATGAGCTGGTAAGA-----TAACACTCCATTTCTTT-----T
3b.HCV-Tr.D49374     CTCGGTGAGCTGGTAGGT-----TAACACCCCAACCCTGTGTTTTT
4a.ED43.NC_009825    CTCGGTAG-----GCAGCT-----TAACACTCC--GACCTTAGG-----G
5a.EUH1480.NC_009826  CTCGGTGAGCTGGGAGCT-----AAACACTCC
6b.Th580.D84262     CTCGGTAGACGAGCGGCCCTAAACAACACTCCATAA---CAT-----
                        STOP
```

```
pHCVFL12868      CTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-----
1a.H77.AF009606    CTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-----
1b.AB016785.AB016785  CT-----GTTTTT
2a.JFH-1.AB047639     -----TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
2b.HC-J8.D10988      GTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
3a.NZL1.D17763       TTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
3b.HCV-Tr.D49374
4a.ED43.NC_009825    TCCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTGG
5a.EUH1480.NC_009826  TTTTTTTTTTTTTTTTTT
6b.Th580.D84262     TTTTTTTTTTTTTTTTTT
```

```
pHCVFL12868      -----TTTTTTTTTTCTTTTTTTTTCTTTCCCTTC
1a.H77.AF009606    TTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTCC
1b.AB016785.AB016785  TTTTTTTTTTTTT-----
2a.JFH-1.AB047639    TTTTTTTTTTTTTT----TTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTCCCTCTT
```

```
pHCVFL12868      CTTCTTTTTTTTCTTTCTTTTCCCTTCTTTAATGGTGGCTCCATCTTAG
1a.H77.AF009606    TTCTTTTTTCTTTCTTTTCTTTCTTTAATGGTGGCTCCATCTTAG
1b.AB016785.AB016785  -----TGGTGGCTCCATCTTAG
2a.JFH-1.AB047639    TCTTCCCTTCTCATCTTATCTACTTTCTTTCTTGGTGGCTCCATCTTAG
```

```
pHCVFL12868      CCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAG
1a.H77.AF009606    CCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAG
1b.AB016785.AB016785  CCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAG
2a.JFH-1.AB047639    CCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAG
```

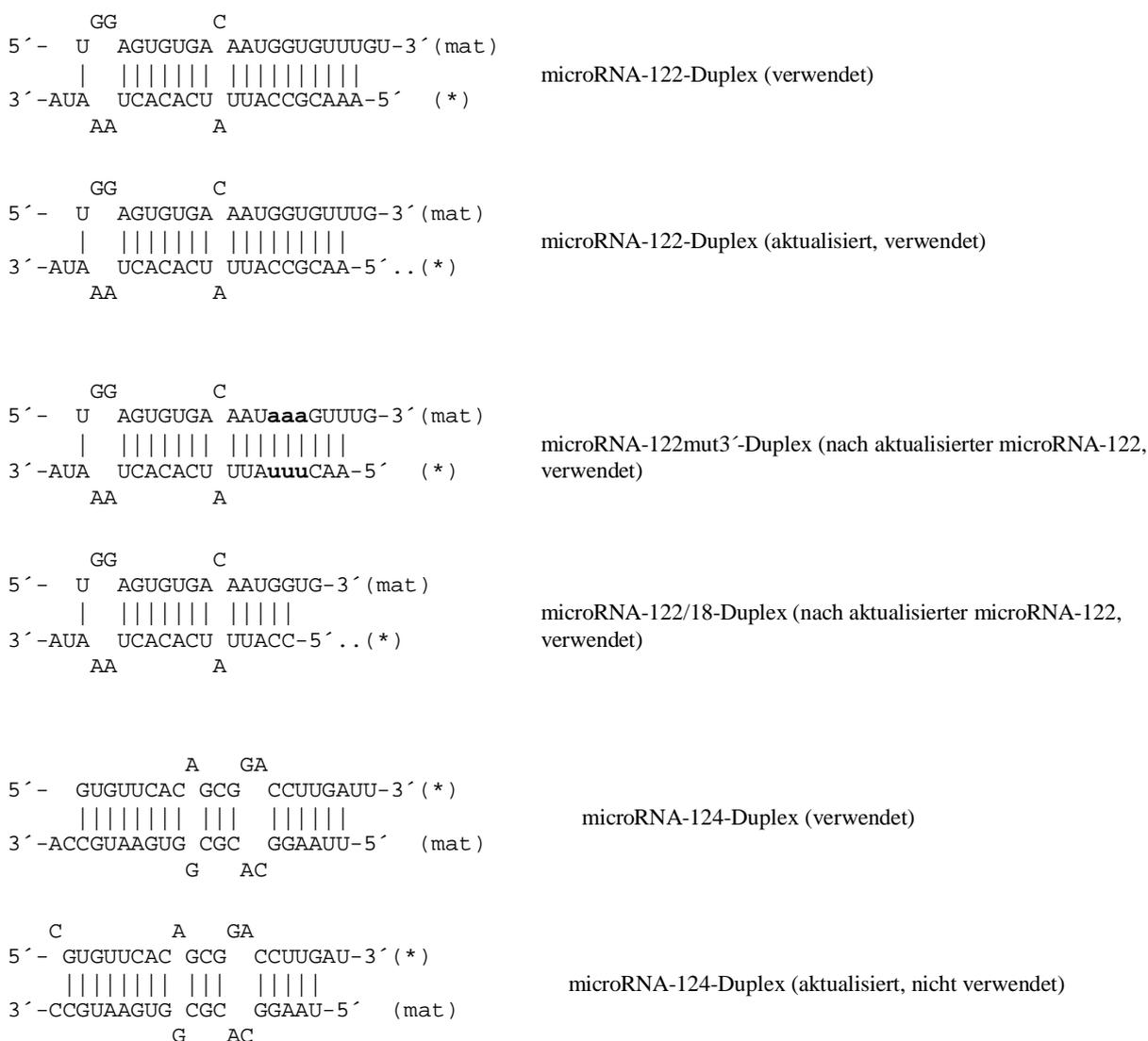
```
pHCVFL12868      AGTGCTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCATGT
1a.H77.AF009606    AGTGCTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCATGT
1b.AB016785.AB016785  AGTGCTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCATGT
2a.JFH-1.AB047639    AGTGCCGTAAGTGGTCTCTCTGCAGATCATGT
```

## Sequenz und Struktur verwendeter microRNA-Duplexe

Die Sequenzen der microRNA-122 (hsa-mir-122, MI0000442) und microRNA-124 (hsa-mir-124-3, MI0000445) wurden der microRNA-Datenbank (<http://www.mirbase.org/index.shtml>) entnommen.

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden die Sequenzen für die microRNA-122 und 124 aktualisiert, was sich auf die Länge der reifen microRNA auswirkt. Die Sequenz der reifen microRNA-122 ist nach der aktualisierten Version um ein Nukleotid am 3'-Ende verkürzt, die Sequenz der reifen microRNA-124 um ein Nukleotid am 5'-Ende sowie am 3'-Ende. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Versionen der microRNA-122 verwendet, wobei keine Unterschiede bezüglich des Einflusses auf die HCV-Translation festgestellt werden konnte.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten microRNA-122-Varianten wurden nach der aktualisierten Version der microRNA-122 erstellt. Mutationen sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. In den microRNA-Duplexen ist der Strang der reifen microRNA durch (mat), der Gegenstrang durch (\*) gekennzeichnet. Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Einzelstränge miR mat, miR\* und anti-miR sowie enthaltene Modifikationen siehe auch Material Kapitel 3.2.2.



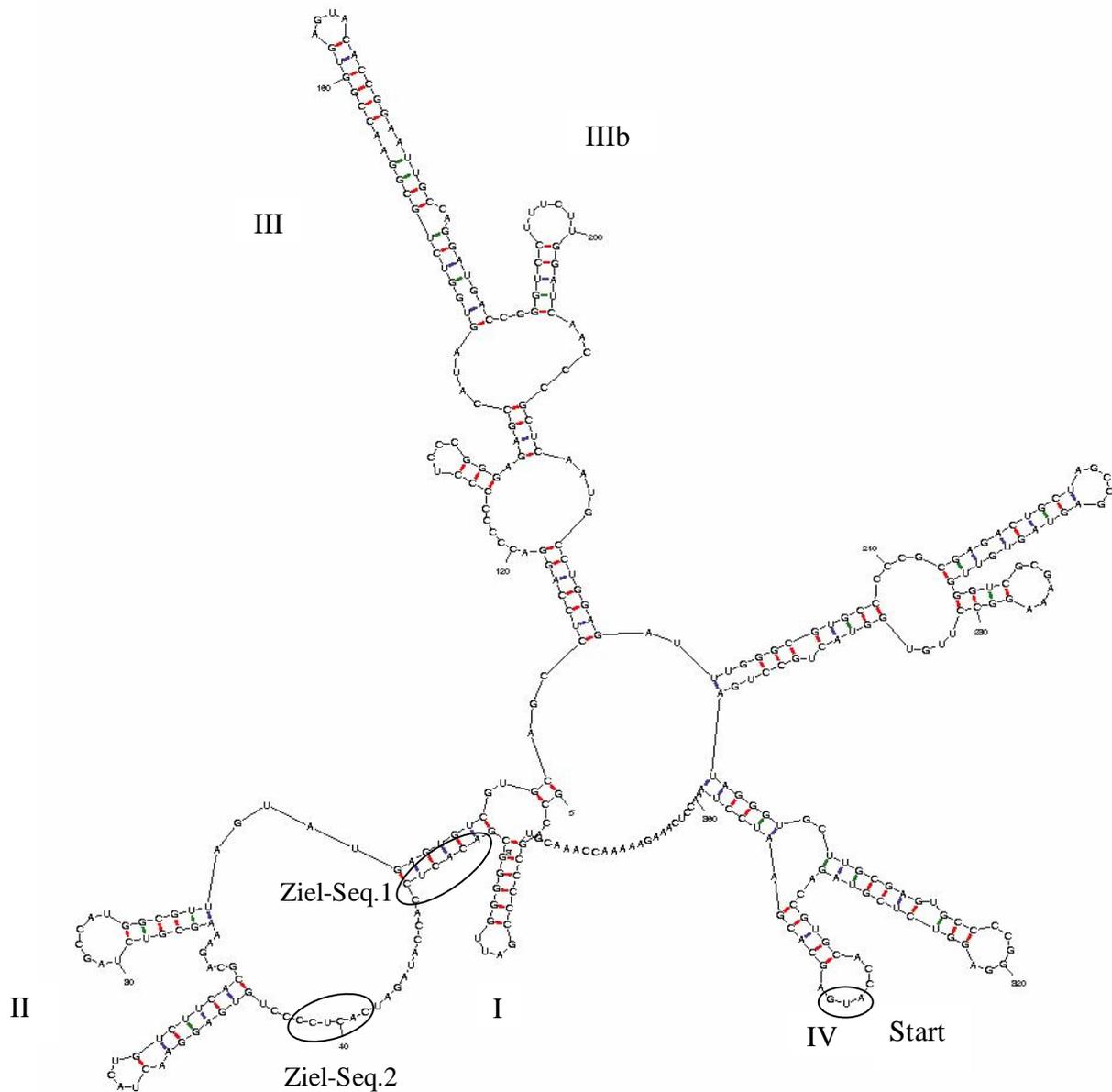
### Mögliche Sekundärstruktur der HCV-5'-NTR nach *mfold*

Mögliche Sekundärstruktur der HCV-5'-NTR und den ersten 36 Nucleotiden des offenen Leserahmens nach *mfold*: <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi> (Zuker, 2003).

Input: Sequenz der HCV-5'-NTR und den ersten 36 Nucleotiden des offenen Leserahmens.

Bedingungen: maximum distance between paired bases 200.

Output: Structure 2, Ziel-Sequenzen der microRNA-122 und Domänen der HCV-IRES sind gekennzeichnet.



$dG = -121.67$  [initially -138.00] 1

### Mögliche Veränderung der Sekundärstruktur der HCV-5'-NTR bei Bindung der miR-122 an die enthaltenen Ziel-Sequenzen nach *mfold*

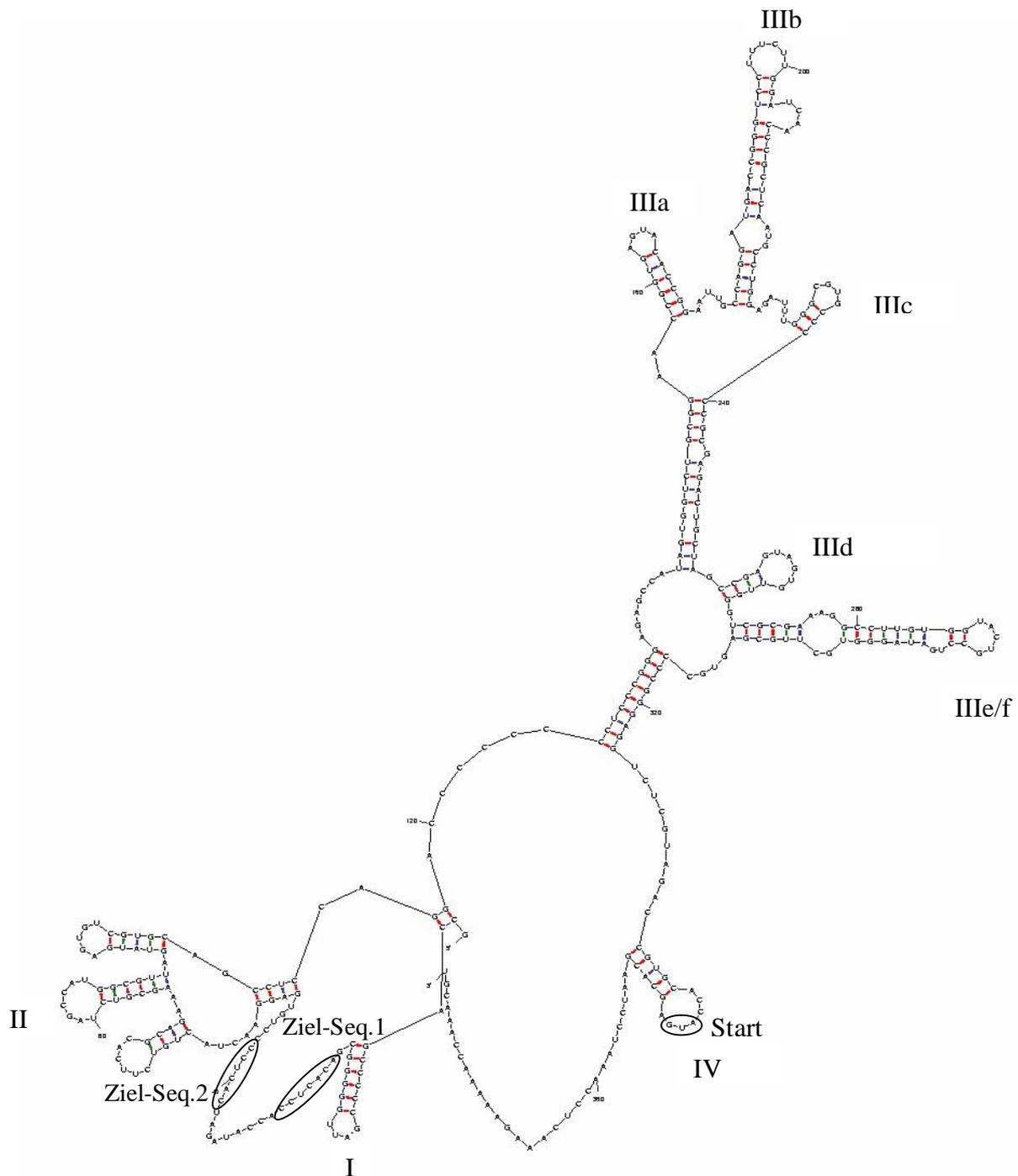
Mögliche Sekundärstruktur der HCV-5'-NTR und den ersten 36 Nucleotiden des offenen Leserahmens nach *mfold*: <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi> (Zuker, 2003), wenn der Sequenzbereich zwischen Domäne I und II der HCV-5'-NTR einzelsträngig vorliegt.

Input: Sequenz der HCV-5'-NTR und den ersten 36 Nucleotiden des offenen Leserahmens.

Bedingungen: maximum distance between paired bases 200.

Nucleotide 21 - 27 sollen einzelsträngig vorliegen (P 21 0 27).

Output: Structure 2, Ziel-Sequenzen der microRNA-122 und Domänen der HCV-IRES sind gekennzeichnet.



$dG = -119.83$  [initially -130.80] 1

## Potentielle Bindestellen der miR-122 in der Protein-kodierenden Sequenz des HCV-Genoms

Vorhergesagte Bindestellen für hsa-miR-122 ([http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_entry.pl?acc=MI0000442](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000442)) in der Protein-kodierenden Sequenz des HCV-RNA-Genoms (Isolat Con1, Genotyp 1) durch RNA22 ([http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22\\_targets.html](http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22_targets.html)) unter folgenden Bedingungen:

- Maximum number of allowed UN-paires bases **1** in seed/nucleus of **7** nucleotides
- Minimum number of paires-up bases in heteroduplex **10**
- Maximum folding energy for heteroduplex (kcal/mol) **-20**

Input: miR-122 5'-uggagugacaaugguguuu-3', Sequenz der genomische HCV-RNA enthalten in pHCVFL12868.

Output: 68 potentielle Bindestellen für miR-122 in der Protein-kodierenden Sequenz des HCV-Genoms, wovon die ersten 10 Treffer hier verzeichnet sind.

### 1 HCV Nukleotide 4777 bis 4798 | Folding energy = -35.79 Kcal/mol

```
AAGACGCGGT-GTCACGCTCGCA HCV
| | | | | | | | | | | | | |
GUUUGUGGUAACAGUGUGAG-GU miR-122
```

### 2 HCV Nukleotide 8789 bis 8810 | Folding energy = -31.90 Kcal/mol

```
GGAGACAGCTAGA--CACACTCCA HCV
| | | | | | | | | | | | | |
G-UUUGU-GGUAACAGUGUGAGGU miR-122
```

### 3 HCV Nukleotide 7386 bis 7407 | Folding energy = -27.90 Kcal/mol

```
ACAAAGACCTTCGGCA-GCTCCG HCV
| | | | | | | | | | | | | |
-GUUUGUGGUAACAGUGUGAGGU miR-122
```

### 4 HCV Nukleotide 3880 bis 3901 | Folding energy = -27.70 Kcal/mol

```
TTCGGGCTGCCGTG--TGCAC-CCG HCV
| | | | | | | | | | | | | |
--GUUUG-UGGUAACAGUGUGAGGU miR-122
```

### 5 HCV Nukleotide 5702 bis 5723 | Folding energy = -27.29 Kcal/mol

```
--AGCATCACTGATGGCATTCACA HCV
| | | | | | | | | | | | | |
GUUUGUGGUAAC-AGUGUGAG-GU miR-122
```

### 6 HCV Nukleotide 8682 bis 8703 | Folding energy = -27.29 Kcal/mol

```
TTGATAACATCATG--CTC-CTCCA HCV
| | | | | | | | | | | | | |
GU---UUGUGGUAACAGUGUGAGGU miR-122
```

### 7 HCV Nukleotide 9191 bis 9212 | Folding energy = -27.10 Kcal/mol

```
G----ACCAAGCTCAAACACTCACTCCA HCV
| | | | | | | | | | | | | |
GUUUGUGGUAACAGU----GUGAGGU miR-122
```

### 8 HCV Nukleotide 9373 bis 9394 | Folding energy = -26.60 Kcal/mol

```
-GAAGTTGGGGTAAACACTCCG HCV
| | | | | | | | | | | | | |
GUUUGUGGUAACAG-UGUGAGGU miR-122
```

### 9 HCV Nukleotide 1061 bis 1082 | Folding energy = -26.50 Kcal/mol

```
--AGCGCTACTCCCACGCTCGCG HCV
| | | | | | | | | | | | | |
GUUUGUG-GUAACAGUGUGAG-GU miR-122
```

### 10 HCV Nukleotide 1795 bis 1816 | Folding energy = -26.40 Kcal/mol

```
ATTGTTGGCACTA----CGCACCCCG HCV
| | | | | | | | | | | | | |
GU----UUGUGGUAACAGUGUGAGGU miR-122
```

## Konserviertheit der potentiellen Bindestellen der miR-122 in der Protein-kodierenden Sequenz des HCV-Genoms

Die meisten der für die Protein-kodierende Sequenz des HCV-Genoms vorhergesagten potentiellen Bindestellen der miR-122 durch RNA22 ([http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22\\_targets.html](http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22_targets.html)) sind unter den HCV-Genotypen nicht konserviert. Das Ergebnis für drei der geprüften Bindestellen ist hier dargestellt. Quelle des Alignments der Sequenzen unterschiedlicher HCV-Genotypen: HCV-Datenbank (<http://hcv.lanl.gov/content/index>). Zur miR-122 komplementäre Nukleotide sind in der Sequenz pHCVFL12868 fett gekennzeichnet.

### HCV Nukleotide 711 bis 732 (Core-kodierende Region) | Folding energy = -23.50 Kcal/mol

```
--GATACCC---TCACGTGCGGCTTTCG HCV
  |||||   |||   |||||
GUUUGUGGUAACAGUG-----UGAGGU miR-122
```

pHCVFL12868	CAATTTGGGTAAGGTCATC <b>GATACCTCACGTGCGGCTTTCG</b> CCGATCTCA
1a.H77.AF009606	CAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCTTACGTGCGGCTTTCG <b>CCGACCTCA</b>
1b.AB016785.AB016785	TAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCTCACATGCGGCTTTCG <b>CCGACCTCA</b>
2a.JFH-1.AB047639	CAACGTGGGTAAAGTCATCGACACCCTAACGTGTGGCTTTCG <b>CCGACCTCA</b>
2b.HC-J8.D10988	CAATTTGGGCAGAGTCATCGATACCATTACGTGTGGTTCG <b>CCGACCTCA</b>
3a.NZL1.D17763	CAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTAACGTGCGGATTCG <b>CCGACCTCA</b>
3b.HCV-Tr.D49374	CAACTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTAACGTGCGGATTCG <b>CCGACCTCA</b>
4a.ED43.NC_009825	CAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTAACCTGCGGCTTTCG <b>CCGACCTCA</b>
5a.EUH1480.NC_009826	CAATTTGGGTAGGGTCATCGATACCCTAACGTGCGGATTCG <b>CCCACCTCA</b>
6b.Th580.D84262	TAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTGACATGCGGACTCG <b>CCGACCTCA</b>

### HCV Nukleotide 891 bis 912 (Core-kodierende Region) | Folding energy = -22.90 Kcal/mol

```
TGTTTGACCATCCAGC-TTCCG HCV
  |||||   ||   |||||
GUUUG-UGGUAACAGUGUGAGGU miR-122
```

pHCVFL12868	<b>GTTTGACCATCCAGCTTCCG</b> CTTATGAAGTGCGCAACGTATCCGGAGTG
1a.H77.AF009606	GCCTGACTGTGCCCGCTTCAGCCTACCAAGTGCGCAATTCCTCGGGGCTT
1b.AB016785.AB016785	GTTTGACCATCCAGCTTCCGCTTATGAAGTGCGCAACGTATCCGGGGTG
2a.JFH-1.AB047639	GCATCACCGTCCCGTCTCTGCTGCCAGGTGAAGAATACCAGTAGCAGC
2b.HC-J8.D10988	GCGTCACAGTGCCAGTGTCTG <b>CAGT</b> GGAAGTCAGGAACATTAGTTCTAGC
3a.NZL1.D17763	GCTTAATTCATCCAGCAGCCAGTCTAGAGTGGCGGAATACGTCTGGCCTC
3b.HCV-Tr.D49374	GCTTGACTTGCCCCGCGTCCAGTCTGGAGTACAGGAATGCGTCTGGCCTA
4a.ED43.NC_009825	GCCTGACTGTCCCCGCTTCCGCGCTTAACTATCGCAATGTCTCAGGCATC
5a.EUH1480.NC_009826	GCCTGACCGTCCCCGCTTCCG <b>CAGT</b> TCCTTACCGTAATGCTTCTGGGGTT
6b.Th580.D84262	GCCTCACACACCAGCTCCGCGCTCACATACGGCAACTCCAGCGGGTTG

### HCV Nukleotide 1061 bis 1082 (E1-kodierende Region) | Folding energy = -26.50 Kcal/mol

```
--AGCGCTCACTCCCACGCTCGCG HCV
  |||||   ||   |||||   ||
GUUUGUG-GUAACAGUGUGAG-GU miR-122
```

pHCVFL12868	ACAACCTCCTCCCGCTGCTGGGT <b>AGCGCTCACTCCCACGCTCGCG</b> GCCAGG
1a.H77.AF009606	GTAACGCCTCGAGGTGTTGGGTGGCGGTGACCCCCACGGTGGCCACCAGG
1b.AB016785.AB016785	ACAATTCCTCTCGTTGCTGGGT <b>AGCGCTTACCCCCACGCTCGCG</b> GCCAGG
2a.JFH-1.AB047639	GGAATACGTCACGGTGTGGGTGCCAGTCTCGCCAAACATGGCTGTGCGG
2b.HC-J8.D10988	ATGGCACCTTGCATTGCTGGATACAAGTAACACCCAACGTGGCTGTGAAA
3a.NZL1.D17763	GCAATACATCTACGTGCTGGACCCAGTGACACCTACAGTGGCAGTCAAG
3b.HCV-Tr.D49374	ACAACAACACATCGTGTGGACACCGATTTACCGACGGTGGCGTCAAG
4a.ED43.NC_009825	GGAATCAGTCACGCTGCTGGGTGGCCCTTACTCCTACCGTCGCAAGCCCA
5a.EUH1480.NC_009826	ATAATGTCACTAGGTGCTGGGTCCAAATCACCCCCACGCTGTCA <b>GCCCCG</b>
6b.Th580.D84262	GAAACATTTACAGCTGCTGGCATCCTGTTTCACCCACCCTGGCTGTACCG

### Komplementäre Sequenz zur „seed“-Region der miR-122 in der *Firefly*-Luziferase-Sequenz

Sequenzvergleiche zeigten, dass die kodierende Sequenz für die *Firefly*-Luziferase im Plasmid pD5 eine komplementäre Sequenz (Nukleotide 858 - 863) zur „seed“-Region der miR-122 aufweist. Um zu prüfen, ob diese eine funktionelle Ziel-Sequenz für die miR-122 darstellt wurde die Sequenz im Plasmid pD5Fmut-122 mutiert.

Nukleotide 843 – 865 des pD5 mit komplementärer Sequenz (Nukleotide 858 – 863, fett) zur „seed“-Region der miR-122

```
TTTGGGAATGTTTACTACACTCGG
      |||||
-GUUUGUGGUAACAGUGUGAGGU miR-122
```

Nukleotide 843 – 865 des pD5Fmut122 mit Mutation (Kleinbuchstaben) in der komplementären Sequenz (Nukleotide 858 – 863, fett) zur „seed“-Region der miR-122

```
TTTGGGAATGTTTACTACgtAGG
      |||||
-GUUUGUGGUAACAGUGUGAGGU miR-122
```

### Potentielle Bindestellen für die miR-122 in der *Firefly*-Luziferase-Sequenz nach RNA22

Vorhergesagte Bindestellen für hsa-miR-122 ([http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_entry.pl?acc=MI0000442](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000442)) in der *Firefly*-Luziferase-Sequenz mittels RNA22 ([http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22\\_targets.html](http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22_targets.html)) unter folgenden Bedingungen:

- Maximum number of allowed UN-paires bases **2** in seed/nucleus of **7** nucleotides
- Minimum number of paires-up bases in heteroduplex **16**
- Maximum folding energy for heteroduplex (kcal/mol) **-23**

Input: miR-122 5'-uggagugugacaugguguuu-3', Sequenz der *Firefly*-Luziferase aus pD5.

Output: 2 potentielle Bindestellen mit dem Maximum der Basenpaarung von 16 Nukleotiden.

1 Nukleotide 491 to 512 | Folding energy = -28.29 Kcal/mol

```
TG--TACACGTTTCGTACATCTCA
      ||| |||| ||||| ||
GUUUGUG-GUAA-CAGUGUGAGGU miR-122
```

2 Nukleotide 1286 to 1307 | Folding energy = -26.00 Kcal/mol

```
ACGAACACTTCT-TCATAGTTGA
      ||||| |||| ||
-GUUUGUGGUAACAGUGUGAGGU miR-122
```

### Potentielle Bindestellen für die miR-122 in der *Renilla*-Luziferase-Sequenz nach RNA22

Vorhergesagte Bindestellen für hsa-miR-122 ([http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_entry.pl?acc=MI0000442](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000442)) in der *Renilla*-Luziferase-Sequenz mittels RNA22 ([http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22\\_targets.html](http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22_targets.html)) unter folgenden Bedingungen:

- Maximum number of allowed UN-paires bases **2** in seed/nucleus of **7** nucleotides
- Minimum number of paires-up bases in heteroduplex **16**
- Maximum folding energy for heteroduplex (kcal/mol) **-23**

Input: miR-122 5'-uggagugugacaugguguuu-3', Sequenz der *Renilla*-Luziferase aus phRLnull.

Output: 1 potentielle Bindestellen mit dem Maximum der Basenpaarung von 16 Nukleotiden.

1 Nukleotide 599 to 620 | Folding energy = -23.50 Kcal/mol

```
CTACAAGTACC---TCACCGCTTGG
      ||||| |||| |||
---GUUUGUGGUAACAGUG-UGAGGU miR-122
```

## Annotierte Sequenz der HCV-Reporter-Plasmide mit eingefügten Mutationen

Vollständige Sequenz des Plasmids pHCV-CLX-CMV mit Benennung der Sequenzabschnitte und verschiedenen eingefügten Mutationen. Mutierte Sequenzen sind durch graue Großbuchstaben gekennzeichnet.

```

pHCV
CLX-CMV      1  gccagccccg attggggggc acactccacc atagatcact cccctgtgag gaactactgt cttcacgcag
5mut1        1  gccagccccg attggggggc CGCGGAAacc atagatcact cccctgtgag gaactactgt cttcacgcag
5mut2        1  gccagccccg attggggggc acactccacc atagatGCGG AACctgtgag gaactactgt cttcacgcag
5mut1/2      1  gccagccccg attggggggc CGCGGAAacc atagatGCGG AACctgtgag gaactactgt cttcacgcag
mut 24-38    1  gccagccccg attggggggc acacAccTcc TtaTatcact cccctgtgag gaactactgt cttcacgcag
mut 428-442  1  gccagccccg attggggggc acactccacc atagatcact cccctgtgag gaactactgt cttcacgcag
mut comp     1  gccagccccg attggggggc acacAccTcc TtaTatcact cccctgtgag gaactactgt cttcacgcag
5mut3'       1  gccagccccg attggggggc acactccTTT atagatcact cccctgtgag gaactactgt cttcacgcag
FL           1  gccagccccg attggggggc acactccacc atagatcact cccctgtgag gaactactgt cttcacgcag
Fmut122     1  gccagccccg attggggggc acactccacc atagatcact cccctgtgag gaactactgt cttcacgcag
delta-VR     1  gccagccccg attggggggc acactccacc atagatcact cccctgtgag gaactactgt cttcacgcag
>>.....HCV 5-NTR.....>

Alle         71  aaagcgtcta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtgcagc ctccaggacc ccccccctccc gggagagcca
>.....HCV 5-NTR.....>

Alle         141 tagtgggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag gatgaccggg tcctttcttg gatcaaccgg
>.....HCV 5-NTR.....>

Alle         211  ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgccccc gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc
>.....HCV 5-NTR.....>

Alle         281  ttgtgggtact gcctgatagg gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcagc
>.....HCV 5-NTR.....>>>.....>

CLX-CMV     351  aatcctaaac ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacc gccgcccaca ggacgtcaag ttcccggggc
5mut1       351  aatcctaaac ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacc gccgcccaca ggacgtcaag ttcccggggc
5mut2       351  aatcctaaac ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacc gccgcccaca ggacgtcaag ttcccggggc
5mut1/2     351  aatcctaaac ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacc gccgcccaca ggacgtcaag ttcccggggc
mut 24-38   351  aatcctaaac ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacc gccgcccaca ggacgtcaag ttcccggggc
mut 428-442 351  aatcctaaac ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacc gccgcccaca ggacgtcaag ttcccggggc
mut comp    351  aatcctaaac ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacc gccgcccaca ggacgtcaag ttcccggggc
5mut3'      351  aatcctaaac ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacc gccgcccaca ggacgtcaag ttcccggggc
FL          351  aatcctaaac ctcaaagaaa aacc----- -----
Fmut122    351  aatcctaaac ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacc gccgcccaca ggacgtcaag ttcccggggc
delta-VR    351  aatcctaaac ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacc gccgcccaca ggacgtcaag ttcccggggc
>.....HCV Core.....>

CLX-CMV     421  gtggtcagat cgttgggtgga gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc gcgcgactag
5mut1       421  gtggtcagat cgttgggtgga gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc gcgcgactag
5mut2       421  gtggtcagat cgttgggtgga gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc gcgcgactag
5mut1/2     421  gtggtcagat cgttgggtgga gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc gcgcgactag
mut 24-38   421  gtggtcagat cgttgggtgga gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc gcgcgactag
mut 428-442 421  gtggtcagat AgtAggAggT gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc gcgcgactag
mut comp    421  gtggtcagat AgtAggAggT gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc gcgcgactag
5mut3'      421  gtggtcagat cgttgggtgga gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc gcgcgactag
FL          421  -----
Fmut122    421  gtggtcagat cgttgggtgga gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc gcgcgactag
delta-VR    421  gtggtcagat cgttgggtgga gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc gcgcgactag
>.....HCV Core.....>

CLX-CMV     491  gaagacttcc gagcgggtcgc aacctcgtgg aaggcgacaa cctatcccca aggctcgcca gcccgagggc
5mut1       491  gaagacttcc gagcgggtcgc aacctcgtgg aaggcgacaa cctatcccca aggctcgcca gcccgagggc
5mut2       491  gaagacttcc gagcgggtcgc aacctcgtgg aaggcgacaa cctatcccca aggctcgcca gcccgagggc
5mut1/2     491  gaagacttcc gagcgggtcgc aacctcgtgg aaggcgacaa cctatcccca aggctcgcca gcccgagggc
mut 24-38   491  gaagacttcc gagcgggtcgc aacctcgtgg aaggcgacaa cctatcccca aggctcgcca gcccgagggc
mut 428-442 491  gaagacttcc gagcgggtcgc aacctcgtgg aaggcgacaa cctatcccca aggctcgcca gcccgagggc
mut comp    491  gaagacttcc gagcgggtcgc aacctcgtgg aaggcgacaa cctatcccca aggctcgcca gcccgagggc
5mut3'      491  gaagacttcc gagcgggtcgc aacctcgtgg aaggcgacaa cctatcccca aggctcgcca gcccgagggc
FL          491  -----
Fmut122    491  gaagacttcc gagcgggtcgc aacctcgtgg aaggcgacaa cctatcccca aggctcgcca gcccgagggc
delta-VR    491  gaagacttcc gagcgggtcgc aacctcgtgg aaggcgacaa cctatcccca aggctcgcca gcccgagggc
>.....HCV Core.....>

CLX-CMV     561  agggcctggg ctcagccccg gtacccttgg cccctctatg gcaatggcat gcagatcttc atgaagacc
5mut1       561  agggcctggg ctcagccccg gtacccttgg cccctctatg gcaatggcat gcagatcttc atgaagacc
5mut2       561  agggcctggg ctcagccccg gtacccttgg cccctctatg gcaatggcat gcagatcttc atgaagacc
5mut1/2     561  agggcctggg ctcagccccg gtacccttgg cccctctatg gcaatggcat gcagatcttc atgaagacc
mut 24-38   561  agggcctggg ctcagccccg gtacccttgg cccctctatg gcaatggcat gcagatcttc atgaagacc
mut 428-442 561  agggcctggg ctcagccccg gtacccttgg cccctctatg gcaatggcat gcagatcttc atgaagacc

```

```

mut comp      561 agggcctggg ctcagcccgg gtacccttgg cccctctatg gcaatggcat gcagatcttc atgaagacct
5mut3'       561 agggcctggg ctcagcccgg gtacccttgg cccctctatg gcaatggcat gcagatcttc atgaagacct
FL           561 -----
Fmut122      561 agggcctggg ctcagcccgg gtacccttgg cccctctatg gcaatggcat gcagatcttc atgaagacct
delta-VR     561 agggcctggg ctcagcccgg gtacccttgg cccctctatg gcaatggcat gcagatcttc atgaagacct
>.....HCV Core.....>>>...Ubiquitin linker....>

CLX-CMV      631 tgacgggcaa gaccatcact cttgaggtcg agcccagtga caccatcgag aatgtcaagg ccaagatcca
5mut1        631 tgacgggcaa gaccatcact cttgaggtcg agcccagtga caccatcgag aatgtcaagg ccaagatcca
5mut2        631 tgacgggcaa gaccatcact cttgaggtcg agcccagtga caccatcgag aatgtcaagg ccaagatcca
5mut1/2      631 tgacgggcaa gaccatcact cttgaggtcg agcccagtga caccatcgag aatgtcaagg ccaagatcca
mut 24-38    631 tgacgggcaa gaccatcact cttgaggtcg agcccagtga caccatcgag aatgtcaagg ccaagatcca
mut 428-442  631 tgacgggcaa gaccatcact cttgaggtcg agcccagtga caccatcgag aatgtcaagg ccaagatcca
mut comp     631 tgacgggcaa gaccatcact cttgaggtcg agcccagtga caccatcgag aatgtcaagg ccaagatcca
5mut3'       631 tgacgggcaa gaccatcact cttgaggtcg agcccagtga caccatcgag aatgtcaagg ccaagatcca
FL           631 -----
Fmut122      631 tgacgggcaa gaccatcact cttgaggtcg agcccagtga caccatcgag aatgtcaagg ccaagatcca
delta-VR     631 tgacgggcaa gaccatcact cttgaggtcg agcccagtga caccatcgag aatgtcaagg ccaagatcca
>.....Ubiquitin linker.....>

CLX-CMV      701 agacaaggaa ggcattccac ctgaccagca gaggctgata ttccgctgga aacagctgga ggatggccgc
5mut1        701 agacaaggaa ggcattccac ctgaccagca gaggctgata ttccgctgga aacagctgga ggatggccgc
5mut2        701 agacaaggaa ggcattccac ctgaccagca gaggctgata ttccgctgga aacagctgga ggatggccgc
5mut1/2      701 agacaaggaa ggcattccac ctgaccagca gaggctgata ttccgctgga aacagctgga ggatggccgc
mut 24-38    701 agacaaggaa ggcattccac ctgaccagca gaggctgata ttccgctgga aacagctgga ggatggccgc
mut 428-442  701 agacaaggaa ggcattccac ctgaccagca gaggctgata ttccgctgga aacagctgga ggatggccgc
mut comp     701 agacaaggaa ggcattccac ctgaccagca gaggctgata ttccgctgga aacagctgga ggatggccgc
5mut3'       701 agacaaggaa ggcattccac ctgaccagca gaggctgata ttccgctgga aacagctgga ggatggccgc
FL           701 -----
Fmut122      701 agacaaggaa ggcattccac ctgaccagca gaggctgata ttccgctgga aacagctgga ggatggccgc
delta-VR     701 agacaaggaa ggcattccac ctgaccagca gaggctgata ttccgctgga aacagctgga ggatggccgc
>.....Ubiquitin linker.....>

CLX-CMV      771 acctgtccg actacaacat ccagaaagag tccaccttgc acctggtgct gcgactccgc ggtggcatgg
5mut1        771 acctgtccg actacaacat ccagaaagag tccaccttgc acctggtgct gcgactccgc ggtggcatgg
5mut2        771 acctgtccg actacaacat ccagaaagag tccaccttgc acctggtgct gcgactccgc ggtggcatgg
5mut1/2      771 acctgtccg actacaacat ccagaaagag tccaccttgc acctggtgct gcgactccgc ggtggcatgg
mut 24-38    771 acctgtccg actacaacat ccagaaagag tccaccttgc acctggtgct gcgactccgc ggtggcatgg
mut 428-442  771 acctgtccg actacaacat ccagaaagag tccaccttgc acctggtgct gcgactccgc ggtggcatgg
mut comp     771 acctgtccg actacaacat ccagaaagag tccaccttgc acctggtgct gcgactccgc ggtggcatgg
5mut3'       771 acctgtccg actacaacat ccagaaagag tccaccttgc acctggtgct gcgactccgc ggtggcatgg
FL           771 -----
Fmut122      771 acctgtccg actacaacat ccagaaagag tccaccttgc acctggtgct gcgactccgc ggtggcatgg
delta-VR     771 acctgtccg actacaacat ccagaaagag tccaccttgc acctggtgct gcgactccgc ggtggcatgg
>.....Ubiquitin linker.....>>...>

Alle         841 aagacgcaa aaacataaag aaaggccgg cgccattcta tctctagag gatggaaccg ctggagagca
>.....Luziferase.....>

Alle         911 actgcataag gctatgaaga gatacgccct ggttctctgga acaattgctt ttacagatgc acatattcag
>.....Luziferase.....>

Alle         981 gtgaacatca cgtacgcgga atacttcgaa atgtccgttc ggttggcaga agctatgaaa cgatatgggc
>.....Luziferase.....>

Alle        1051 tgaatacaaa tcacagaatc gtogtatgca gtgaaaactc tcttcaattc tttatgccgg tgttggggcg
>.....Luziferase.....>

Alle        1121 gttatattatc ggagttgcag ttgcccgcgc gaacgacatt tataatgaac gtgaattgct caacagtatg
>.....Luziferase.....>

Alle        1191 aacatttcgc agcctaccgt agtgtttgtt tccaaaagg ggttgcaaaa aattttgaaac gtgcaaaaaa
>.....Luziferase.....>

Alle        1261 aattaccaat aatccagaaa attattatca tggattctaa aacggattac cagggatttc agtcgatgta
>.....Luciferase.....>

Alle        1331 cacgttcgtc acatctcacc tacctcccgg ttttaatgaa tacgattttg taccagatgc ctttgatcgt
>.....Luziferase.....>

Alle        1401 gacaaaacaa ttgcaactgat aatgaattcc tctggatcta ctgggttacc taagggtgtg gcccttccgc
>.....Luziferase.....>

Alle        1471 atagaactgc ctgcgctcaga ttctcgcgatg ccagagatcc tatttttggc aatcaaatca ttccggatac
>.....Luziferase.....>

```

```

CXL-CMV      1541  tgcgatttta agtgttgttc cattccatca cggttttgga atgtttacta cactcggata tttgatatgt
5mut1        1541  tgcgatttta agtgttgttc cattccatca cggttttgga atgtttacta cactcggata tttgatatgt
5mut2        1541  tgcgatttta agtgttgttc cattccatca cggttttgga atgtttacta cactcggata tttgatatgt
5mut1/2      1541  tgcgatttta agtgttgttc cattccatca cggttttgga atgtttacta cactcggata tttgatatgt
mut24-38     1541  tgcgatttta agtgttgttc cattccatca cggttttgga atgtttacta cactcggata tttgatatgt
mut428-442   1541  tgcgatttta agtgttgttc cattccatca cggttttgga atgtttacta cactcggata tttgatatgt
mut comp     1541  tgcgatttta agtgttgttc cattccatca cggttttgga atgtttacta cactcggata tttgatatgt
5mut3'       1541  tgcgatttta agtgttgttc cattccatca cggttttgga atgtttacta cactcggata tttgatatgt
FL           1541  tgcgatttta agtgttgttc cattccatca cggttttgga atgtttacta cactcggata tttgatatgt
Fmut122     1541  tgcgatttta agtgttgttc cattccatca cggttttgga atgtttacta cGTTAggata tttgatatgt
delta-VR     1541  tgcgatttta agtgttgttc cattccatca cggttttgga atgtttacta cactcggata tttgatatgt
>.....Luziferase.....>

Alle         1611  ggatttcgag tcgtcttaat gtatagattt gaagaagagc tgtttttacg atcccttcag gattacaaaa
>.....Luziferase.....>

Alle         1681  ttcaaagtgc gttgctagta ccaaccctat tttcattctt cgccaaaagc actctgattg acaaatacga
>.....Luziferase.....>

Alle         1751  tttatctaat ttacacgaaa ttgcttctgg gggcgcacct ctttcgaaag aagtcgggga agcgggttga
>.....Luziferase.....>

Alle         1821  aaacgcttcc atcttccagg gatacgacaa ggatattggc tcaactgagac tacatcagct attctgatta
>.....Luziferase.....>

Alle         1891  cacccgaggg ggatgataaa ccgggcgagg tcggtaaagt tgttccattt tttgaagcga aggttgtgga
>.....Luziferase.....>

Alle         1961  tctggatacc gggaaaacgc tgggcgttaa tcagagaggg gaattatgtg tcagaggacc tatgattatg
>.....Luziferase.....>

Alle         2031  tccggttatg taaacaatcc ggaagcgacc aacgccttga ttgacaagga tggatggcta cattctggag
>.....Luziferase.....>

Alle         2101  acatagctta ctgggacgaa gacgaacact tcttcatagt tgaccgcttg aagtctttaa ttaatacaa
>.....Luziferase.....>

Alle         2171  aggatatcag gtggcccccg ctgaattgga atcgatattg ttacaacacc ccaacatctt cgacgcgggc
>.....Luziferase.....>

Alle         2241  gtggcaggtc ttcccagca tgacgcgggt gaacttcccg ccgcccgttg tgtttggag cacgaaaaga
>.....Luziferase.....>

Alle         2311  cgatgacgga aaaagagatc gtggattacg tcgccagtca agtaacaacc gcgaaaaagt tgcgaggagg
>.....Luziferase.....>

Alle         2381  agttgtgttt gtggacgaag taccgaaagg tcttaccgga aaactcgacg caagaaaaat cagagagatc
>.....Luziferase.....>

CLX-CMV     2451  ctcataaagg ccaagaaggg cggaaagtcc aaattgtgaa ggttggggta aacactccgg cctcttaagc
5mut1        2451  ctcataaagg ccaagaaggg cggaaagtcc aaattgtgaa ggttggggta aacactccgg cctcttaagc
5mut2        2451  ctcataaagg ccaagaaggg cggaaagtcc aaattgtgaa ggttggggta aacactccgg cctcttaagc
5mut1/2      2451  ctcataaagg ccaagaaggg cggaaagtcc aaattgtgaa ggttggggta aacactccgg cctcttaagc
mut24-38     2451  ctcataaagg ccaagaaggg cggaaagtcc aaattgtgaa ggttggggta aacactccgg cctcttaagc
mut428-442   2451  ctcataaagg ccaagaaggg cggaaagtcc aaattgtgaa ggttggggta aacactccgg cctcttaagc
mut comp     2451  ctcataaagg ccaagaaggg cggaaagtcc aaattgtgaa ggttggggta aacactccgg cctcttaagc
5mut3'       2451  ctcataaagg ccaagaaggg cggaaagtcc aaattgtgaa ggttggggta aacactccgg cctcttaagc
FL           2451  ctcataaagg ccaagaaggg cggaaagtcc aaattgtgaa ggttggggta aacactccgg cctcttaagc
Fmut122     2451  ctcataaagg ccaagaaggg cggaaagtcc aaattgtgaa ggttggggta aacactccgg cctcttaagc
Delta-VR     2451  ctcataaagg ccaagaaggg cggaaagtcc aaattgtgaa -----c
>...Luziferase.....>>>...HCV 3-NTR.....>

Alle         2521  catttctgtt tttttttttt tttttttttt tttttttctt tttttttctt ttctttctct tctttttttc
>.....HCV 3-NTR.....>

Alle         2591  ctttcttttt ccttctttaa atgggtggctc catcttagcc ctagtccagg ctagtctgta aaggctccgtg
>.....HCV 3-NTR.....>

Alle         2661  agccgcatga ctgcagagag tgctgatact ggctctctg cagatcatgt gttcgaagag cactagagga
>.....HCV 3-NTR.....>

2731  tccccgatc cccgggagag ctogaattcg taatcatgtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc

2801  gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc

2871  taactcacat taattgcggt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt

2941  aatgaatcgg ccaacgcgag gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttctc cgctcactga

```

3011 ctcgctgcg ctcggtcggtc ggctgcggcg agcgggatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc  
3081 acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa  
3151 aggcgcggtt gctggcggtt ttccatagc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag  
3221 tcagaggtag cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcg  
3291 tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcggaagc gtggcgcttt  
3361 ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga  
3431 acccccgtt cagcccagc gctgcccctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaacc ggtaagacac  
3501 gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag  
3571 agttcttgaa gtggtagcct aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgag ctctgctgaa  
3641 gccagttacc ttcgaaaaa gagttgtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcggtagt  
3711 tttttgttt gcaagcagc gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta  
3781 cggggtctga cgctcagtag aacgaaaact cacgttaagg gattttgtc atgagattat caaaaaggat  
3851 cttcaactag atccttttaa attaaaaatg aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacctgg  
3921 tctgacagtt accaatgctt aatcagtagg gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag  
3991 ttgctgact ccccgctgtag tagataacta cgatacggga gggcttacc tctggcccc gtgctgcaat  
4061 gataccgca gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggccgag  
4131 cgcagaagtg gtctgcaac tttatccgct tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa  
4201 gtagttcgc agttaatagt ttgcgcaac ttgttgcoat tgctacaggc atcgtggtgt cagcctcgtc  
4271 gtttggtatg gcttcattca gctccggtc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catggtgtgc  
4341 aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcc atcgttgca gaagtaagt ggccgagtg ttatcactca  
4411 tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgotttctg tgaactggtg  
4481 gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatcgg  
4551 gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaac  
4621 tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact gatcttcagc  
4691 atcttttact ttcaccagc tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggata  
4761 agggcgacac ggaaatgtg aatactcata ctcttcttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt  
4831 attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt  
4901 tccccgaaa gtgccaccta aattgtaagc gttaatatt tgtaaaaatt cgcgttaaat tttgttaaa  
4971 tcagctcatt ttttaacaa taggcgaaa tcggcaaaat cccttataaa tcaaaagaat agaccgagat  
5041 agggttgagt gttgttccag tttggaaca gagtccacta ttaaagaacg tggactcca cgtcaaagg  
5111 cgaaaaaccg tctatcaggc cgatggccca ctacgtgac catcaccta atcaagttt ttggggtcga  
5181 ggtgccgtaa agcactaaat cggaaccta aaggagccc ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc  
>>  
5251 tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agccatata tggagttccg cgttacataa  
>.....CMV promoter.....>  
5321 cttacggtaa atggcccgc ttgctgacc cccaacgacc cccgccctt gaagtcaata atgacgtatg  
>.....CMV promoter.....>  
5391 ttccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca  
>.....CMV promoter.....>  
5461 cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgcc cctattgag tcaatgacgg taaatggccc  
>.....CMV promoter.....>

---

```
5531 gcctggcatt atgccagta catgacctta tgggacttcc ctacttggca gtacatctac gtattagtca
>.....CMV promoter.....>

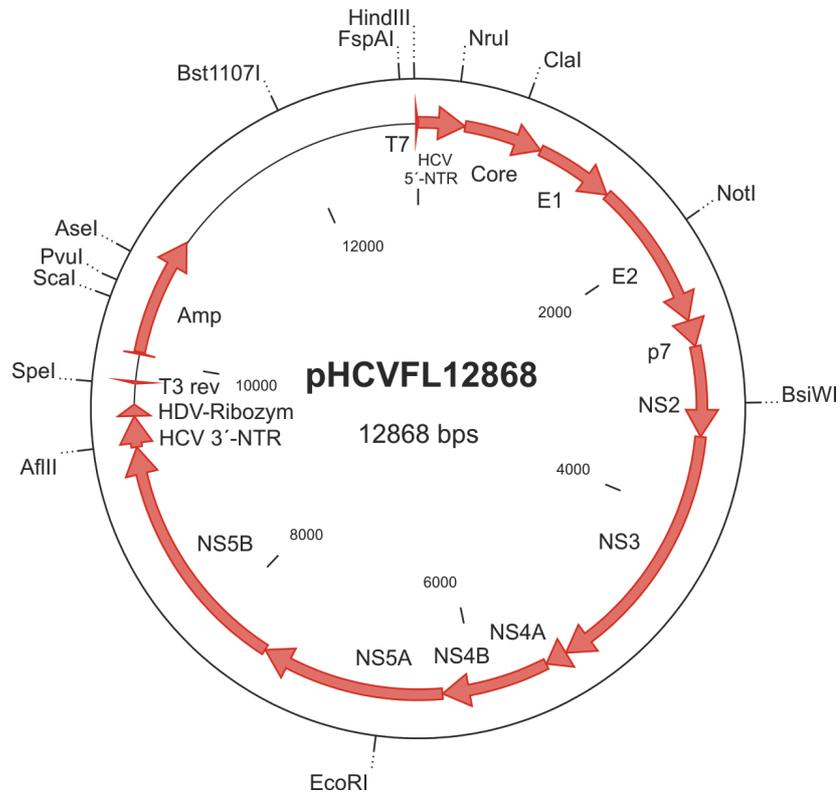
5601 tcgctattac catggatgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg
>.....CMV promoter.....>

5671 attccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggacc aaaatcaacg ggactttcca
>.....CMV promoter.....>

5741 aaatgctgta acaactccgc ccattgacg caaatggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa
>.....CMV promoter.....>

5811 ggtgaaccgt cagaagctag cggccgacg gtagcgtata gcttttaata cgactcacta ta
>..CMV promoter...> >>..T7 promoter...>>
```

## Organisation des Plasmids pHCVFL12868 kodierend für die vollständige genomische HCV-RNA

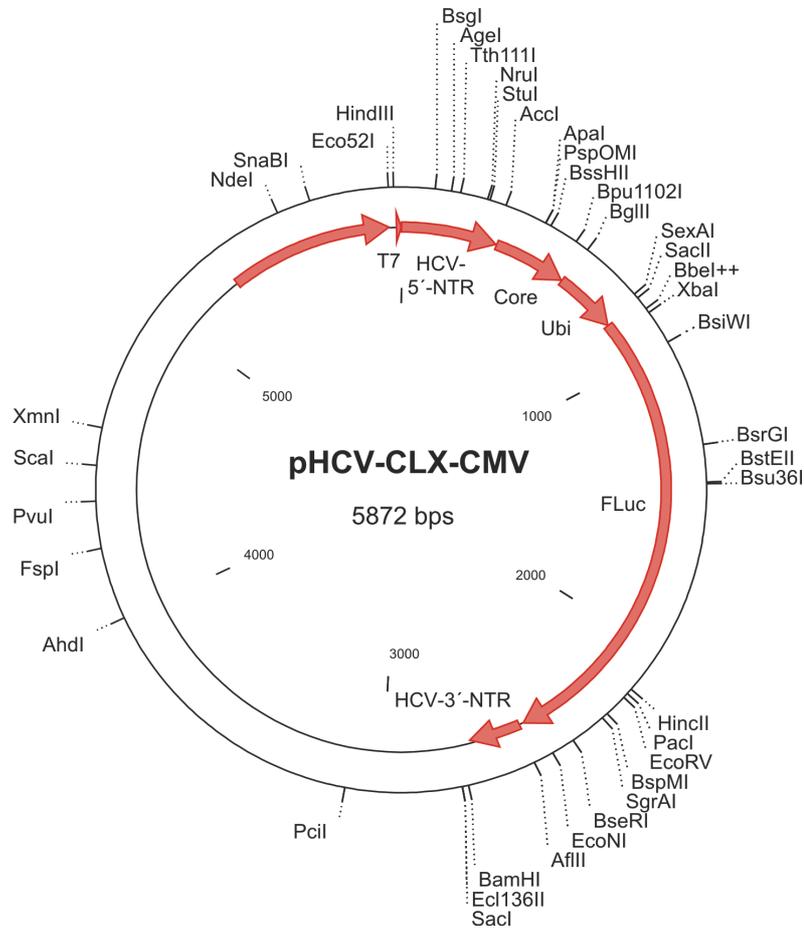


### Plasmidbeschreibung

Region	Start (nt)	Ende (nt)
HCV-5'-NTR	1	341
Core	342	914
E1	915	1490
E2	1491	2579
P7	2579	2768
NS2	2769	3419
NS3	3420	5312
NS4A	5313	5474
NS4B	5475	6257
NS5A	6258	7598
NS5B	7599	9374
HCV-3'-NTR	9375	9597
HDV-Ribozym	9598	9681
T7	12852	12870

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der HCV-Expressionskassette. Die Expressionskassette beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die 5'-nicht-translatierte Region des Hepatitis C Virus (HCV-5'-NTR), die vollständige Protein-kodierende Sequenz des HCV, die 3'-nicht-translatierte Region des HCV (HCV-3'-NTR) und die Sequenz für das Hepatitis Delta-Ribozym.

## Organisation des Plasmids pHCV-CLX-CMV kodierend für die HCV-Reporter-RNA

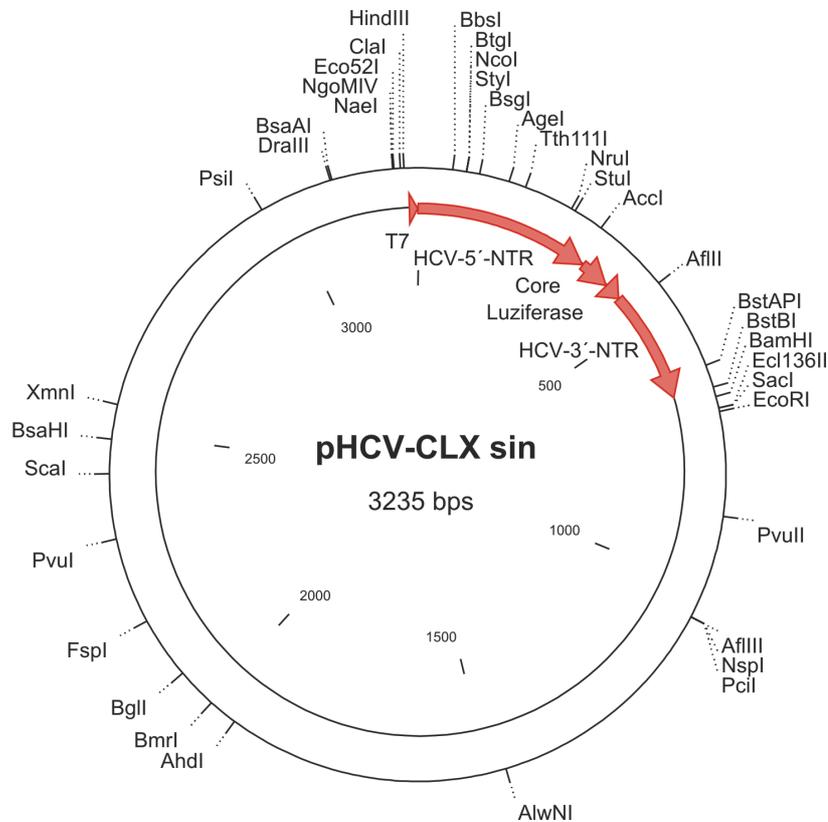


### Plasmidbeschreibung

Region	Start (nt)	Ende (nt)
HCV-5'-NTR	1	341
Core	345	606
Ubi	607	836
Luziferase (Fluc)	837	2489
HCV-3'-NTR	2490	2710
CMV	5249	5829
T7	5855	5872

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der HCV-Expressionskassette. Die Expressionskassette beginnt mit zwei Promotor-Sequenzen, dem *immediate early*-Promotor des Cytomegalievirus (CMV) und der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die 5'-nicht-translatierte Region des Hepatitis C Virus (HCV-5'-NTR), ein Teil des Core-kodierenden Sequenzbereiches (Core), eine Ubiquitin-Sequenz (Ubi), die kodierende Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (Fluc) und die 3'-nicht-translatierte Region des HCV (HCV-3'-NTR).

## Organisation des Plasmids pHCV-CLX sin kodierend für die HCV-Reporter-RNA mit verkürztem offenen Leserahmen

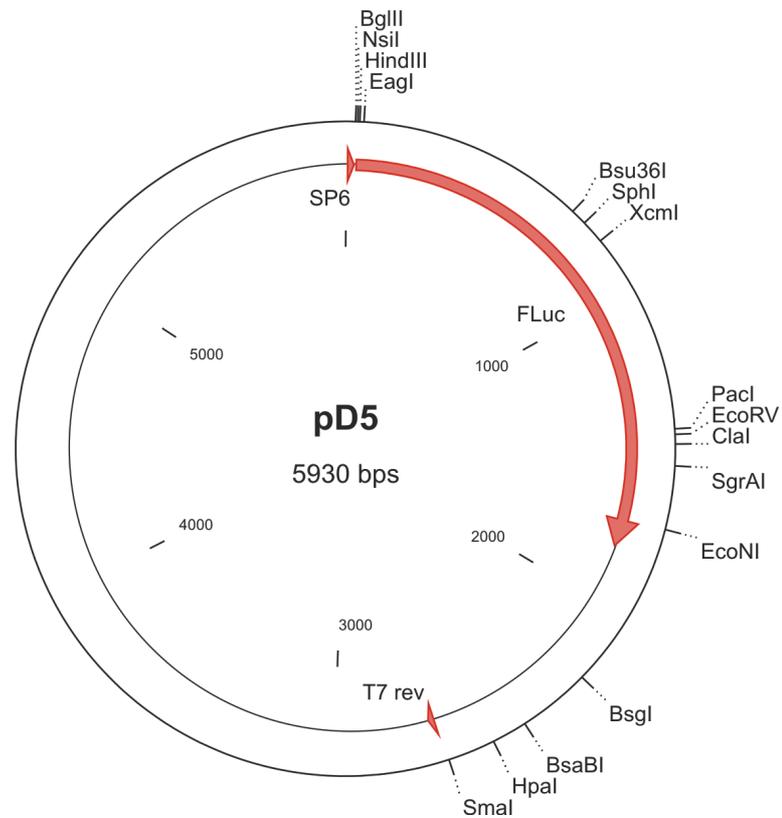


### Plasmidbeschreibung

Region	Start (nt)	Ende (nt)
HCV-5'-NTR	1	341
Core	345	402
Luziferase	403	437
HCV-3'-NTR	438	658
T7	3219	3235

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile des Reporter-Konstrukts. Das kurze Reporter-Konstrukt beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die 5'-nicht-translatierte Region des Hepatitis C Virus (HCV-5'-NTR), ein Teil des HCV Core-Proteins (Core), ein Teil der kodierenden Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (Luziferase) und die 3'-nicht-translatierte Region des HCV (HCV-3'-NTR).

## Organisation des Plasmids pD5 für die Herstellung von *Firefly*-Reporter-RNA

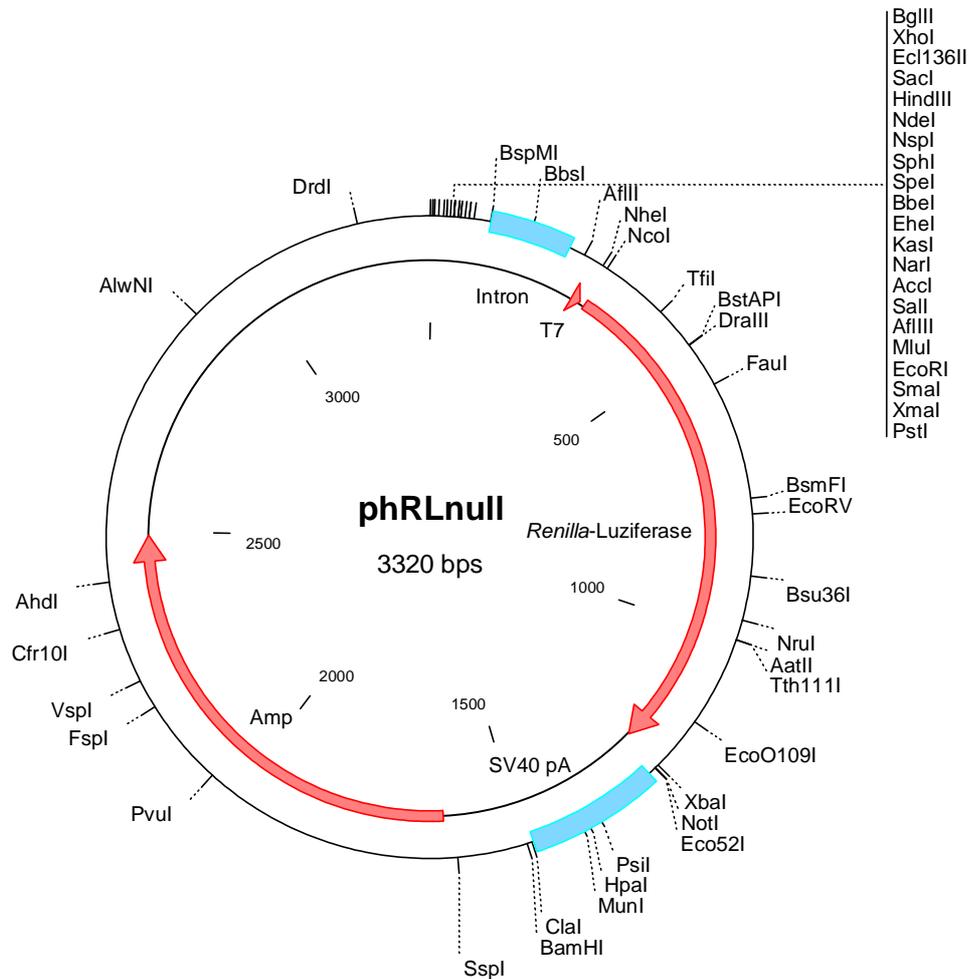


### Plasmidbeschreibung

Region	Start (nt)	Ende (nt)
Sp6	7	28
Luziferase(Fluc)	35	1757
T7 rev	2670	2689

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der Expressionskassette. Die Expressionskassette beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen Sp6 (Sp6). Danach folgt die kodierende Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (Fluc).

## Organisation des Plasmids phRLnull für die Herstellung von *Renilla*-Reporter-RNA

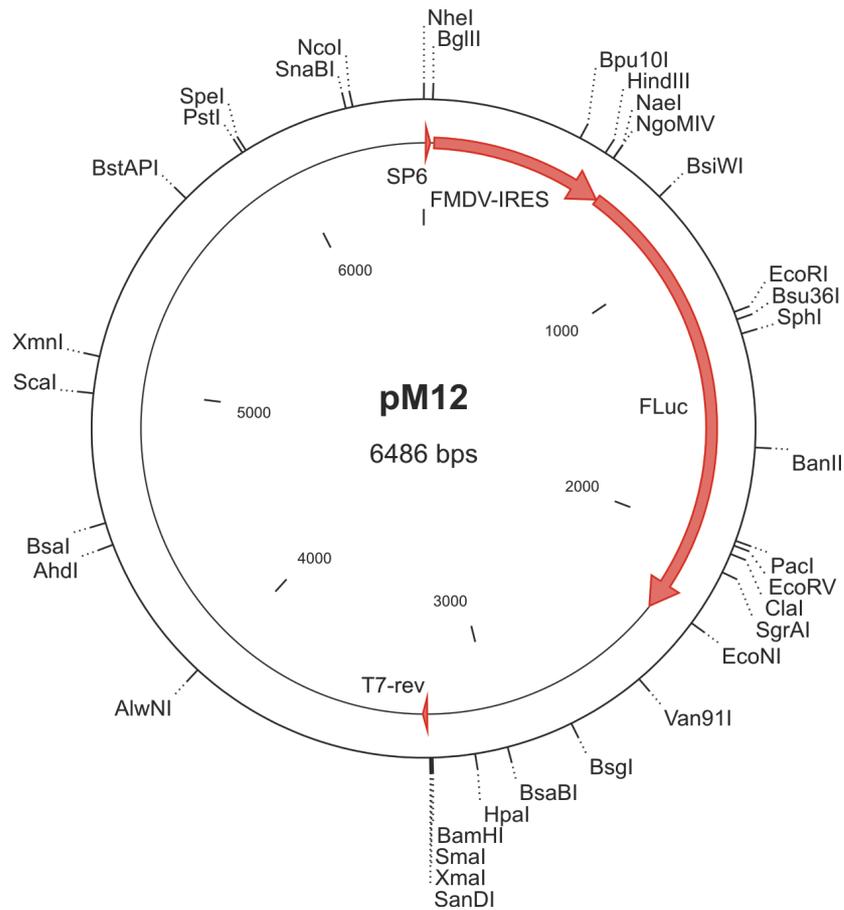


### Plasmidbeschreibung

Region	Start (nt)	Ende (nt)
Intron	101	237
T7	281	299
<i>Renilla</i> -Luziferase	309	1244
SV40 pA	1266	1487
Amp	1634	2494

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die kodierenden Sequenzen. Das Plasmid enthält die Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7) gefolgt von der kodierenden Sequenz für das *Renilla*-Luziferase-Protein (*Renilla*-Luziferase). Daran schließen die SV40-Polyadenylierungssignale (SV40pA) an, die eine effiziente Expression in Zellkultur gewährleisten sollen. Außerdem enthält das Plasmid eine Ampicillinresistenz (Amp) und ein Intron vor dem T7-Promotor.

## Organisation des Plasmids pM12 kodierend für die FMDV-Reporter-RNA

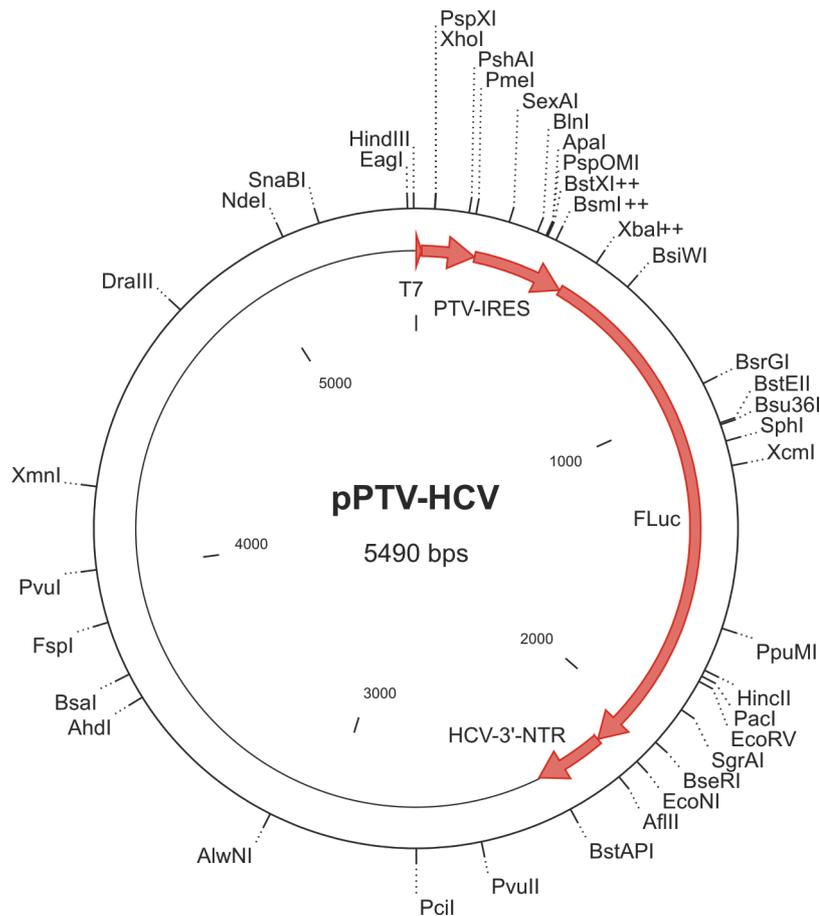


### Plasmidbeschreibung

Region	Start (nt)	Ende (nt)
Sp6	8	24
FMDV-IRES	38	663
Luziferase (Fluc)	664	2313
T7-rev	3246	3246

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der FMDV-Expressionskassette. Die Expressionskassette beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen Sp6 (Sp6). Danach folgt die Sequenz der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) des Maul- und Klauenseuche Virus (engl. *foot and mouth disease virus*, FMDV) und die kodierende Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (Fluc).

## Organisation des Plasmids pPTV-HCV kodierend für die PTV-Reporter-RNA

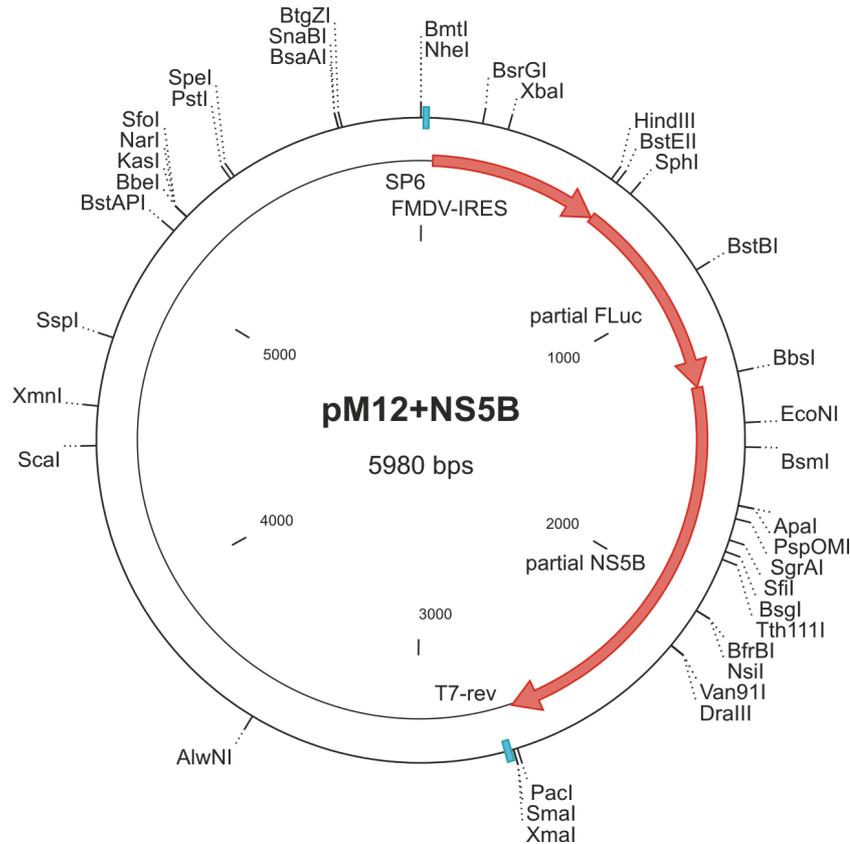


### Plasmidbeschreibung

Region	Start (nt)	Ende (nt)
T7	1	17
Linker	18	184
PTV-IRES	185	471
Luziferase (Fluc)	472	2125
HCV-3'-NTR	2126	2346

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der PTV-Expressionskassette. Die Expressionskassette beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die Sequenz der internen Ribosomen-Eintrittsstelle des Porzinen Teschovirus (PTV-IRES), die kodierende Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (Fluc) und die 3'-nicht-translatierte Region des HCV (HCV-3'-NTR).

## Organisation des Plasmids pM12+NS5B kodierend für die Northern Blot-Sonde gegen die genomische HCV-RNA

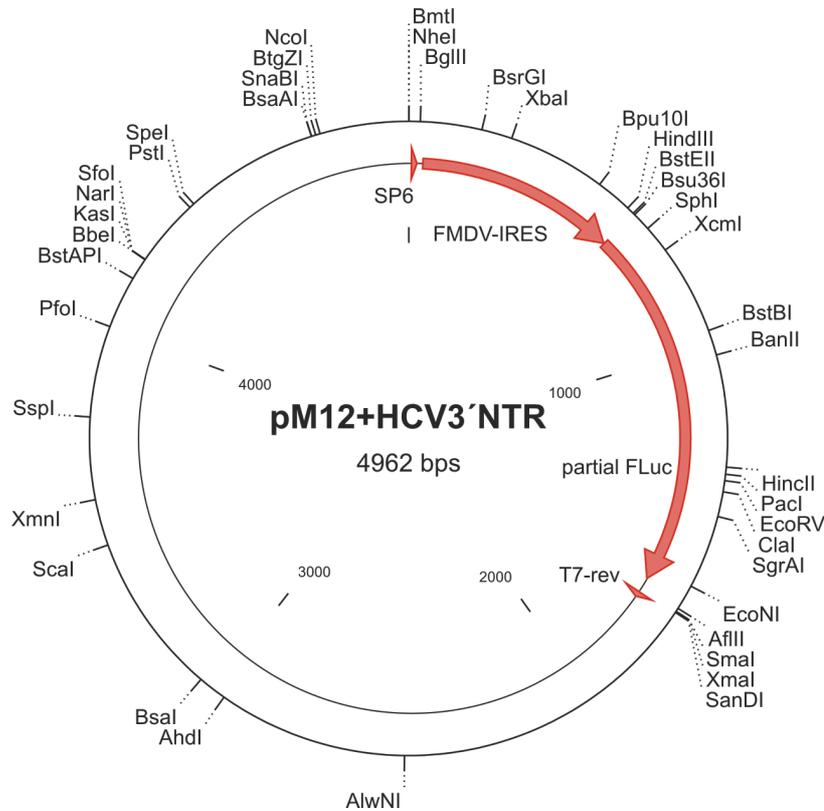


### Plasmidbeschreibung

Region	Start (nt)	Ende (nt)
Sp6	8	24
FMDV-IRES	41	618
Teil der Luziferase-Sequenz (partial Fluc)	619	1314
Teil der NS5B-Sequenz (partial NS5B)	1315	2676
T7-rev	2724	2740

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der Expressionskassette. Die Expressionskassette beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen Sp6 (Sp6). Danach folgt die Sequenz der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) des Maul- und Klauenseuche Virus (engl. *foot and mouth disease virus*, FMDV), ein Teil der kodierenden Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (partial Fluc) und ein Teil der kodierenden Sequenz für das NS5B-Protein des HCV (partial NS5B). Anschließend folgt eine Promotor-Sequenz des Bakteriophagen T7 mit reverser Orientierung der zur Herstellung von antisense-Sonden gegen die kodierende Region des NS5B-Proteins in der genomischen HCV-RNA mittels T7-Polymerase verwendet wird.

**Organisation des Plasmids pM12+HCV3'-NTR kodierend für die Northern Blot-Sonde gegen die *Firefly*-Luziferase-Sequenz in der HCV-Reporter-RNA**

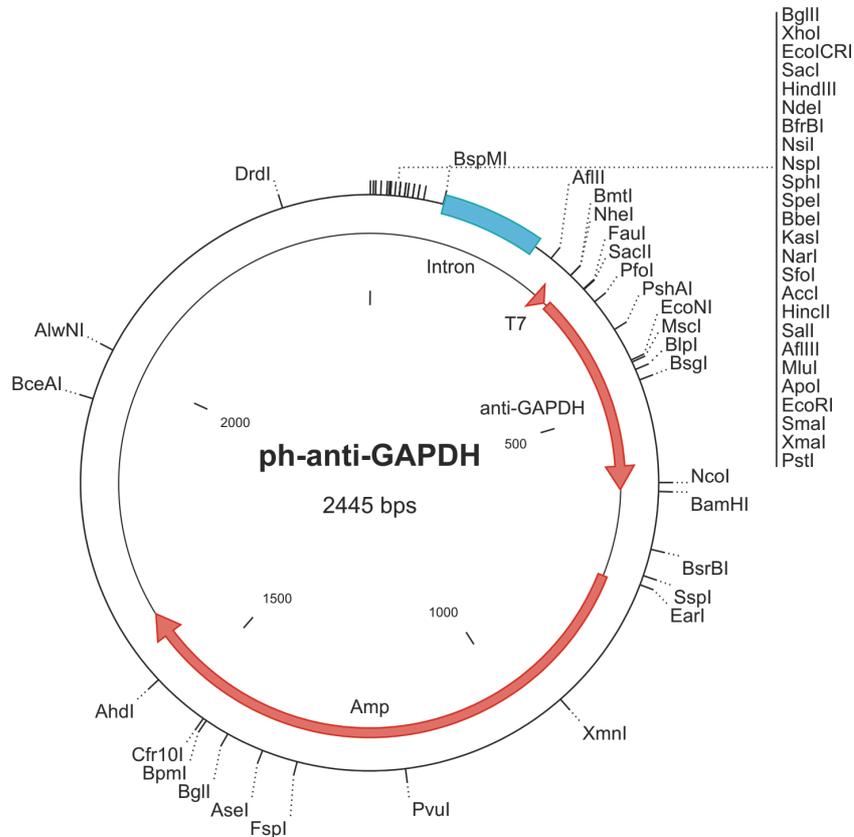


Plasmidbeschreibung

Region	Start (nt)	Ende (nt)
Sp6	8	24
FMDV-IRES	41	618
Teil der Luziferase (partial Fluc)	619	1662
T7-rev	1706	1772

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die grauen Pfeile die Bestandteile der Expressionskassette. Die Expressionskassette beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen Sp6 (Sp6). Danach folgt die Sequenz der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) des Maul- und Klauenseuche Virus (engl. *foot and mouth disease virus*, FMDV) und ein Teil der kodierenden Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (partial Fluc). Anschließend folgt eine Promotor-Sequenz des Bakteriophagen T7 mit reverser Orientierung der zur Herstellung von antisense-Sonden gegen die HCV-Reporter-RNA mittels T7-Polymerase verwendet wird.

## Organisation des Plasmids ph-anti-GAPDH kodierend für die NorthernBlot-Sonde gegen GAPDH



### Plasmidbeschreibung

Region	Start (nt)	Ende (nt)
T7	281	299
anti-GAPDH	305	622

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der Expressionskassette. Die Expressionskassette beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die Sequenz komplementär zu einem Sequenzabschnitt der Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (anti-GAPDH).

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

### Publikationen

Jünemann C, Song Y, Bassili G, Goergen D, Henke J, Niepmann M (2007) Picornavirus internal ribosome entry site elements can stimulate translation of upstream genes. *J Biol Chem* 282(1):132-141

Henke J<sup>1</sup>, Goergen D<sup>1</sup>, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 27(24):3300-3310  
(<sup>1</sup> gleichberechtigte Erstautorenschaft)

Goergen D and Niepmann M. Different mechanisms mediate stimulation of Hepatitis C Virus RNA translation by microRNA-122 in vivo and in vitro. *Eingereicht zur Veröffentlichung in Nucleic Acids Research.*

### Kongressbeiträge

Juenemann C, Song Y, Bassili G, Goergen D, Henke J, Niepmann M. Picornavirus Internal ribosomal entry sites can stimulate translation of upstream genes. Poster. *3<sup>rd</sup> European Congress of Virology, Nürnberg, September 2007*

Henke J, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Jünemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. Vortrag. *14<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September 2007*

Juenemann C, Song Y, Bassili G, Goergen D, Henke J, Niepmann M. Picornavirus Internal ribosomal entry sites can stimulate translation of upstream genes. Poster. *14<sup>th</sup> International Symposium on hepatitis C virus and related viruses, Glasgow, UK, September 2007*

Henke J, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Jünemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. Vortrag. *15<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, TX USA, Oktober 2008*

Henke J, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M. microRNA-122 enhances translation of hepatitis C virus RNA through interaction with the 5'-UTR. Poster. *19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Virology, Leipzig, März 2009*

Goergen D, Henke J, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M. The liver-specific microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA by increasing 48S complex formation efficiency. Poster. *19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Virology, Leipzig, März 2009*

Hirnet J, Goergen D, Niepmann M. Cap-independent translation of poliovirus is affected by a neuron-specific microRNA. Poster. *EMBO Conference Series on Protein Synthesis and Translational Control, Heidelberg, September 2009*

## **Danksagungen**

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und mich währenddessen begleitet und unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Albrecht Bindereif danke ich für die Übernahme des Referates im Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen und sein anhaltend großes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Niepmann für die hervorragende fachliche Betreuung dieser Arbeit, seine stetige Ansprechbarkeit und die Zeit Ideen zu entwickeln und zu diskutieren.

Meinen Dank auch an Herrn Dr. Christian G. Schüttler und Herrn Dr. Peter Friebe für die Beratung und Unterstützung bei der Durchführung einiger Versuche.

Bei Christiane Bung, Carmen Fehr, Juliane Hirnet, ganz besonders bei Jura Henke sowie bei Frau Dr. Christiane Jünemann und Herrn Dr. Yutong Song bedanke ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und einen ebenso lebhaften wie harmonischen Laboralltag. Der Dank gilt in gleicher Weise Herrn Prof. Dr. Ewald Beck und seiner Arbeitsgruppe.

Ein ganz besonders herzlicher Dank geht an Rolf und an meine Eltern, die immer für mich da waren und sind.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre:

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

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

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

Gießen, im Mai 2010

Dagmar Goergen