

Interaktionspartner der Hepatitis C Virus-RNA und Zellzykluskontrolle

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie und Chemie
an der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Carmen Fehr
Diplom-Biologin

Gießen, Mai 2011

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2007 bis April 2011 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Niepmann im Biochemischen Institut des Fachbereiches Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt.

Erstgutachter: **Prof. Dr. Albrecht Bindereif**
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 dieser Arbeit wird gezeigt, dass ein zelluläres Protein (p210) an die 5'- und 3'-UTR der HCV-RNA bindet, wenn diese Bereiche gemeinsam vorliegen. Des Weiteren wird gezeigt, dass die Effizienz der Translation der HCV-RNA in der G₂/M-Phase des Zellzyklus stark abnimmt, und die HCV-Translation durch die leberspezifische microRNA-122 (miR-122) in der G₀-, G₁- und G₂/M-Phase stimuliert wird. Dieser Befund korreliert sowohl mit der zellzyklus-abhängigen Expression der miR-122 als auch mit der Ago2-Menge in Hepatozyten.

Das hier untersuchte Hepatitis C Virus (HCV) gehört zur Familie *Flaviviridae* und ist Auslöser der NonA-NonB-Hepatitis. HCV ist ein einzelsträngiges RNA-Virus mit einem Genom in positiver Orientierung, was nach der Infektion von Hepatozyten eine direkte Translation des Genoms ermöglicht. Das im einzigen offenen Leserahmen (ORF) kodierte Polyprotein wird post-translational in die reifen Genprodukte gespalten. Der ORF ist von zwei untranslatierten Regionen (UTRs) flankiert. Am 5'-Ende bilden die Stem-loops II - IV eine RNA-Sekundärstruktur, die die Funktion einer IRES (interne Ribosomeneintrittsstelle) hat. Diese ermöglicht durch eine direkte Bindung der Ribosomen eine cap-unabhängige Translationsinitiation. Darüber hinaus wird die Translation der HCV-RNA durch die leberspezifische miR-122 stimuliert. Daneben macht sich HCV, wie andere Viren auch, einige andere zelluläre Faktoren für seine Translation und Replikation zu Nutze.

In dieser Arbeit wurden zwei Aspekte der Translation von HCV näher untersucht. Zum einen sollte ein vorher entdecktes, aber noch unbekanntes Protein mit der Größe 210 kDa (p210), welches an die HCV-RNA bindet und eventuell bei der Translation eine Rolle spielt, identifiziert und analysiert werden. Zum anderen wurde der Einfluss des Zellzyklus auf die Translation der HCV-RNA und dessen Stimulation durch die miR-122 überprüft.

Die Charakterisierung des Proteins p210 wurde mit Hilfe von UV-Crosslinks verschiedener HCV-RNA-Konstrukte mit Zellextrakten durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass dieses Protein in Huh7-, HeLa- und in Kaninchen-Retikulozytenlysate vorhanden ist, was auf eine nicht leber-spezifische Funktion hinweist. p210 interagiert mit der 5'- als auch mit der 3'-UTR von HCV und benötigt beide Regionen für seine Bindung. Allerdings konnte eine spezifische Bindung von p210 an die HCV-RNA nicht nachgewiesen werden.

Im Laufe des Zellzyklus nimmt die cap-abhängige Translation von der G₀- zur G₂/M-Phase hin ab. Auch die HCV-IRES-Aktivität wird in ähnlicher Weise reduziert. Die Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 konnte in der G₀-, G₁- und G₂/M-Phase sehr gut, in der S-Phase dagegen kaum nachgewiesen werden. Interessanterweise korreliert im Laufe des Zellzyklus das Ausmaß der Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 mit der Menge an miR-122 und mit der Menge an Ago2-Protein in der Zelle. Damit zeigen die Ergebnisse, dass HCV seine Translation optimal an die in Hepatozyten herrschenden Bedingungen angepasst hat.

Summary

In this study a protein (p210) was shown to bind to the 5'- and 3'-end of HCV-RNA if these untranslated regions are both available at the same time. Moreover, the efficiency of translation of the HCV-RNA is strongly reduced in the G₂/M phase of the cell cycle. The stimulation of HCV translation by the liver-specific microRNA-122 (miR-122) is highest in G₀-, G₁- und G₂/M-phase. This result correlates with the cell cycle dependent expression of the miR-122 and of Ago2 protein in hepatocytes.

The Hepatitis C virus belongs to the family of *Flaviviridae* and is the main causative agent of NonA-NonB hepatitis. The virus genome consists of a single stranded RNA with positive orientation that allows direct cap-independent translation after infection of hepatocytes. The HCV genome consists of one open reading frame coding one polyprotein that is processed after translation to the mature proteins. The open reading frame is flanked by two untranslated regions. At the 5'-end a highly structured region including stem-loop II - IV forms an IRES (internal ribosome entry site). This structure allows direct binding of ribosomes without the need for any eukaryotic initiation factors. Moreover, HCV translation is stimulated by the liver-specific miR-122. As other viruses, HCV also uses some cellular proteins for its translation and replication. Since many eukaryotic proteins bind to the HCV-RNA, there may be more unidentified proteins that interact with the HCV-RNA and regulate its translation.

In this study two aspects of HCV translation were analyzed. On the one hand, the interaction of an unknown 210 kDa protein with the HCV RNA was characterized. On the other hand, the influence of the cell cycle on HCV translation and on translation stimulation by miR-122 was investigated.

Characterization of the protein p210 was done by UV-crosslinks using various HCV-RNA constructs and various cell lysates. p210 was identified in Huh7-, HeLa- and rabbit reticulocyte lysate. Thus, p210 may have a general function but is not liver-specific. Binding of p210 requires both untranslated regions of the HCV-RNA. However, specific binding of p210 to the HCV-RNA could not be observed.

The HCV-IRES translation efficiency as well as the cap-dependent translation efficiency is decreased in the G₂/M-phase of the cell cycle. Stimulation of HCV-RNA translation by miR-122 is highest in the G₀-, G₁- and G₂/M-phases, whereas little stimulation was detected in the S-phase. Interestingly, the extent of this stimulation roughly correlates with the levels of microRNA-122 during different cell cycle phases. Moreover, also the expression of Ago2, a miRNP (microRNA protein complex) component correlates with the extent of HCV translation stimulation by miR-122 during individual cell cycle stages. Thus, the regulation of HCV translation appears optimally adapted to the conditions in hepatocytes in normal liver tissue.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Summary

1	Einleitung	1
1.1	Hepatitis C Virus.....	1
1.1.1	Infektionszyklus des HCV.....	2
1.1.2	Struktur und Genom.....	4
1.2	Molekulare Mechanismen der Translation.....	6
1.2.1	Cap-abhängige Initiation der Translation.....	6
1.2.2	IRES-abhängige Initiation der Translation.....	8
1.3	Zusätzliche zelluläre Faktoren, die mit der HCV-RNA interagieren.....	11
1.4	microRNAs.....	12
1.4.1	Biogenese von microRNAs.....	13
1.4.2	Die Wirkung der miR-122 auf die Translation der HCV-RNA.....	15
1.5	Der Zellzyklus.....	16
1.5.1	Cyclin-abhängige Kinasen und Cycline.....	17
1.5.2	CDK-Inhibitoren mit Fokus auf p27 ^{Kip1}	19
1.5.3	Einfluss von HCV und microRNAs auf den Zellzyklus.....	20
1.6	Ziele dieser Arbeit.....	22
2	Ergebnisse und Diskussion	23
Teil I		
2.1	Proteinanalyse durch UV-Crosslink-Experimente.....	23
2.1.1	Konstrukte.....	23
2.1.2	UV-Crosslinks.....	25
2.1.2.1	UV-Crosslinks mit Huh7-Extrakt.....	25
2.1.2.2	UV-Crosslink: Vergleich verschiedener Zell-Extrakte.....	28
2.1.2.3	UV-Crosslinks zum Nachweis von p210 in verschiedenen Lysaten.....	29
2.1.3	Auftrennung der Proteine des Huh7-Extrakts.....	31
2.1.3.1	Auswahl der Säulenmatrix.....	32
2.1.3.2	Auftrennung bei verschiedenen pH-Werten.....	33
2.1.4	Kompetitions-Crosslinks mit Huh7-Extrakt.....	34

2.2	Diskussion Teil I	38
2.2.1	Interaktion der HCV-RNA mit zellulären Proteinen.....	38
2.2.2	Analyse der Bindung von p210 an die HCV-RNA.....	38
2.2.3	p210 wird nicht Hepatoyten-spezifisch exprimiert.....	41
2.2.4	Eine spezifische Bindung von p210 an die HCV-RNA konnte nicht nachgewiesen werden.....	41
 Teil II		
2.3	FACS-Analyse von Huh7- und HeLa-Zellen nach entsprechender Synchronisierungsmethode.....	43
2.3.1	Synchronisierung der Zellen in der G ₂ /M-Phase durch Nocodazol-Behandlung.....	44
2.3.2	Synchronisierung der Zellen in der G ₂ /M-Phase durch Nocodazol und „Shake off“.....	46
2.3.3	Synchronisierung der Zellen in der G ₀ /G ₁ -Phase durch Kontaktinhibition.....	47
2.3.4	Synchronisierung der Zellen in der S-Phase durch doppelten Thymidin-Block.....	49
2.3.5	Synchronisierung der Zellen in der S-Phase durch Nocodazol (mit „Shake off“) und Thymidin-Behandlung.....	50
2.4	Einfluss der Zellzyklusphasen auf die Translation von HCV und auf den stimulatorischen Effekt der miR-122.....	52
2.4.1	Transfektionen in synchronisierten Huh7- und HeLa-Zellen.....	52
2.4.2	Vergleich der Translationseffizienz in unterschiedlichen Zellzyklusphasen.....	53
2.4.2.1	Die Effizienz der Cap- und IRES-abhängigen Translation in verschiedenen Zellzyklusphasen in Huh7-Zellen.....	54
2.4.2.2	Die Effizienz der Cap- und IRES-abhängigen Translation in verschiedenen Zellzyklusphasen in HeLa-Zellen.....	56
2.4.3	Effekt der microRNA-122 auf den HCV-Reporter in unterschiedlichen Zellzyklusphasen.....	58
2.4.3.1	Einfluss der miR-122 auf die HCV-Translation in verschiedenen Zellzyklusphasen in Huh7-Zellen.....	58
2.4.3.2	Einfluss der miR-122 auf die HCV-Translation in verschiedenen Zellzyklusphasen in HeLa-Zellen.....	60
2.4.4	Unterschiedliche Expression der microRNA-122 innerhalb des Zellzyklus.....	61
2.4.5	Zellzyklus-abhängige Expression weiterer Faktoren in Bezug auf die Stimulation der HCV-Translation.....	63

2.5	Diskussion Teil II	65
2.5.1	Optimierung der Zellsynchronisierung.....	65
2.5.2	Normalisierungsprobleme bei Zellzyklus-Experimenten.....	67
3	Schlussdiskussion	70
3.1	Die Effizienz von Cap- und IRES-abhängiger Translation geht in der Mitose-Phase am stärksten zurück.....	70
3.2	HCV und Zellzykluskontrolle.....	72
3.3	Zellzyklus-abhängige Stimulation der Translation der HCV-RNA durch die leberspezifische miR-122.....	73
3.4	Welche Faktoren sind an der Stimulation der Translation von HCV durch die miR-122 noch beteiligt?.....	75
4	Material und Methoden	78
4.1	Material	78
4.1.1	Material für Zellkultur und mikrobiologische Arbeiten.....	78
4.1.1.1	Bakterienstämme und Zelllinien.....	78
4.1.1.2	Zellextrakte.....	78
4.1.1.3	Nährmedien für die Mikrobiologie.....	78
4.1.2	Chemikalien für die Zellkultur und mikrobiologische Arbeiten.....	79
4.1.3	Material für molekularbiologische Arbeiten.....	79
4.1.3.1	Nukleinsäuren.....	79
4.1.3.1.1	Plasmide.....	79
4.1.3.1.2	Oligonukleotide.....	80
4.1.3.1.3	Nukleotide.....	81
4.1.3.2	Enzyme.....	81
4.1.3.2.1	Enzyme zur Modifikation von DNA, RNA und Proteinen.....	81
4.1.3.3	Größenstandards.....	81
4.1.3.3.1	DNA Größenstandard.....	81
4.1.3.3.2	Proteingrößenstandard.....	82
4.1.3.4	Antikörper.....	82
4.1.3.5	Kits.....	82
4.1.4	Andere Chemikalien und Reagenzien.....	83
4.1.5	Geräte.....	84
4.1.6	Verbrauchsmaterialien.....	85

4.2	Methoden	86
4.2.1	Molekularbiologische Methoden	86
4.2.1.1	Gelelektrophorese	86
4.2.1.1.1	Agarosegel-Elektrophorese	86
4.2.1.1.2	Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese	86
4.2.1.2	Aufreinigung, Fällung und Konzentrierung von DNA	87
4.2.1.2.1	Präparation von Plasmid-DNA	87
4.2.1.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	87
4.2.1.2.3	Aufreinigung von DNA über präparative Agarosegele	88
4.2.1.2.4	Proteinase K-Verdau	88
4.2.1.2.5	Phenol-Chloroform Extraktion	89
4.2.1.2.6	Alkoholfällung	89
4.2.1.3	RNA-Synthese	90
4.2.1.3.1	Standard <i>in vitro</i> -Transkription	90
4.2.1.3.2	<i>In vitro</i> -Transkription radioaktiv markierter RNA	90
4.2.1.3.3	Synthese von RNA mit 5'-Cap-Nukleotid und 3'-Poly(A)-Schwanz	91
4.2.1.4	Präparation und Aufreinigung von RNA	92
4.2.1.4.1	DNase I-Verdau	92
4.2.1.4.2	Aufreinigung von RNA	92
4.2.1.4.3	RNA-Extraktion aus Zellen	92
4.2.1.4.4	Herstellung von microRNA-Duplexen	93
4.2.1.5	Northernblot	93
4.2.1.6	UV-Crosslink von RNA an Protein	94
4.2.2	Autoradiographie	95
4.2.3	Proteinbiochemische Methoden	96
4.2.3.1	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	96
4.2.3.2	Westernblot	96
4.2.3.3	Proteinaufreinigung mit Source 15Q und 15S	97
4.2.4	Zellkulturtechniken	98
4.2.4.1	Kultivierung adhärenter eukaryotischer Zellen	98
4.2.4.2	Passagieren und Mediumwechsel bei adhärennten Zellen	98
4.2.4.3	Einfrieren von Zellen	99
4.2.4.4	Auftauen von Zellen	99
4.2.4.5	Aussäen adhärenter Zellen	99
4.2.4.6	Herstellung von cytoplasmatischem Extrakt	100
4.2.4.6.1	Lysat für UV-Crosslinks	100
4.2.4.6.2	Lysat für Westernblots	100
4.2.4.6.3	Lysat für die Luziferase-Messung	101
4.2.4.7	Transfektion von RNA in eukaryotische Zellen	101
4.2.4.8	Detektion der Reporterproteine <i>Firefly</i> - und <i>Renilla</i> -Luziferase	102

4.2.4.9	Messung der Metabolischen Aktivität durch WST-1.....	102
4.2.4.10	Proteinbestimmung durch UV-Absorption.....	103
4.2.4.11	Zellsynchronisierung.....	103
4.2.4.11.1.1	G ₂ /M-Phase: Nocodazol-Block mit „Shake off“.....	103
4.2.4.11.1.2	S-Phase: Doppelter Thymidin-Block.....	103
4.2.4.11.1.3	S-Phase: Kombination von Nocodazol (mit “Shake off”) und Thymidin-Block.....	104
4.2.4.11.1.4	G ₀ /G ₁ : Kontaktinhibition.....	104
4.2.4.12	Propidiumiodid-Färbung.....	104
4.2.4.13	Fluorescence activated cell sorting (FACS).....	105
4.2.5	Mikrobiologische Methoden.....	105
4.2.5.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> XL1-blue.....	105
4.2.5.2	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> XL1-blue.....	106
4.2.5.3	Transformation elektrokompetenter Bakterienzellen.....	106
4.2.5.4	Herstellung von Glycerol-Stocks.....	107
 Literaturverzeichnis.....		 108
 Abkürzungen und Glossar.....		 120
 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....		 124
 Anhang.....		 126
 Wissenschaftliche Veröffentlichungen.....		 133
 Danksagung.....		 134
 Eidesstattliche Erklärung.....		 135

1 Einleitung

Viren sind kleine Partikel mit einer Größe von 20 – 400 nm. Ihre Erbinformation besteht entweder aus DNA oder RNA und ist in einer Proteinhülle, dem so genannten Kapsid, verpackt. Ebenso gibt es Viren, die zusätzlich eine äußere Membran zellulären Ursprungs besitzen, die zum Teil virale sowie zelluläre Glykoproteine beinhaltet. Viren besitzen keine eigenen Energie-bildenden Systeme und keinen eigenen Proteinsyntheseapparat. Daher sind sie bei ihrer Vermehrung auf lebende Zellen angewiesen. Ist ein Virus in eine Zelle gelangt, benutzt es die Wirtszelle, um neue infektiöse Partikel zu produzieren. Diese können entweder mit oder ohne neue Lipidhülle freigesetzt werden, welche zusätzlich Proteine und Kohlenhydrate der Wirtszellmembran beinhaltet, da sich das Virus bei der Knospung (Budding) von der Zelle abschnürt und somit einen Teil der Wirtszellmembran mitnimmt. Neben Viren, die durch Abknospung von der Wirtszelle entstehen, gibt es auch lytische Viren.

Des Weiteren sind Viren, auch obligat intrazelluläre Parasiten genannt, in der Lage, zelluläre Prozesse umzusteuern und für den optimalen Verlauf ihrer Vermehrung zu modifizieren. Sie infizieren Pflanzen, Tiere, Bakterien (Bakteriophagen) und sogar Viren selbst (Virophagen).

In dieser Arbeit wird das Hepatitis C Virus (HCV) untersucht, welches der wichtigste Erreger der chronischen Hepatitis ist und spezifisch die Leber befällt.

1.1 Hepatitis C Virus

Bei dem Hepatitis C Virus (HCV) handelt es sich um ein Flavivirus, welches der Auslöser der NonA-NonB-Hepatitis ist. Laut WHO (engl. World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation) sind etwa 3 % der Weltbevölkerung infiziert. Eine persistierende Infektion der Leber wird durch den meist asymptomatischen Verlauf begünstigt. Bei etwa 80 % der Infizierten entwickelt sich eine chronische Hepatitis, die sich aber in nur 10 - 20 % der Fälle zu einer Leberzirrhose oder einem hepatozellulärem Karzinom entwickelt (Seeff, 2002). Identifiziert und beschrieben wurde HCV im Jahre 1989 (Choo *et al.*, 1989), wonach das Virus aufgrund seiner molekularen Eigenschaften als einziges Mitglied des Genus Hepacivirus in die Familie der *Flaviviridae* eingeordnet wurde. Zu dieser Familie gehören neben den klassischen Flaviviren (zum Beispiel das Gelbfiebervirus) und Pestiviren (zum Beispiel das Bovine Virusdiarrhoe-Virus) aber auch die noch nicht zugeordneten GB-Viren. Dabei ist

HCV enger mit den GB-Viren und den Pestiviren verwandt als mit den klassischen Flaviviren, was an ihrer 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) zu erkennen ist (Simons *et al.*, 1996). Aufgrund einer starken Heterogenität der HCV-Isolate aus Patienten werden diese nach Genotypen und Subtypen klassifiziert (Simmonds *et al.*, 2005). Die genomische Variabilität kommt dadurch zustande, dass zum einen die RNA-abhängigen RNA-Polymerasen eine hohe Fehlerrate aufweisen (Lohmann *et al.*, 2000) und zum anderen durch das Vorkommen homologer Rekombination.

1.1.1 Infektionszyklus des HCV

Das Hepatitis C Virus ist ein einzelsträngiges RNA-Virus mit einem positiv orientiertem RNA-Genom (ss(+)-RNA). Dieses Virus repliziert im Zytoplasma von Hepatozyten. Für die Produktion viraler Proteine benutzt das Virus den zellulären Translationsapparat, wohingegen virale Proteine wie die RNA abhängige RNA-Polymerase vom viralen Genom selbst kodiert werden.

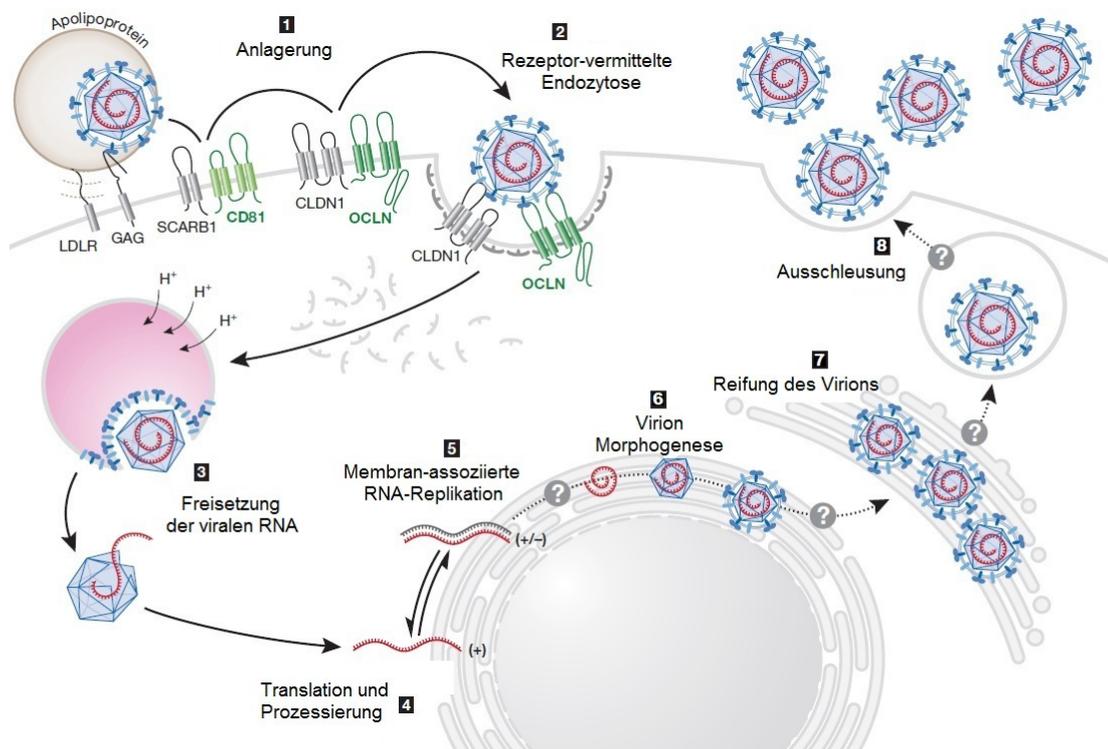


Abb. 1 Vermehrungszyklus von HCV

Das HCV-Partikel lagert sich über verschiedene Oberflächenmoleküle und Rezeptoren an der Zielzellmembran an. Nach der Rezeptor-vermittelten Endozytose erfolgt die Freisetzung des RNA-Genoms in das Zytoplasma. Die IRES-vermittelte Translation und die Prozessierung des Polyproteins finden anschließend am Endoplasmatischen Retikulum statt. Danach bilden sich die Replikationskomplexe im so genannten „Membranous Web“, und die HCV-RNA wird durch die Synthese negativ und positiv orientierter RNA amplifiziert. Nachdem die Hüllproteine modifiziert wurden und alles zu einem Virion verpackt wurde, gelangt das HCV-Partikel vermutlich über den sekretorischen Weg aus der Wirtszelle. Die Darstellung wurde modifiziert nach Ploss u. Rice, 2009.

Somit ist der erste Schritt nach dem Eintritt in die Wirtszelle die Translation des eigenen viralen Genoms zur Synthese viraler Proteine. Danach findet die Vervielfältigung des HCV-Genoms statt, das anschließend nach einer Verpackung in Virionen wahrscheinlich sekretorisch aus der Zelle geschleust wird. Der Vermehrungszyklus des HCV inklusive der Protein-Interaktionen ist in Abbildung 1 dargestellt.

Einige Zelloberflächenproteine sind an der Anlagerung von HCV an die Wirtszelle beteiligt. So gibt es beispielsweise eine Wechselwirkung des viralen Hüllproteins E2 mit dem zellulären Rezeptor CD81 (Pileri *et al.*, 1998). Darüber hinaus sind auch Proteine wie Claudin-1 (Evans *et al.*, 2007), Occludin (Liu *et al.*, 2009), Glykosaminoglykane (Barth *et al.*, 2003) und interzelluläre Adhäsionsmoleküle (Gardner *et al.*, 2003) an der Anlagerung von HCV an die Wirtszelle verantwortlich. Da HCV mit LDL-Partikeln assoziiert ist (André *et al.*, 2002), gibt es auch die Möglichkeit, dass sich das Virus über die Interaktion mit dem LDL-Rezeptor an die Wirtszellmembran anlagert (Wünschmann *et al.*, 2000). Danach erfolgt der Eintritt in die Wirtszelle über eine Clathrin-vermittelte Endozytose (Blanchard *et al.*, 2006) und die Freisetzung des viralen Genoms ins Zytoplasma. Dies geschieht durch eine pH-abhängige Verschmelzung der Virushülle mit der Endosomenmembran unter Einbeziehung der viralen Proteine E1 und E2 (Lavillette *et al.*, 2007 und Garry u. Dash, 2003). Da die HCV-RNA eine positive Polarität hat, kann diese direkt von zellulären Ribosomen am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert werden. Das entstandene Polyprotein wird dann co- und posttranslational von Signalpeptidasen und den viralen Proteasen in funktionelle Proteine gespalten (Bartenschlager u. Lohmann, 2000). Das virale Protein NS4B zusammen mit NS5B fördert nun die Bildung membranöser Vesikel, dem so genannten „membranous web“. Dieses Membrangeflecht besteht aus Teilen der ER-Membran und LDs (engl. „Lipid Droplets“) und ist der zelluläre Bereich, in dem die weitere Replikation des HCV stattfindet (Bartenschlager *et al.*, 2010 und Egger *et al.*, 2002). Bei der Replikation der HCV-RNA wird die genomische RNA als Matrize für die Synthese von RNA mit negativer Polarität verwendet. Diese Form der RNA dient dann wiederum als Matrize für die Synthese neuer einzelstängiger RNA mit positiver Polarität, welche repliziert, translatiert oder in neue Viruspartikel verpackt werden kann (Bartenschlager u. Lohmann, 2000).

Die Verpackung der viralen RNA wird durch eine Interaktion des viralen Core-Proteins mit dem viralen Genom initiiert und führt zur Bildung des viralen Kapsids (Kunkel *et al.*, 2001). Dieses wird durch Knospung von der ER-Membran, welche die viralen Proteine E1 und E2 beinhaltet, umhüllt und vermutlich auf sekretorischem Weg aus der Zelle geschleust.

1.1.2 Struktur und Genom

Das Genom des Hepatitis C Virus besteht aus 9600 Basen, durch die ein einziges Polyprotein kodiert wird. Durch die co- und posttranslationale Prozessierung des Polyproteins entstehen die jeweiligen Nicht-Struktur (NS)-Proteine und die Strukturproteine. Das offene Leseraster ist von zwei nicht-kodierenden Regionen (engl. untranslated regions, UTRs) am 5'- und 3'-Ende begrenzt, welche die *cis*-Signale für die Translation bzw. die Replikation der viralen RNA beinhalten (Bartenschlager *et al.*, 2004 und Appel *et al.*, 2006). In Abbildung 2 ist das HCV-Genom mit seinen kodierten Proteinen dargestellt.

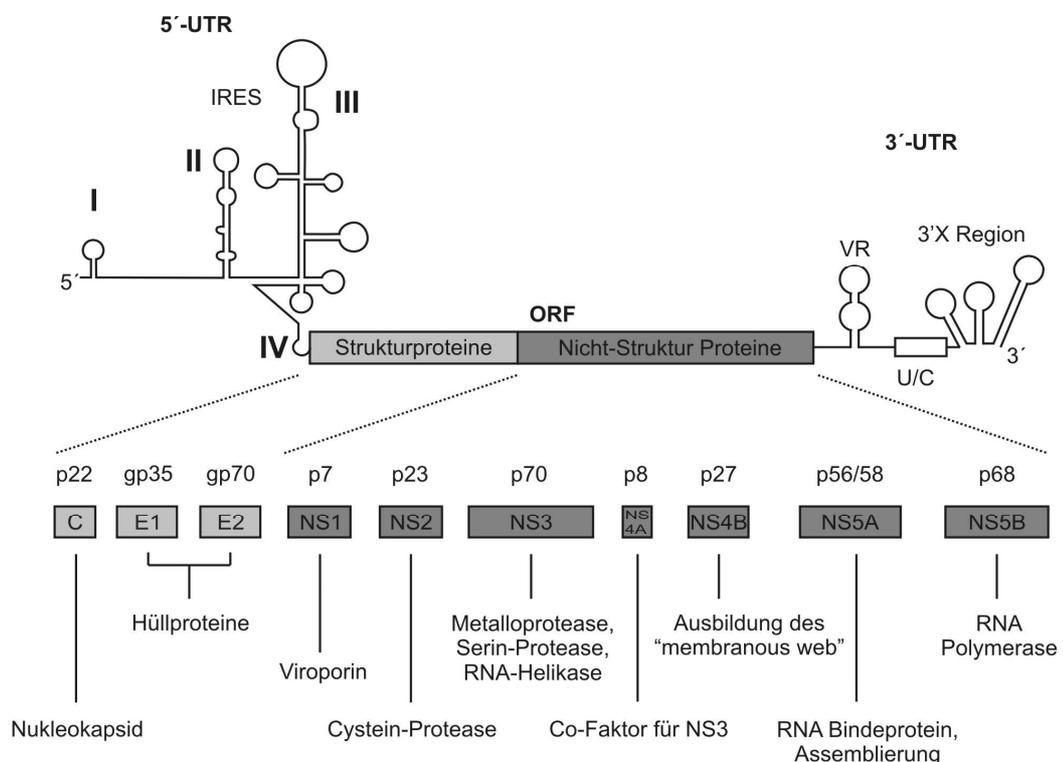


Abb. 2 Schema des HCV-Genoms

Das HCV-Genom hat eine Länge von 9,6 kb. Es enthält ein offenes Leseraster (engl. open reading frame, ORF), welches ein Polyprotein kodiert. Flankiert wird der ORF von zwei nicht-kodierenden Regionen (engl. untranslated regions, UTRs). Am 5'-Ende bilden die Stem-loops II - IV die so genannte IRES, die eine cap-unabhängige Translation des HCV-Genoms ermöglicht. Die 3'-UTR besteht aus einer Variablen Region (VR), einem Poly(U/C)-Trakt und der 3'X-Region mit drei Stem-loops.

Das vom ORF kodierende Polyprotein wird co- und posttranslational in 10 funktionstüchtige Proteine gespalten: die Strukturproteine "Core" (C), E1 und E2 (Envelope) und die Nicht-Struktur Proteine NS1 - 5. Die Funktionen der Proteine sind mit aufgelistet.

Die Stem-loops I und II in der 5'-UTR sind an der RNA-Replikation beteiligt. Teilweise überlappend bilden die Stem-loops II, III und IV eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (engl. Internal ribosome entry site, IRES), die eine cap-unabhängige Translation ermöglicht (Honda *et al.*, 1996). Hier kann sich ein stabiler Prä-Initiationskomplex bilden, indem es der 40S Ribosomen-Untereinheit möglich ist, ohne eukaryotische Initiationsfaktoren direkt an die

IRES zu binden (Pestova u. Hellen, 1999). Eine ausführlichere Darstellung der Translationsinitiation befindet sich in Kapitel 1.2.2.

Die viral kodierten Proteine werden wie oben erwähnt zunächst als Polyprotein translatiert und durch proteolytische Spaltung am Endoplasmatischen Retikulum freigesetzt. Bei den Strukturproteinen handelt es sich um das Core-Protein und die Hüllproteine E1 und E2. Das Core-Protein interagiert über basische Aminosäuren mit der viralen RNA und bildet damit das Kapsid (Kunkel *et al.*, 2001). Außerdem assoziiert es mit den so genannten „Lipid Droplets“ und könnte somit eine Rolle bei der Entwicklung von Steatose (Fukasawa, 2010) oder dem hepatozellulären Karzinom spielen (McLauchlan, 2000). Die Hüllproteine E1 und E2 sind als Typ I-Membranproteine stark glykosyliert und bilden Heterodimere. Das E2-Protein trägt zu der Anheftung des Viruspartikels an die Wirtszelle bei (Pileri *et al.*, 1998) wohingegen das E1-Protein bei der Adsorption und Freisetzung der viralen RNA beteiligt ist (Garry u. Dash, 2003). Die zweite Proteinart, die von HCV kodiert wird, sind die Nicht-Strukturproteine (NS1 - 5). NS1 oder auch p7 genannt ist ein kleines Transmembranprotein (7 kDa), das möglicherweise einen Calcium-Ionenkanal darstellt und in die Familie der Viroporine einzuordnen ist (Griffin *et al.*, 2003). NS2 ist ebenfalls ein Transmembranprotein, das nicht glykosyliert ist und zwei Signalsequenzen aufweist, die für die Assoziation mit der ER-Membran verantwortlich sind (Yamaga u. Ou, 2002). NS2 bildet zusammen mit dem amino-terminalen Bereich von NS3 (NS2-3 Protease) eine Zink-abhängige Metalloprotease, welche die Verbindung zwischen NS2 und NS3 spaltet (Chevaliez u. Pawlotsky, 2006). Nach dieser Spaltung verliert NS2 seine Aktivität und wird im Proteasom degradiert (Franck *et al.*, 2005). Das NS3-Protein hat in seiner N-terminalen Region eine Serinprotease-Aktivität, die mit NS4A als Co-Faktor alle weiteren Spaltungen am Polyprotein vornimmt (Bartenschlager *et al.*, 2010 und Bartenschlager *et al.*, 2011). In der C-terminalen Region besitzt NS3 eine Helikase- und NTPase-Aktivität, die für die RNA-Replikation benötigt wird (Bartenschlager *et al.*, 2011). NS4B ist ein integrales Membranprotein und in der ER-Membran lokalisiert (Lundin *et al.*, 2003). Dadurch induziert es die Ausbildung des „membranous web“ als Gerüst für die Bildung des Replikationskomplexes (Egger *et al.*, 2002). Das NS5A-Protein spielt als RNA-bindendes Protein eine Rolle bei der Replikation (Brass *et al.*, 2006) und dem Zusammenbau neuer Virione (Appel *et al.*, 2008). Für die RNA-Replikation wird das NS5B als RNA-abhängige RNA-Polymerase exprimiert.

Die 3'-UTR beinhaltet drei Elemente, die an der Replikation des HCV-Genoms beteiligt sind (Friebe u. Bartenschlager, 2002): die Variable Region (30-50 nts), der Poly(U/C)-Trakt (20-200 nts) und die hoch konservierte 3'X-Region mit drei Stem-loops (s. Abb. 2). Es wurde gezeigt, dass die 3'-UTR neben der

Replikation auch die Translation durch die IRES stimuliert (Song *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 1998 und Bradrick *et al.*, 2006). Um dies jedoch zu beobachten, muss die Reporter-RNA monocistronisch sein, und die 3'-UTR benötigt ein exaktes 3'-Ende (Song *et al.*, 2006). Möglicherweise ist dies ein Zeichen für eine direkte Interaktion zwischen dem 3'- und 5'-Ende der HCV-RNA, oder es binden zelluläre Faktoren, die ähnlich dem PABP eine Brücke zwischen dem Poly(A)-Schwanz und dem 5'-Cap der messenger RNA (mRNA) bilden.

1.2 Molekulare Mechanismen der Translation

1.2.1 Cap-abhängige Initiation der Translation

Bei der Initiation der Translation (Abb. 3) werden 80S Ribosomen am Startcodon zusammengefügt und die Translation wird gestartet. Dieser Prozess besteht aus zwei Stufen: der Bildung des Initiationskomplexes und der anschließenden Zusammenlagerung mit der 60S Ribosomenuntereinheit.

So wird zuerst der Prä-Initiationskomplex gebildet, bestehend aus der 40S Ribosomenuntereinheit, eIF3, eIF1 und eIF2 zusammen mit der Initiator-tRNA (Methionyl-tRNA) (Maitra *et al.*, 1982). Hinzu kommt eIF5, das an eIF2 gebunden ist. Danach wird die mRNA „aktiviert“, indem der eIF4F-Komplex, bestehend aus eIF4A, eIF4E, eIF4G und dem Co-Faktor eIF4B, an das Cap der RNA bindet (Merrick, 1992 und Jackson *et al.*, 2010) und die Sekundärstruktur der RNA entwunden wird. Dadurch kann dann der Prä-Initiationskomplex an die mRNA binden und startet das „Scanning“ vom 5'-Ende beginnend hin zum Startcodon (AUG). Wurde das Startcodon vom 48S-Komplex erkannt, löst sich eIF1 ab, wodurch eIF5 das von eIF2 gebundene GTP hydrolysieren kann (Unbehauen *et al.*, 2004). Danach lösen sich die Initiationsfaktoren, und die 60S Ribosomenuntereinheit bindet an den Prä-Initiationskomplex. Das nun entstandene 80S-Ribosom beginnt die Elongationsphase der Translation (Merrick, 1992), bei der Aminosäuren nacheinander am Carboxyl-Ende der wachsenden Peptidkette angefügt werden.

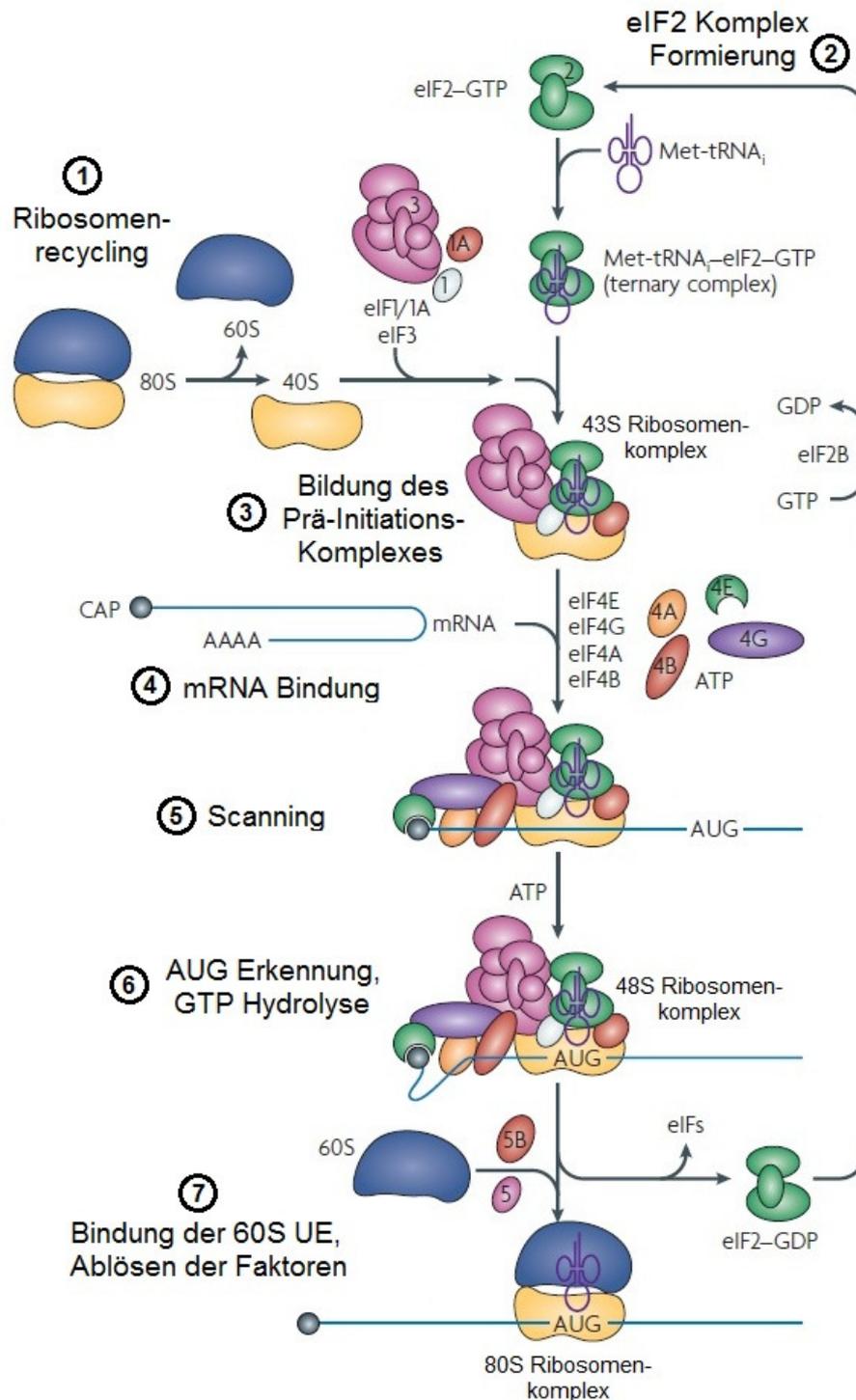


Abb. 3 Ablauf der eukaryotischen Translationsinitiation

Nach Formierung des Prä-Initiationskomplexes bindet dieser zusammen mit dem eIF4F-Komplex an die mRNA. Nach dem Entwinden der RNA und dem Scanning bindet der 48S-Komplex an das Startcodon (AUG). Dabei wird GTP durch eIF5 hydrolysiert, die Faktoren fallen ab und die 60S Ribosomenuntereinheit kann sich an die 40S-Untereinheit anlagern. Anschließend erfolgt die Elongation und danach die abschließende Termination der Translation. Modifiziert nach Fraser *et al.*, 2007.

Für die Verbesserung der Translationseffizienz wird eine Poly(A)-Kette an das Ende der mRNA angefügt (zusammengefasst in Jacobson, 1996). Dort bindet

das Poly(A)-Bindepotein (engl. Poly(A) binding protein, PABP), welches wiederum mit eIF4G interagiert und die RNA somit zirkularisieren kann (Abb. 4). Zudem bindet ein PABP-interagierendes Protein 1 (Paip-1), das ebenso mit eIF4G, eIF3 und der Helikase eIF4A interagiert (Craig *et al.*, 1998 und Martineau *et al.*, 2008).

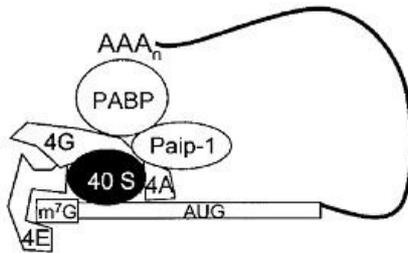


Abb. 4 Zirkularisierung der mRNA

Schema eines Ringschlusses zwischen dem Initiationskomplex der Translation und dem 3'-Poly(A)-Ende der zu translatierenden mRNA. Dabei bildet PABP eine Brücke und bindet entweder direkt an eIF4G oder über Paip-1 an eIF4A. Graphik entnommen aus Gale *et al.*, 2000.

Dies könnte es den Ribosomen erleichtern, nach der Termination zu reinitiiieren und somit die Translationseffizienz zu erhöhen (Jacobson, 1996). Eine Zirkularisierung könnte auch mit einer permanenten Anheftung von eIF4F an das 5'-Ende der RNA einhergehen, wodurch dieser Faktor nicht immer wieder von neuem angelagert werden muss (Jackson *et al.*, 2010).

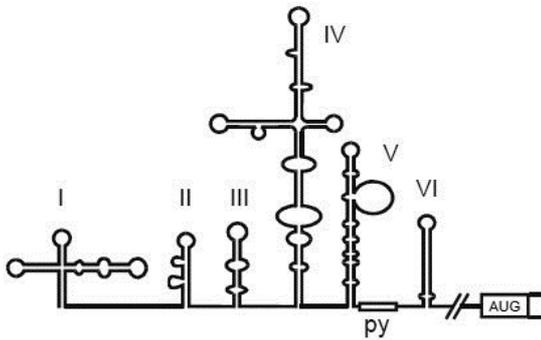
1.2.2 IRES-abhängige Initiation der Translation

Eine IRES (interne Ribosomen-Eintrittsstelle) ist ein Bereich am 5'-Ende einer RNA mit stark ausgeprägter Sekundärstruktur mit besonders charakteristischen Stem-loop-Regionen, die durch ausgeprägte Basenpaarungen der RNA entstehen. Entdeckt wurden IRES-Strukturen erstmals 1988 (Jang *et al.*, 1988 und Pelletier u. Sonenberg, 1988). Dabei wurde festgestellt, dass für die Translationsinitiation ein Cap am 5'-Ende der RNA nicht zwingend notwendig ist. Es wurden bisher vier verschiedene Typen von IRES-Strukturen entdeckt: Eine Typ I-IRES findet man zum Beispiel bei Entero- und Rhinoviren. Typ II entspricht der IRES-Struktur bei Cardio- und Aphthoviren, und Typ III besitzt zum Beispiel das Hepatitis A Virus. Die vierte Gruppe besteht aus HCV und Pestiviren (Brown *et al.*, 1994 und Wang *et al.*, 1993). Einen kurzen Überblick über die verschiedenen IRES-Typen geben die Veröffentlichungen von Jang *et al.* (2006) und Doudna u. Sarnow (2007) wie auch Abbildung 5.

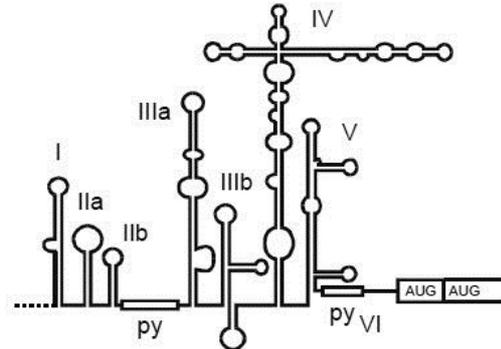
Eine Klassifizierung der verschiedenen IRES-Strukturen kann auch aufgrund der unterschiedlichen Nutzung zellulärer Initiationsfaktoren getroffen werden. So benötigen zum Beispiel Picornaviren alle Initiationsfaktoren außer eIF4E, welches an das Cap bindet (Pestova *et al.*, 1996).

Picornaviridae

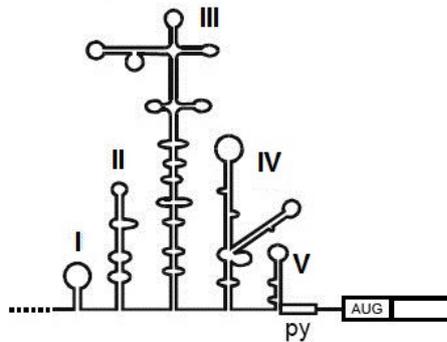
I. Entero- /Rhinoviruses



III. Hepatitis A Virus



II. Cardio- /Aphthoviruses



Flaviridae

**IV. Hepatitis C Virus
Pestivirus**

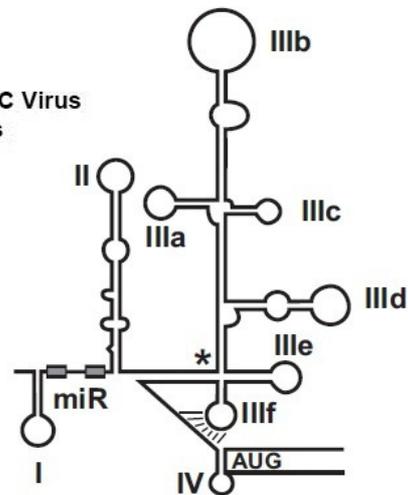


Abb. 5 Darstellung der verschiedenen IRES-Typen

In den Abbildungsteilen (I - IV) sind die klassischen IRES-Strukturen aufgezeigt. (I) Enteroviren (II) Cardio-/Aphthoviren und (III) Hepatovirus (HAV). (IV) In der vierten Gruppe ist als Vertreter der Flaviviridae die HCV-IRES-Struktur dargestellt. Die Nummerierungen der Stem-loops sind durch römische Zahlen gegeben. *: tRNA ähnliche Struktur. miR: zwei Sequenzabschnitte in der 5'-UTR der HCV-RNA, die komplementär zur Seed-Sequenz der miR-122 sind. py: Oligopyrimidin-Trakt. Modifiziert nach Niepmann, 2009.

HCV hat in seiner IRES-Struktur einen so genannten Pseudoknoten mit einer tRNA-ähnlichen Struktur (s. Abb. 5). Dieser ermöglicht es den Ribosomen, direkt an die IRES (Stem-loop II und III) und somit in der Nähe des Startcodons zu binden (Lytle *et al.*, 2002 und Fraser *et al.*, 2007). Diese Bildung des binären Komplexes geschieht ohne weitere Rekrutierung von anderen Faktoren (Pestova *et al.*, 1998). Zusätzlich kann der Initiationsfaktor eIF3 mit eIF2 an den Stem-loop III der HCV-IRES binden. Daher werden die Faktoren eIF4A, eIF4B und eIF4F nicht benötigt, die für eine cap-abhängige Translation gebraucht werden (Kieft *et al.*, 2001; Pestova *et al.*, 1998 und Sizova *et al.*, 1998).

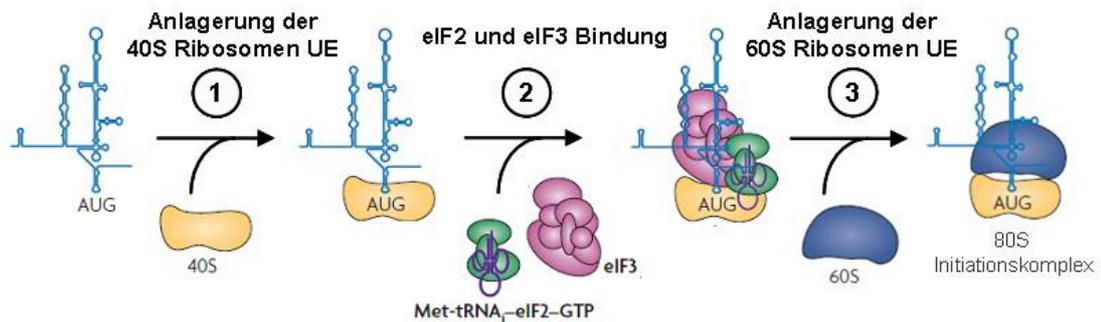


Abb. 6 Darstellung der IRES-abhängigen Translation bei HCV

Der erste Schritt bei der Translationsinitiation bei HCV ist die direkte Bindung der 40S-Ribosomen-Untereinheit (UE) an die IRES. Danach werden eIF3 und eIF2, welches GTP und die Starter tRNA gebunden hat, zur 40S-Ribosomenuntereinheit und der IRES rekrutiert. Anschließend wird GTP hydrolysiert, und es kommt zum Zusammenschluss mit der 60S-Untereinheit, wodurch der 80S-Initiationskomplex vervollständigt wird. Modifiziert nach Fraser *et al.*, 2007.

Für die Rekrutierung der 40S-Ribosomenuntereinheit an die virale RNA ist eIF3 nicht unbedingt nötig, allerdings für die Bildung des 80S-Ribosomenkomplexes (Pestova *et al.*, 1998). eIF3 verbessert jedoch die Bildung des 40S-Initiationskomplexes und dient als Stabilisator für den 80S-Komplex (Fraser *et al.*, 2007). Eine IRES-abhängige Translationsinitiation für HCV ist in Abbildung 6 dargestellt. Nach Untersuchungen von Terenin *et al.* (2008) kann die Translationsinitiation bei HCV sogar ohne den eIF2-Komplex ablaufen und somit vielleicht die Interferon-vermittelte Inaktivierung von eIF2 umgehen. Eine weitere Eigenschaft der 5'-Region des HCV-Genoms ist eine RNA-RNA-Interaktion zwischen einem Teil der Core-kodierenden Region und dem Teil der 5'-UTR, an dem die leberspezifische microRNA-122 bindet (Kim *et al.*, 2003; Shimoike *et al.*, 1999 und Dissertation Goergen, 2010). Durch diese Interaktion ist die Translation von HCV gehemmt. Sie kann aber nach bisherigen Untersuchungen durch die Bindung der miRNA-122 aufgehoben werden und somit die Translationsinitiation fördern (Dissertation Goergen, 2010). Wie dieser Mechanismus allerdings funktioniert und welche zellulären Proteine daran beteiligt sein könnten, ist bisher nicht bekannt.

1.3 Zusätzliche zelluläre Faktoren, die mit der HCV-RNA interagieren

Neben den oben beschriebenen eukaryotischen Initiationsfaktoren nutzt HCV, wie alle Viren, noch weitere zelluläre Proteine, um sich zu replizieren. Hauptsächlich binden diese Proteine (Abb. 7) an die 5'- und 3'-Enden des HCV-Genoms. Zusätzlich können auch microRNAs binden. Solche microRNAs sind zum Beispiel die miR-199a, die die Replikation der HCV-RNA inhibiert (Murakami *et al.*, 2009) oder die leberspezifische miR-122, welche nicht nur an der Replikation beteiligt ist (Chang *et al.*, 2008), sondern auch an der Translation (Jopling *et al.*, 2005 und Henke *et al.*, 2008). Eine nähere Beschreibung von microRNAs und besonders der miR-122 erfolgt in Kapitel 1.4. Proteine, die an die 5'-UTR von HCV binden, sind unter anderem das La Autoantigen (Ali u. Siddiqui, 1997 und Ali *et al.*, 2000), das Polypyrimidin-Trakt-Bindeprotein (PTB) (Ali u. Siddiqui, 1995), hnRNP L (engl. heterogeneous nuclear riboprotein L) (Hahm *et al.*, 1998), Poly(rC)-Bindeprotein (PCBP) (Spangberg u. Schwartz, 1999), NSAP1 (Kim *et al.*, 2004) und das ribosomale Protein S9 (Pestova *et al.*, 1998). Diese Proteine werden ITAFs (engl. IRES trans-acting factors) genannt und können die Translation von HCV stimulieren.

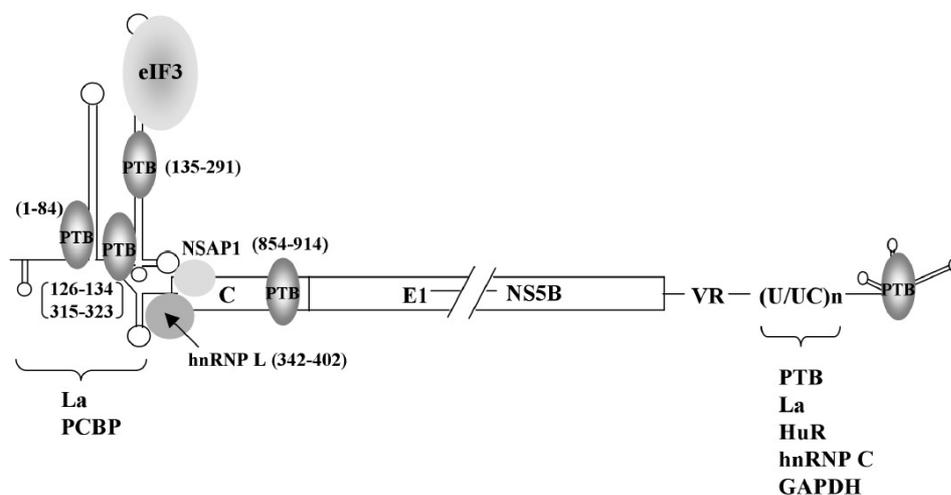


Abb. 7 Bindung zellulärer Proteine an die HCV-RNA

Die 5'-UTR bindet neben den Initiationsfaktoren auch PTB, hnRNP L und NSAP1. Die Regionen, an denen diese Proteine an die HCV-RNA binden, sind mit Klammern gekennzeichnet. Das La-Protein und PCBP benötigen die gesamte IRES zur Erkennung und Bindung, was auf die Relevanz der Sekundärstruktur hinweisen könnte. PTB bindet nicht nur in der 5'-Region von HCV, sondern auch an den drei konservierten Stem-loops der 3'-UTR und dem Poly(U/C)-Trakt. Dieser dient auch als Angriffspunkt der Proteine HuR, hnRNP C, La und sogar GAPDH. Graphik aus Shi *et al.*, 2006.

So bindet das La-Protein an den Stem-loop IV in der Nähe des Startcodons (Ali u. Siddiqui, 1997 und Ali *et al.*, 2000). hnRNP L bindet an das 5'-Ende der Core-kodierenden Sequenz (Hahm *et al.*, 1998), während die Bindungsstelle für NSAP1 in der Adenosin-reichen Gegend der Core-Sequenz zu finden ist (Kim

et al., 2004). Jedoch sind die genauen Mechanismen und Effekte auf die Translation noch nicht vollständig geklärt. Das PCBP-Protein lagert sich an die IRES von HCV an und benötigt nach Untersuchungen von Spangberg u. Schwartz (1999) die gesamte IRES-Struktur für eine erfolgreiche Bindung und Stimulation der Translation. Im Gegensatz zu den oben genannten Proteinen ist die Funktion von PTB noch umstritten. Während dem Protein auf der einen Seite ein stimulierender Effekt zugeschrieben wurde (Gosert *et al.*, 2000), gibt es auf der anderen Seite auch Berichte über keinen oder sogar einen negativen Einfluss auf die Translationseffizienz (Tischendorf *et al.*, 2004). Bei der Bindung von PTB an die Core-Sequenz kann z.B. die Translation vermindert werden (Ito u. Lai, 1999), wobei die Bindung an die 3'-UTR die IRES-vermittelte Translation wieder fördert (Ito *et al.*, 1998).

Zelluläre Proteine binden nicht nur an die 5'-UTR, sondern auch an das 3'-Ende des HCV-Genoms. Beispiele dafür sind das oben genannte PTB, aber auch HuR bzw. ELAV1 (embryonic lethal, abnormal vision, *Drosophila*-like 1) (Spangberg *et al.*, 2000), hnRNP C (Gontarek *et al.*, 1999), das La-Protein (Spangberg *et al.*, 2001) und sogar GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) (Petrik *et al.*, 1999). Die Proteine HuR und hnRNP C interagieren mit dem Poly(U/C)-Trakt der 3'-Enden der HCV-RNA sowohl positiver als auch negativer Orientierung, was auf einen Einfluss bei der Transkription des HCV-Genoms schließen lässt. Ebenso an diese Region bindet das La-Protein und könnte so die RNA vor Abbau bewahren (Spangberg *et al.*, 2001). Dagegen wurde die Funktion der Bindung von GAPDH in dieser Region noch nicht genau bestimmt (Petrik *et al.*, 1999). Es ist sehr gut möglich, dass diese Proteine nicht nur bei der Replikation von HCV eine Rolle spielen, sondern auch die Translation beeinflussen. Durch die 5'-3'-Interaktion könnte sich somit möglicherweise ein Ring bilden und die Reinitiation der Ribosomen begünstigen.

1.4 microRNAs

microRNAs (miRNAs oder miRs) wurden zuerst in dem Nematoden *C. elegans* gefunden, wo sie eine wichtige Funktion bei der Entwicklung haben (Reinhart *et al.*, 2000). Bis heute wurden microRNAs in nahezu allen Organismen gefunden. Nicht nur Eukaryoten, sondern auch virale Genome kodieren miRNAs. microRNAs haben eine Länge von 21 - 25 Nukleotiden und regulieren post-translational die Genexpression (Filipowicz *et al.*, 2008) durch sequenz-spezifische Bindung vorwiegend an die 3'-UTRs von mRNAs. Diese Regulation geschieht meist durch Degradation, Translationsstopp oder Deadenylierung der

Ziel-mRNA (Filipowicz *et al.*, 2008; Bartel, 2009 und Carthew u. Sontheimer, 2009). microRNAs bilden zusammen mit Proteinen die so genannten microRNA-Protein (miRNP)-Komplexe. Auch Argonaute-Proteine binden an miRNAs, die dann als RISC (engl. RNA induced silencing complex)-Komplexe an die Ziel-mRNA binden. Dabei lagert sich die microRNA mit ihrer „Seed“ Region, also den Nukleotiden 2 - 8 ihres 5'-Endes, an die Ziel-mRNA an. Bei diesem Prozess müssen jedoch nicht alle Nukleotide paaren, wodurch die Bandbreite an Ziel-mRNAs für eine microRNA wesentlich größer ist (Orom u. Lund, 2010). Je nach dem welche Argonaute (Ago)-Proteine in diesem Komplex enthalten sind und wie die Basenpaarung zwischen miRNA und mRNA aussieht, wird die mRNA durch den entstandenen RISC-Komplex geschnitten und durch weitere Proteininteraktionen degradiert, oder in „inclusion bodies“ gelagert, bis sie wieder benötigt wird. Neuere Untersuchungen zeigen, dass miRNAs auch in der 5'-nicht-kodierenden Region von RNAs binden können und sogar eine Stimulation der Translation hervorrufen (Vasudevan *et al.*, 2007; Orom *et al.*, 2008 und Henke *et al.*, 2008).

1.4.1 Biogenese von microRNAs

microRNAs können in so genannten „Mirtrons“, also Introns, kodiert werden (Winter *et al.*, 2009). Dabei werden sie durch normales Splicing direkt zu pre-miRNAs prozessiert (Winter *et al.*, 2009). Sind sie aber von mono- oder polycistronischen miRNA-Genen (Lee *et al.*, 2002b) kodiert, entstehen zuerst lange Precursor (pri-miRNAs). Diese werden anschließend durch Drosha, einem RNase III-ähnlichen Enzym, und dem Co-Faktor Pasha/DGCR8 prozessiert (Lee *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004 und Han *et al.*, 2009), wodurch 70 Nukleotide lange pre-miRNAs mit ihrer Haarnadel-Struktur hervorgehen (Abb. 8). Alle pre-miRNAs werden danach mit Hilfe von Exportin 5 und Ran-GTP aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert (Lund *et al.*, 2004), wo anschließend die Reifung der microRNA erfolgt. Dabei entstehen mit Hilfe von Dicer, einem weiteren RNase III-ähnlichen Enzym, und dem dsRNA (doppelsträngige RNA) bindenden Protein TRBP (engl. human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein) ca. 20 Basen lange miRNA Duplexe mit 2-Basen Überhängen an ihren 3'-Enden (Zhang *et al.*, 2004). Es wird der so genannte „guide“-Strang ausgewählt, da in dem endgültigen RISC-Komplex nur ein miRNA-Strang gebunden wird, der für die spätere Genregulation verantwortlich ist. Dies geschieht, indem die miRNA-Duplexe vom thermodynamisch weniger stabilen Ende her entwunden werden. Der Strang, der an dieser Stelle sein 5'-Ende besitzt, wird im Komplex behalten,

während der andere Strang („passenger“-Strang) entfernt wird (Winter *et al.*, 2009 und Schwarz *et al.*, 2003). Der „guide“-Strang wird im miRNP-Komplex mit Hilfe von Dicer und TRBP an Ago-Proteine gebunden (MacRae *et al.*, 2008), wobei der endgültige Effektor-Komplex noch einige weitere Proteine enthält (Höck *et al.*, 2007). Im Ago-Protein wird die miRNA mit ihrem 3'-Ende in einer Tasche in der so genannten der PAZ Domäne und ihrem 5'-Ende in der Tasche zwischen PIWI und MID Domäne gebunden (Song *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2004 und Parker *et al.*, 2005). Dadurch wird die „Seed“-Region der microRNA für Basenpaarungen mit der Ziel-RNA exponiert (Parker *et al.*, 2005). Wenn nun die miRNA perfekt an die mRNA bindet und sich der RISC-Komplex gebildet hat, schneidet Ago die Ziel-RNA (Meister *et al.*, 2004). Ist die Basenpaarung dagegen nicht perfekt, wird die Translation herunterreguliert (Filipowicz *et al.*, 2008).

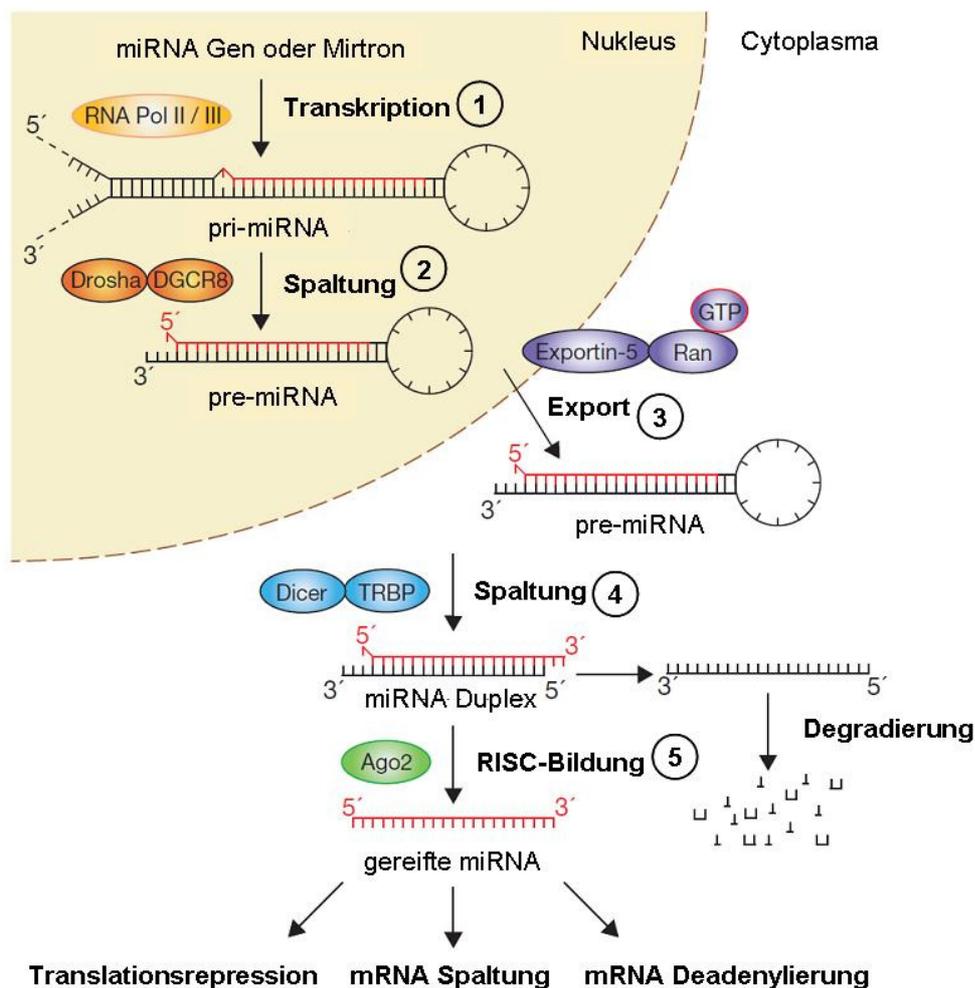


Abb. 8 Prozessierung von microRNAs

Die Biogenese der microRNAs beginnt mit der Transkription von mono- oder polycistronischen microRNA-Genen oder eines Mirtrons. Die pri-miRNAs werden durch Drosha und DGCR8 zu pre-miRNAs gespalten und anschließend via Exportin5 und Ran-GTP aus dem Zellkern exportiert. Im Cytoplasma werden dann die pre-miRNAs durch Dicer und TRBP zu doppelsträngiger RNA mit einer Länge von ca. 20 Basenpaaren gespalten. Der Duplex wird entwunden, und der „guide“-Strang bildet mit Argonaute-Proteinen und anderen den so genannten RISC-Komplex. Nach der Bindung der miRNA an die Ziel-RNA wird deren Translation reguliert, indem die mRNA entweder gespalten, die Translation reprimiert oder die mRNA deadenyliert wird. Graphik nach Winter *et al.*, 2009.

1.4.2 Die Wirkung von miRNA-122 auf die Translation der HCV-RNA

Neben den zellulären Proteinen, die mit dem HCV-Genom interagieren, gibt es auch eine gewebsspezifisch exprimierte microRNA, die einen Einfluss auf die HCV-RNA hat. Die microRNA-122 (miR-122) wird spezifisch in Hepatocysten und Hepatoma-Zellen exprimiert (Chang *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005 und Landgraf *et al.*, 2007). Von der Arbeitsgruppe um P. Sarnow wurde zum ersten Mal gezeigt, dass ein Virus, in diesem Fall HCV, eine zelluläre microRNA rekrutiert und diese für sich nutzt (Jopling *et al.*, 2005). Man kann davon ausgehen, dass dies auch ein Hinweis auf den Lebertropismus des Hepatitis C Virus liefert. Des Weiteren wird die Replikation von HCV durch die Bindung von miR-199a an den Stem-loop II der 5'-UTR reprimiert (Murakami *et al.*, 2009). Da die miR-199a in vielen Geweben exprimiert wird, jedoch in der Leber nur in geringeren Mengen vorliegt, könnte dies eine zusätzliche Erklärung für die Gewebsspezifität sein (Liang *et al.*, 2007 und Murakami *et al.*, 2009).



Abb. 9 microRNA Bindestellen im HCV-Genom

Es gibt drei zur Seed-Sequenz der miR-122 komplementäre Sequenzen im HCV-Genom. Zwei dieser Sequenzen liegen in der 5'-UTR zwischen den Stem-loops I und II. Die dritte Stelle liegt in der Variablen Region in der 3'-untranslatierenden Region. Neben der miR-122 bindet auch die zweite leberspezifische miR-199a* an die HCV-RNA. Ihre Bindestelle liegt im Stem-loop II der HCV 5'-UTR. VR: Variable Region. Poly(U/C): Poly(U/C)-Trakt. 3'X: 3'-X-Region. ORF: Offenes Leseraster. Nach Niepmann, 2009.

In der HCV-RNA gibt es zwei Sequenzen in der 5'-UTR zwischen den Stem-loops I und II, die komplementär zur miR-122 Seed-Sequenz sind (Abb. 9). So kann die miR-122 entweder an die 7 Nukleotide (ACACUCC) oder an die 6 Nukleotide (CACUCC) lange Sequenz binden. Eine dritte Sequenz befindet sich in der HCV 3'-UTR.

Die Interaktion zwischen der miR-122 und der HCV-RNA ist an der Replikation sowie der Translation der HCV-RNA beteiligt (Jopling *et al.*, 2005; Jangra *et al.*, 2010 und Henke *et al.*, 2008). Die Translation wird sogar durch die miR-122 stimuliert, da die ribosomalen Untereinheiten schneller mit der HCV-RNA

assoziiieren (Henke *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde durch Mutation der beiden Bindestellen in der 5'-UTR gezeigt, dass die Stimulation der Translation durch eine direkte Interaktion der microRNA-122 mit der HCV-RNA entsteht. Die Bindestelle in der 3'-UTR wird hierfür nicht benötigt, da eine Deletion keine Auswirkungen auf die Translationseffizienz gezeigt hat.

1.5 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus kann in zwei Hauptphasen geteilt werden: die Interphase und die Mitose. Die Interphase wiederum wird in G_1 , S und G_2 unterteilt („G“ für „Gap“, Lücke und „S“ für Synthese), während die Mitose-Phase in Pro-, Meta-, Ana- und Telophase eingeteilt werden kann. Als weiteres Stadium einer Zelle kann die G_0 -Phase gezählt werden, die einer Ruhephase entspricht, aus der die meisten Zellen aber wieder in die G_1 -Phase zurückkehren können (Alberts *et al.*, 2008). Zellen, die sich sehr häufig in der G_0 -Phase befinden, sind zum Beispiel Hepatozyten (Dancygier, 2003).

Eine graphische Darstellung ist in Abbildung 10 gezeigt. In der G_1 -Phase bereitet sich die Zelle auf die Synthese neuer DNA vor, was dann in der S (Synthese)-Phase zu einer Verdopplung der Chromatiden führt. Nachdem die G_2 -Phase durchlaufen ist, beginnt die Zelle mit der Mitose, in der die Schwester-Chromatiden auf zwei Tochterzellen aufgeteilt werden.

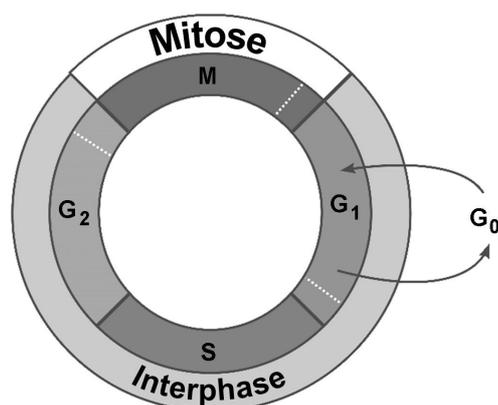


Abb. 10 Darstellung der Zellzyklusphasen

Es gibt zwei Unterteilungen: Die Interphase und die Mitose-Phase. Die Interphase ist wiederum in die G_1 -, S- und G_2 -Phase unterteilt. Nachdem die Zellen in G_1 ihr Volumen vergrößert haben, werden die Chromatiden in der S-Phase verdoppelt. Nach einem weiteren Vergrößerungsschritt in G_2 wird die Mitose eingeleitet. Hierbei werden die Schwester-Chromatiden auf zwei Zellen aufgeteilt. Um das Zellwachstum zu regulieren, gibt es so genannte Checkpoints (hier als gepunktete Linien dargestellt) an denen entschieden wird, ob der Zellzyklus weiter durchlaufen wird.

Während der Prophase der Mitose kondensiert das Chromatin, und die Chromosomen werden sichtbar. Die identischen Chromatiden die in der S-Phase entstanden sind, nennt man Schwester-Chromatiden. Sie sind über das so genannte Zentromer miteinander verbunden. Es bildet sich der Spindelapparat aus, indem zwei Zentrosomen jeweils an die gegenüberliegenden Pole der Zelle wandern und als Mikrotubuli-organisierende Zentren dienen (engl. microtubule organizing centre, MTOC). Die Spindel entsteht anschließend

durch eine Mikrotubuli-Reassemblierung. Zu Beginn der Metaphase defragmentiert die Kernmembran und die Mikrotubuli-Spindeln reichen bis zum Zellmittelpunkt, wo sich die Chromosomen sammeln und mit ihrem Zentromer an diese Spindeln anheften, wodurch Kinetochore gebildet werden, die aus Protein/DNA-Komplexen bestehen. Dadurch werden die Chromatiden in der Äquatorialebene angeordnet und können in der Anaphase getrennt werden (Nasmyth, 2001), indem sie zu den jeweiligen Spindelpolen gezogen werden. In der Telophase depolymerisieren die Kinetochorfasern und die Kernmembranen bilden sich wieder. Nach der Dekondensierung der Chromosomen erfolgt die Zytokinese, bei der sich durch Actin-Myosin-Faserringe die zwei Zellen abschnüren (Pollard *et al.*, 1990), die dann wieder in die G₁-Phase zu gelangen. All diese Schritte müssen genauestens reguliert werden, da sonst ein unkontrolliertes Wachstum der Zellen erfolgt. Für diese Regulation gibt es spezielle Proteine, die so genannten Cycline. Diese werden wiederum von Cyclin-abhängigen Kinasen (engl. cyclin-dependent kinases, CDKs) reguliert. Durch verschiedene Expressionsmuster der jeweiligen Proteine werden so genannte „Checkpoints“ passiert (Hartwell u. Weinert, 1989) und es wird signalisiert, dass die nächste Phase beginnen kann. Zur Regulation des Zellzyklus sind nicht nur zelluläre Signale notwendig, sondern auch exogene Signale können den Zellzyklus beeinflussen. Bei einzelligen Organismen sind es meist Umwelteinflüsse wie Nahrungsmangel (Shiozaki, 2009). Bei höheren Organismen sollen sich die Zellen nur unter bestimmten Umständen teilen (zur Gewebserneuerung oder bei der Embryogenese). Daher gibt es Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone oder Zell-Zell-Kontakte, die die Teilung und das Zellwachstum steuern (Boonstra, 2003). Jedoch sind die Einflüsse dieser Faktoren nur erfolgreich, wenn sie vor einem Restriktionspunkt in der G₁-Phase erfolgen (Pardee, 1974).

1.5.1 Cyclin-abhängige Kinasen und Cycline

Die Regulation des Zellzyklus erfolgt durch Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (engl. cyclin-dependent kinases, CDKs). Diese wurden von Hartwell (1974), Hunt (Evans, 1983) und Nurse (1975) entdeckt, die dafür 2001 einen Nobelpreis erhielten. Die Cycline und Cyclin-abhängigen Kinasen können jedoch nur einen Einfluss auf das Fortschreiten des Zellzyklus nehmen, wenn sie als Einheit fungieren. Dabei sind die CDKs die katalytischen Untereinheiten, die weitere Proteine phosphorylieren und sie dadurch inhibieren oder aktivieren. CDKs werden auf zwei Arten reguliert. Zum einen besitzen sie zwei Phosphorylierungsstellen (Threonin- und Tyrosin-Reste), deren

Phosphorylierungsgrad darüber entscheidet, ob sie stimuliert oder inhibiert werden (Arellano u. Moreno, 1997). Zum anderen benötigen sie die Bindung an Cycline, um aktiviert zu werden. Da Cycline periodisch synthetisiert und degradiert werden, ist dadurch der zeitliche Ablauf des Zellzyklus definiert (s. Abbildung 11). Sie besitzen eine Sequenz zur Lokalisierung im Zellkern (NLS) und eine PEST-Sequenz, die zur Degradation über Ubiquitinylierung zu bestimmten Zeitpunkten führt (Rechsteiner, 1996 und Schafer, 1998).

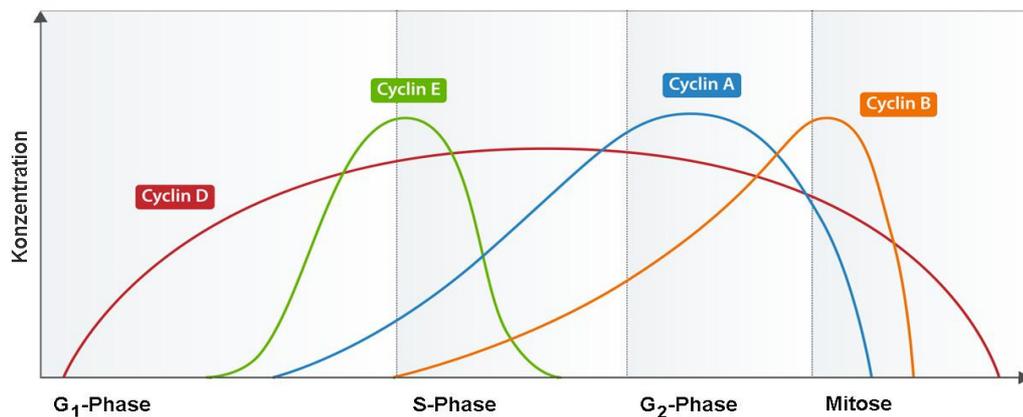


Abb. 11 Zellzyklus-abhängige Expression von Cyclinen

In der G₁-Phase wird Cyclin D und E exprimiert. Dadurch gelangt die Zelle über den Restriktionspunkt hinweg und kann in die S-Phase übergehen. Dort wird die Synthese von Cyclin A veranlasst, welches erst zu Beginn der Mitose abgebaut wird. In der G₂-Phase wird der Spiegel von Cyclin B erhöht, das dann über den G₂/M Checkpoint hilft, so dass die Mitose eingeleitet werden kann.

In Säugetierzellen wurden bis 1999 (Johnson u. Walker, 1999) 9 CDKs und 16 Cycline identifiziert, wobei mittlerweile noch weitere Cycline hinzugekommen sind. Allerdings tragen nicht alle Cycline zur Steuerung des Zellzyklus bei. Sie regulieren auch die DNA-Reparatur, die Transkription oder die Apoptose (Loyer *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 1994 und Rickert *et al.*, 1996).

Im Grunde steuern vier Hauptklassen von Cyclinen den Zellzyklus (s. Tabelle 1): Klasse I besteht aus G₁/S-Cyclinen, die in der späten G₁-Phase die CDKs aktivieren. Dadurch wird der Restriktionspunkt überschritten und der Zellzyklus beginnt. Wenn die S-Phase erreicht ist, werden diese Cycline abgebaut und die S-Cycline binden an ihre CDKs. Diese Klasse II-Cycline stimulieren die DNA-Synthese in der S-Phase, bleiben jedoch bis zu Beginn der Mitose erhalten. Klasse III beinhaltet die M-Cycline, die jene CDKs aktivieren, welche die Zelle veranlasst, den G₂/M-Checkpoint zu durchlaufen und so die Mitose einzuleiten. Auch diese Cycline werden in der Mitose-Phase abgebaut. In den meisten Zellen existieren noch die G₁-Cycline als IV. Klasse, welche die Aktivität von G₁/S-Cyclinen reguliert (Alberts *et al.*, 2008).

Tab. 1: Liste der wichtigsten Cycline bei der Regulation des Zellzyklus

Zellzyklusphase	Cycline	assoziierte CDKs
G ₁	D*	cdk4, cdk6
G ₁ /S	E	cdk2
S	A	cdk1**, cdk2
M	B	cdk1

* Es gibt drei Untergruppen von Cyclin D: D1, D2 und D3

** cdk1 wurde zuerst in Hefe gefunden und als cdc2 bezeichnet

Die Effektorproteine von Cyclin-CDK-Komplexen sind zum Beispiel das Rb-Protein (Retinoblastoma Tumor Suppressor), das von CyclinD-cdk4/6 in der G₁-Phase phosphoryliert wird (Kato *et al.*, 1993). Dadurch ist die Bindung von Rb an den Transkriptionsfaktor E2F gelöst, und die Transkription von Proteinen, die unter anderem den Zellzyklus betreffen, kann gestartet werden (Schafer, 1998 und Bueno u. Malumbres, 2011). CDKs werden wie oben erwähnt auch selbst aktiviert oder inhibiert. Bei dem G₂/M-Übergang zum Beispiel spielen die Proteine wee1 und cdc25 bei der Aktivierung und Inhibierung des CyclinB-cdk1 Komplexes eine Rolle. Während wee1 die cdk1 beim Eintritt in den Nukleus phosphoryliert und somit inhibiert, wird cdk1 von cdc25 durch Dephosphorylierung aktiviert (Schafer, 1998).

1.5.2 CDK-Inhibitoren mit Fokus auf p27^{Kip1}

Neben der Regulation der CDKs durch Phosphorylierungen oder ihre Bindung an Cycline gibt es auch noch eine weitere Möglichkeit, ihre Aktivität zu beeinflussen. Dies erfolgt durch die so genannten CDK-Inhibitoren oder kurz CKIs. Es gibt zwei Familien: die INK4- und Cip/Kip-Proteine. Zur Familie der INK4-Proteine gehören p15, p16, p18 und p19, welche nur die CDKs der G₁-Phase, also cdk4 und cdk6 inaktivieren (Guan *et al.*, 1994 und Hirai *et al.*, 1995) und somit die Freisetzung von E2F verhindern. Die Cip/Kip-Familie beinhaltet die Proteine p21 (waf1, cip1 oder pic1), p27 (kip1) und p57 (kip2). Ihre inhibitorische Funktion wird durch die Bindung an Cyclin-CDK-Komplexe hervorgerufen. Während p21 verschiedene Cyclin-CDK Komplexe inhibieren kann, besitzt es auch noch die Fähigkeit, mit PCNA, der „Ringklemme“ der DNA-Polymerase δ , zu interagieren (Li *et al.*, 1994).

Das Protein p27 liegt in proliferierenden Zellen periodisch vor. Die p27-Konzentration ist während der G₀-Phase am höchsten, fällt jedoch stark ab, sobald die Zellen in die S-Phase eintreten (Polyak *et al.*, 1994; Llyod *et al.*,

1999 und Coats *et al.*, 1996). Des Weiteren wird p27 durch einige anti-proliferative Signale in vielen verschiedenen Zelltypen induziert (Hengst u. Reed, 1998). So akkumuliert p27 zum Beispiel in Zellen, die nach Entzug von Wachstumsfaktoren oder durch Kontaktinhibition den Zellzyklus verlassen und in den Ruhezustand (G_0) übergehen. Allerdings gehen Veränderungen der p27-Proteinmenge nicht mit einer Veränderung der p27-mRNA-Menge einher (Hengst u. Reed, 1998), was auf eine Regulation der Translation deutet (Hengst u. Reed, 1996).

Die Stabilität von p27 wird zum Beispiel durch die Phosphorylierung seines C-terminalen Endes durch das Protein cdk2 beeinflusst, wodurch die Ubiquitinylierung eingeleitet wird (Pagano *et al.*, 1995 und Montagnoli *et al.*, 1999). Liegt jedoch p27 stark akkumuliert vor, bindet es an den Komplex aus Cyclin E und cdk2. Damit ist die Wirkung von cdk2 aufgehoben und Rb kann nicht phosphoryliert werden, wodurch der Zellzyklus arretiert (s. Abb. 12). Die gleichen Auswirkungen hat die Bindung von p27 an den Komplex aus Cyclin D und cdk4.

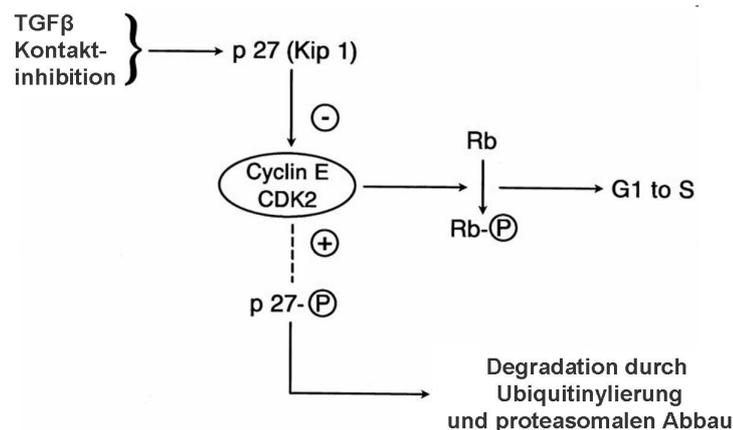


Abb. 12 Effekt von p27^{Kip1} auf den Zellzyklus

p27^{Kip1} wird zum Beispiel durch eine Kontaktinhibition vermehrt exprimiert und bindet an den CyclinE-cdk2-Komplex. Dadurch wird dessen Aktivierung verhindert und Rb kann nicht phosphoryliert werden, wodurch der Übergang von der G_1 - zur S-Phase gestoppt wird. p27^{Kip1} kann aber auch als Substrat dieses Komplexes dienen und wird dadurch phosphoryliert, was zu einem Abbau von p27^{Kip1} durch Ubiquitinylierung führt. TGF β : Transforming Growth Factor (Zytokin), Rb: Retinoblastoma Protein, P: Phosphat. Darstellung modifiziert nach Lloyd *et al.*, 1999.

1.5.3 Einfluss von HCV und microRNAs auf den Zellzyklus

Der Zellzyklus kann nicht nur durch endogene Faktoren, sondern wie oben erwähnt auch durch äußere Einflüsse gelenkt werden. So kann zum Beispiel das Hepatitis C Virus durch seine viralen Proteine die Funktion diverser zellulärer Faktoren, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, beeinträchtigen oder fördern. Bisher ist bekannt, dass eine HCV-Infektion eine

gesteigerte Expression verschiedener zellulärer Proteine veranlasst. So werden nicht nur Gene für die Proteinsynthese und -Degradation, posttranslationale Modifikation, den Vesikel-Transport und für Komponenten des Zytoskeletts reguliert (Nishimura-Sakurai *et al.*, 2010), sondern zusätzlich die Expression von TXNIP (Thioredoxin interacting protein) (Blackham *et al.*, 2010) induziert. Dabei leitet eine Überexpression von TXNIP die G₀-Phase des Zellzyklus ein (Yamaguchi *et al.*, 2008). Andererseits wurde gezeigt, dass durch eine HCV-Infektion das Protein Rb (Retinoblastom Tumor Suppressor) durch NS5B negativ beeinflusst und dadurch der Übergang von G₁ zur S-Phase veranlasst wird (Munakata *et al.*, 2005 und McGivern *et al.*, 2011). Eine weitere Untersuchung zeigt, dass NS5B das Fortschreiten des Zellzyklus durch die S-Phase verlangsamt, da die Produktion von Interferon- β ausgelöst wurde (Naka *et al.*, 2006), was in einer erhöhten Expression des PML (Promyelozytische Leukämie)-Proteins, eines kernspezifischen Phosphoproteins, resultiert. Dieses PML-Protein verhindert das Zellwachstum und unterdrückt Tumorstadium (Vannucchi *et al.*, 2000).

Neben HCV können auch microRNAs über miRNP-Komplexe den Zellzyklus beeinflussen oder selbst Zellzyklus-abhängig reguliert werden. Die Gruppe um J. Steitz fand heraus, dass AU-reiche Elemente (ARE) im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA des Tumornekrosefaktors TNF- α die Translation während der G₀-Phase stimulieren. Dies geschieht durch die Bindung von Ago2 und FXR1 (engl. fragile-X-mental-retardation-related protein 1) an diese AU-reiche Region. Zudem wurde gezeigt, dass miR-369-3 an zwei Regionen der TNF- α ARE bindet und deshalb die Translation in der G₀-Phase stimuliert wird (Vasudevan u. Steitz, 2007; Vasudevan *et al.*, 2007 und 2008). Während der stimulierende Effekt auf die Translation in der G₀-Phase eintritt, wurde die Translationsrepression eher in proliferierenden Zellen beobachtet (Vasudevan *et al.*, 2007 und 2008). Dies lässt die Vermutung zu, dass nicht die microRNA, sondern der Zellzyklus die Unterscheidung zwischen Stimulation und Repression definiert (Niepmann, 2009).

Da in dieser Arbeit die Translation von HCV untersucht wurde, war hier das Augenmerk auf die leberspezifische miR-122 gerichtet. Diese microRNA hat Auswirkungen auf ein breites Spektrum von Vorgängen in Hepatozyten. Unter anderem wurde herausgefunden, dass die miR-122 einige zellzyklus-spezifische Gene und Proteine beeinflusst (aufgelistet in Tabelle 3 in Boutz *et al.*, 2011). Durch Proteomanalysen wurde eine Interaktion von miR-122 mit dem Histon H1F0, welches in Zellen mit einer geringen Teilungsrate einhergeht, bestätigt. Weitere Protein-Interaktionen treten zum Beispiel mit Lamin B2 oder Mikrotubuli-assoziierten Proteinen auf. Des Weiteren wurde die Cyclin G1-mRNA als Ziel der miR-122 bestätigt (Gramantieri *et al.*, 2007).

Auf diese Weise kann vielleicht die miR-122 die initiale Translation der HCV-RNA begünstigen. Nach einer lang andauernden Infektion und chronischen Hepatitis aber kann sich ein hepatozelluläres Karzinom (HCC, engl. hepatocellular carcinoma) bilden, und die Dedifferenzierung der Zellen wird gefördert, wobei die miR-122-Menge meist sinkt (Burchard *et al.*, 2010). In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass miR-122 den Mitochondrien-Metabolismus reguliert und sich so durch die geringe Expression der miR-122 in einem hepatozellulären Karzinom die Leberfunktion verschlechtert.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Interaktion zwischen zellulären Proteinen und der HCV-RNA. Es war zwar bekannt, dass nach der Infektion des Hepatitis C Virus in den Leberzellen einige zelluläre Proteine an der Vermehrung, also der Translation und Transkription des HCV-Genoms, beteiligt sind. Allerdings stellte sich die Frage, ob es noch weitere unbekannte Interaktionen zwischen der HCV-RNA und eukaryotischen Proteinen gibt. Sind noch mehr Proteine, die direkt mit der HCV-RNA interagieren, vorhanden, und haben diese Proteine einen Einfluss auf die Translation des Virus-Genoms? In vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde ein Protein mit einer Größe von 210 kDa beobachtet. Die sich aus diesem Befund ergebenden Fragen waren dann: Bindet dieses Protein wirklich direkt an die HCV-RNA, und welche Region wird dabei benötigt? Um welches Protein handelt es sich, und welche Funktion hat es in Bezug auf die Translation der HCV-RNA?

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit sich der Zellzyklus auf die Translation der HCV-RNA und die Stimulierbarkeit durch die miR-122 auswirkt. Es wurde schon gezeigt, dass HCV selbst einen Einfluss auf verschiedene Phasen des Zellzyklus hat. Andererseits ist die Effizienz der Translation des HCV-Genoms aber auch abhängig vom Stadium des Zellzyklus? Ändert sich der Effekt der miR-122 auf die Translationseffizienz von HCV im Laufe des Zellzyklus? Wie wird die miR-122 im Laufe des Zellzyklus exprimiert, und gibt es noch weitere Faktoren, die in ähnlicher Weise exprimiert werden und an der Interaktion zwischen HCV und miR-122 beteiligt sind?

Diese Fragen sollten in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden.

2 Ergebnisse und Diskussion

Teil I

2.1 Proteinanalyse durch UV-Crosslink-Experimente

Bei diesem Teil der Arbeit ging es darum, die Interaktion noch unbekannter zellulärer Proteine mit dem HCV-RNA-Genom zu untersuchen, die eine mögliche Rolle bei der Translation von HCV spielen. Dabei lag der Schwerpunkt darauf, ein Protein mit der Größe von 210 kDa (p210) zu charakterisieren, das in vorangegangenen Arbeiten entdeckt wurde. Zudem stellte sich die Frage, ob es sich sogar um ein gewebsspezifisches Protein handelt, das präferentiell in Hepatozyten exprimiert wird.

Für diese Experimente wurden verschiedene HCV-RNA-Konstrukte und Deletionsmutanten der 3'-UTR verwendet, um Proteine beziehungsweise das oben genannte p210 zu suchen und anschließend zu charakterisieren. Dabei wurden neben der normalen UV-Crosslink-Methode mit radioaktiv markierten RNAs auch so genannte Kompletions-Crosslinks durchgeführt, bei denen nicht markierte RNA als Kompetitor eingesetzt wurde.

2.1.1 Konstrukte

Für die RNA-Protein-Bindung durch UV-Crosslinks wurden HCV-Konstrukte verwendet, welche anstelle des normalen offenen Leserasters (engl. open reading frame, ORF) von HCV eine unspezifische Sequenz von 96 Nukleotiden Länge besitzen. Das offene Leseraster beinhaltet die ersten 61 Nukleotide der Core-Protein-kodierenden Sequenz (ohne die zur Bildung der translationsreprimierenden RNA-RNA-Interaktion notwendigen Nukleotide der Core-Sequenz) und 35 Nukleotide der für die *Firefly*-Luziferase kodierenden Sequenz.

Es wurden sechs Matrizen generiert, die auf dem Wildtyp (HCV sin, engl. short in-frame) basieren und unterschiedliche Deletionen im 3'-untranslatierten Bereich aufweisen (siehe Abb. 13). Der Wildtyp enthält die 5'-UTR (engl. untranslated region) von HCV, den kurzen ORF und die 3'-UTR von HCV. Bei den Mutanten fehlen entweder die einzelnen Regionen der 3'-UTR (Variable Region, Poly(U/C)-Trakt oder 3'X-Region), oder es handelt sich um Kombinationen dieser Deletionen (dVUC, dVRX, dUCX). Als positive Kontrolle wurde der Wildtyp eingesetzt, als negative Kontrollen „IRES only“ (enthält nur

die HCV-IRES ohne weitere Sequenz) und „3'-UTR only“ (enthält nur die HCV 3'-UTR), um Proteinbanden zu identifizieren, die nur auftreten, wenn beide untranslatierten Bereiche vorliegen, und so auf einen möglichen Ringschluss der RNA hinweisen.

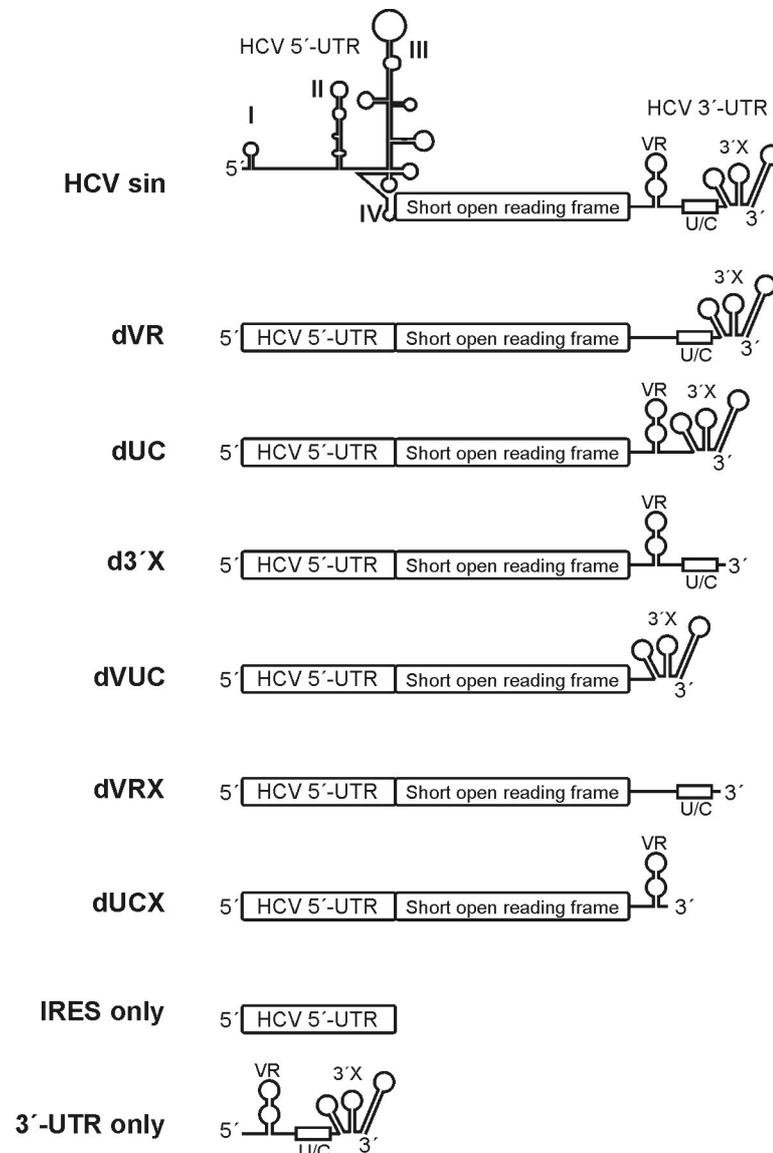


Abb. 13 HCV-RNA-Konstrukte zur Proteinbindungsanalyse

Das „HCV sin“-Konstrukt stellt die Wildtypvariante dar, die ein kurzes artifizielles Leseraster (sin, engl. short in frame) besitzt und von beiden untranslatierten Bereichen von HCV flankiert wird. Die darunter abgebildeten Konstrukte sind entsprechend die verschiedenen Deletionsmutanten der Regionen in der 3'-UTR sowie deren Kombinationen. Des Weiteren sind „IRES only“ und „3'-UTR only“ als Kontrollen eingesetzt.

Für die in Abbildung 13 dargestellten Konstrukte wurden DNA-Matrizen mittels PCR generiert, da ein genaues 3'-UTR-Ende, das dem natürlichen Ende der HCV-RNA entspricht, wichtig für die Translationseffizienz ist (Song *et al.*, 2006). Diese DNA-Matrizen wurden von den Plasmiden pHCVs_{sin}, pHCV-dUC, pHCV-dVR, pHCV-dVUC und pHCV 3'-UTR only (Plasmidkarten siehe Anhang) mit den jeweils passenden Primern hergestellt und *in vitro* transkribiert (s. Kapitel

4.2.1.2.2 und 4.2.1.3.2). Dabei wurden die RNAs intern mit radioaktivem rUTP markiert, da aus den vorhergehenden Arbeiten die UV-Crosslinks mit RNAs, welche ^{32}P -UTPs beinhalten, ein deutlicheres Bandenmuster geliefert haben als bei Markierungen mit anderen radioaktiven Nukleotiden.

2.1.2 UV-Crosslinks

Für die Suche nach dem Protein p210 wurden UV-Crosslink-Experimente mit unterschiedlichen RNA-Konstrukten in cytoplasmatischem Huh7-Hepatoma-Extrakt durchgeführt. Die Methode des UV-Crosslinks wurde von Pelletier und Sonenberg beschrieben (Pelletier u. Sonenberg, 1985). Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei der direkte RNA-Protein-Interaktionen erfasst werden können. Die Besonderheit ist, dass kein Linker für die Detektion benötigt wird, der die Sekundärstruktur der RNA oder ihre Interaktion mit Proteinen stört, und dadurch die Bindung in ihrer natürlichen Form erfolgen kann. Durch die Bestrahlung radioaktiv markierter RNA in einem Proteingemisch werden in diesem Fall Pyrimidinradikale gebildet, die mit benachbarten reaktiven Aminosäuregruppen von Proteinen reagieren und kovalente Bindungen eingehen. Nicht kovalent gebundene RNA und nicht durch das bindende Protein geschützte RNA-Bereiche werden anschließend mit RNase verdaut. Dadurch erhält man Proteine mit einem kleinen RNA-Rest, der nun das Protein indirekt radioaktiv markiert hat.

2.1.2.1 UV-Crosslinks mit Huh7-Extrakt

Um zu überprüfen, wie verschiedene Proteine an die HCV-RNA binden und ob dabei Unterschiede zwischen den verwendeten Konstrukten (s. Abb. 15) vorhanden sind, wurden die radioaktiv markierten RNAs mit Proteinen aus dem cytoplasmatischem Huh7-Extrakt gecrosslinkt und auf einem SDS-12% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Ergebnis des UV-Crosslinks (Abb. 14) zeigt, dass vorwiegend Proteine mit einer Größe zwischen 30 kDa und 69 kDa an die HCV-RNA binden. Durch Vergleiche mit bisherigen Studien konnte eine Proteinbande als PTB, welches spezifisch an den Poly(U/C)-Trakt der HCV 3'-UTR bindet (Luo, 1999), identifiziert werden. Andere sichtbare Proteine sind möglicherweise diverse Untereinheiten von eukaryotischen Initiationsfaktoren sowie andere „IRES Trans-Acting Factors“ (ITAFs) wie PCBP (Spangberg u. Schwartz, 1999), hnRNP L (Hwang *et al.*, 2009) oder das La Protein (Fontanes *et al.*, 2009).

In der Spur von „IRES only“ ist zu sehen, dass vorwiegend Proteine im Größenbereich von 30 - 43 kDa binden, die sehr wahrscheinlich Untereinheiten von Initiationsfaktoren sind. Bei „3'-UTR only“ wie auch bei anderen Konstrukten kann man PTB mit der Größe von 58 kDa sehr gut erkennen. Diese Bande fehlt bei Konstrukten, die eine Deletion des Poly(U/C)-Trakts aufweisen. Ebenso fehlen weitere Proteine, die entweder direkt an Poly(U/C) binden oder durch eine Änderung der Sekundärstruktur der RNA nun keinen Zugang zu ihrer Bindestelle mehr haben.

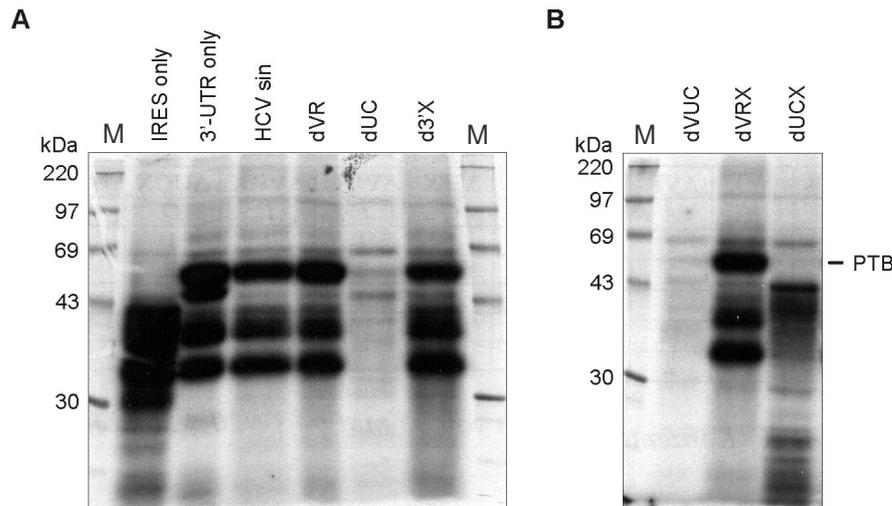


Abb. 14 Übersicht verschiedener HCV-bindender Proteine in einem UV-Crosslink

Ergebnis eines UV-Crosslink-Experiments mit cytosolischem Huh7-Extrakt und verschiedenen RNA-Konstrukten. **(A)** UV-Crosslink mit Kontroll-RNAs (IRES only, 3'-UTR only und HCV sin) sowie mit Deletionskonstrukten verschiedener Regionen in der 3'-UTR. **(B)** Auftrennung von Proteinen eines UV-Crosslinks mit RNAs, bei denen unterschiedliche Deletionen kombiniert wurden. Die Proteine wurden auf einem SDS-12 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie (3 Tage bei 4°C) sichtbar gemacht. Gekennzeichnet ist das Protein PTB. Marker: ^{14}C Proteinmarker

Die RNA-Konstrukte, die eine Kombination aus den einzelnen Deletionen enthalten, wurden eingesetzt, um Proteinbindungen in der 3'-UTR zu spezifizieren. Bei dem RNA-Konstrukt „dVRX“ fällt deutlich PTB als Interaktionspartner auf, da die anderen Mutanten in Abb. 14 B keinen Poly(U/C)-Trakt besitzen und somit dort die Bindungsstelle für PTB entfällt. Bei „dUCX“ treten manche Banden verstärkt auf, da möglicherweise durch eine Deletion und die fehlende Bindung bestimmter Proteine Bindungsstellen für andere Proteine nun zugänglich sind und diese dadurch binden können.

Um nun das gesuchte Protein der Größe 210 kDa besser identifizieren zu können, wurden die Proben über ein SDS-6 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. In Abbildung 15 sieht man den Bereich von 97 bis 210 kDa. Als Orientierung ist ein Protein p170 gekennzeichnet, welches sehr wahrscheinlich eIF3a darstellt. Es bindet deutlich sichtbar an die IRES, aber nicht an die 3'-UTR und ist somit auch nicht beim „3'-UTR only“-Konstrukt zu sehen. Die Banden auf der Höhe

von 110 bzw. 116 kDa könnten ebenfalls eIF3-Untereinheiten sein. Deutlich zu sehen sind vier Proteine unterschiedlicher Größe (s. Abb. 15 Markierung), die an die Konstrukte „HCV sin“, „dVR“, „dUC“ und „d3'X“ binden, jedoch nicht an die Konstrukte mit Deletionskombinationen (dVUC, dVRX und dUCX).

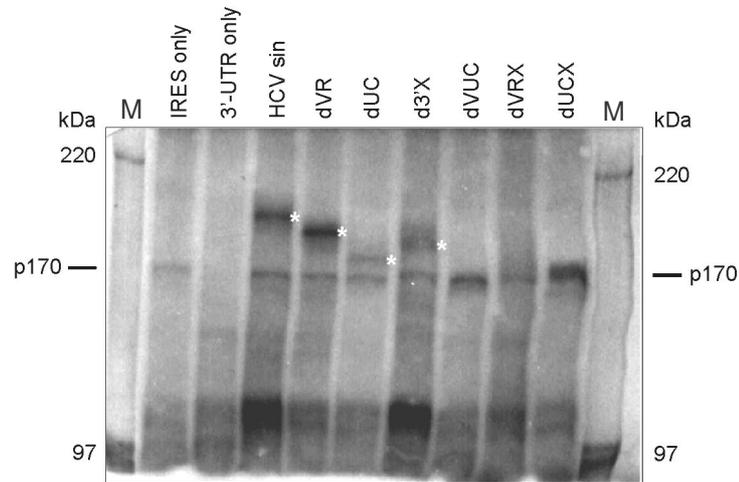


Abb. 15 Darstellung großer HCV-bindender Proteine in einem UV-Crosslink

Ergebnis eines UV-Crosslink-Experiments mit cytosolischem Huh7-Extrakt und verschiedenen RNA-Konstrukten. Die Proteine wurden mittels SDS-6 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch eine indirekte Autoradiographie (7 Tage bei -70°C) sichtbar gemacht. (*) Markierung der noch nicht identifizierten Banden. Marker: ^{14}C -Proteinmarker

Bei dem mit der „HCV sin“-RNA detektierten Protein handelt es sich vermutlich um das zuvor erkannte p210. Dieses Protein war allerdings oft schwer nachzuweisen, da es nur in manchen Fällen auf einem SDS-Gel detektierbar war. Da aber p210 wie in Abb. 15 jedoch nur bei „HCV sin“ und sonst bei keinem anderen Konstrukt auftritt, benötigt es eventuell beide nicht translatierten Regionen von HCV, um zu binden. Daher könnte es für einen Ringschluss der RNA verantwortlich sein, der entweder eine Umschaltung zwischen Translation und Replikation hervorruft oder eine räumliche Nähe der beiden RNA-Enden für eine erhöhte Bindungseffizienz der Ribosomen in der 5'-UTR hervorruft. Außerdem könnte es eine Interaktion zwischen 3'- und 5'-UTR auslösen, welche signalisiert, dass die RNA unversehrt ist und die Translation starten kann (ähnlich wie PABP bei cap-abhängiger Translation). Eine weitere Möglichkeit wäre eine Gewebsspezifität. Da HCV nur die Leber infiziert, könnte es vielleicht sogar ein Protein sein, das spezifisch in der Leber exprimiert wird, was zu diesem Zeitpunkt allerdings noch zu überprüfen war.

Bei einer Deletion der Variablen Region bindet ein kleineres Protein als bei „HCV sin“, da möglicherweise neue Bindestellen durch Aufhebung struktureller Hinderungen entstehen und somit neue Bindepositionen freigegeben werden. Ähnliches gilt auch für die beiden Konstrukte „dUC“ und „d3'X“, wobei sich die Proteine in ihrer Größe unterscheiden.

Bei den Kombinationsmutanten werden keine weiteren Proteine in dem Größenbereich von 170 kDa bis 220 kDa sichtbar, was darauf schließen lässt, dass immer eine Kombination aus mindestens zwei Regionen der 3'-UTR benötigt wird, um diese Proteine zu binden.

Fazit: Es wurden vier unterschiedlich große Proteine im Größenbereich von 170 kDa bis 220 kDa nachgewiesen, die direkt mit der HCV-RNA interagieren, wobei ein Protein der Größe 210 kDa sowohl die 5'-UTR als auch die 3'-UTR von HCV benötigt.

2.1.2.2 UV-Crosslink: Vergleich verschiedener Zell-Extrakte

Ein Aspekt der Interaktion des neu entdeckten HCV-bindenden Proteins p210 ist eine mögliche gewebsspezifische Expression. Daher wurden die UV-Crosslinks mit den in Abb. 13 dargestellten Konstrukten mit HeLa-Extrakt (Cilbiotech) sowie mit dem Kaninchen-Retikulozytenlysate (RRL, Promega) wiederholt. Beim RRL handelt es sich um ein Lysat der Vorläuferzellen der Erythrozyten, welche sehr große Enzymmengen für die Proteinsynthese besitzen. Diese Zellen werden aus Phenylhydrazin behandelten Kaninchen isoliert, lysiert und mit Micrococcal Nuklease behandelt, um endogene mRNA abzubauen und dadurch deren Translation auf ein Minimalmaß zu reduzieren. Diese Methode wurde erstmals von Pelham u. Jackson 1976 beschrieben, und seither wird RRL oft für *in vitro*-Translationsexperimente verwendet.

Bei der Untersuchung der Interaktion der „HCV sin“-RNA als Wildtypkonstrukt mit Proteinen wurden hier die einzelnen Extrakte miteinander verglichen. Wie in Abbildung 16 A ersichtlich, interagieren wieder die in Kapitel 2.1.2.1 beschriebenen Proteine mit dem Wildtypkonstrukt. So erkennt man auch hier PTB und weitere Proteine der Größe 30 - 46 kDa (z.B. Untereinheiten von eIF3). Im Vergleich zu Huh7- und HeLa-Lysat ist die Menge an Protein aus RRL, die an „HCV sin“ bindet, auffallend gering. Allerdings wurde auch, wie in Abb. 16 C ersichtlich, weniger RRL in diesen UV-Crosslink-Ansatz gegeben.

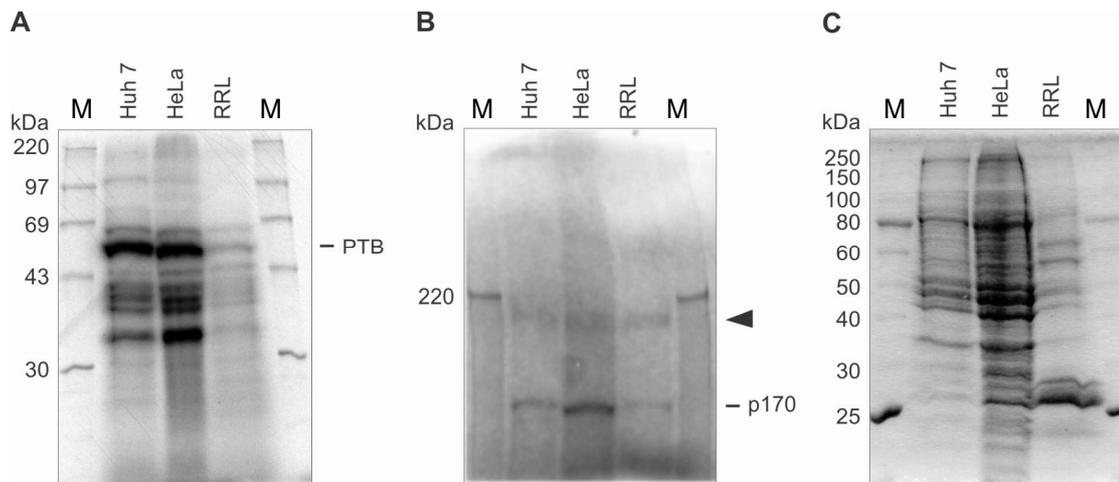


Abb. 16 Vergleich verschiedener Lysate durch UV-Crosslinks

(A) und (B) UV-Crosslink Experimente mit Huh7-, HeLa-Extrakt und Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL) mit „HCV sin“-RNA. (A) Auftrennung der Proteine durch ein SDS-12 % Polyacrylamidgel. (B) Darstellung des Proteins p210 mittels eines SDS-6 % Polyacrylamidgels und indirekte Autoradiographie für 7 Tage bei -70°C . (C) Gezeigt ist ein SDS-12 % Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind die Mengen an Lysat, die in den jeweiligen UV-Crosslinks eingesetzt wurden. Gekennzeichnet sind PTB und p170. Pfeil: p210. Marker: ^{14}C -Proteinmarker

In Abbildung 16 B ist der Größenbereich oberhalb von 150 kDa dargestellt. Hier ist zu sehen, dass in allen drei verwendeten Lysaten ein Protein der gleichen Größe von ca. 210 kDa zu sehen ist. Da allerdings alle drei Banden eine ähnliche Stärke aufweisen, ist die Folgerung, dass das Protein in RRL möglicherweise verstärkt exprimiert wird, da dort eine geringere Menge Lysat eingesetzt wurde (siehe Abb. 16 C). Allerdings kann man sagen, dass im Vergleich zu den anderen sichtbaren Proteinen, p210 wahrscheinlich in nur sehr geringem Maße exprimiert wird und daher schwer detektierbar ist.

Fazit: In drei verschiedenen Extrakten (HeLa, Huh7 und RRL) wurde das Protein der Größe 210 kDa nachgewiesen. Da es sowohl in Huh7- und HeLa-Extrakt wie auch in RRL vorkommt, ist damit eine mögliche Gewebsspezifität dieses Proteins für Hepatozyten widerlegt.

2.1.2.3 UV-Crosslinks zum Nachweis von p210 in verschiedenen Lysaten

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass in Huh7-, HeLa-Extrakt und RRL die Bindung der Proteine an die Wildtypvariante (HCV sin) sehr ähnlich sind und die Proteingrößen jeweils übereinstimmen. Da neben p210 bei der „HCV sin“-RNA noch weitere Proteine bei den Deletionsmutanten

„dVR“, „dUC“ und „d3'X“ erfasst wurden, sollte dieser Umstand auch in HeLa-Extrakt und RRL überprüft werden.

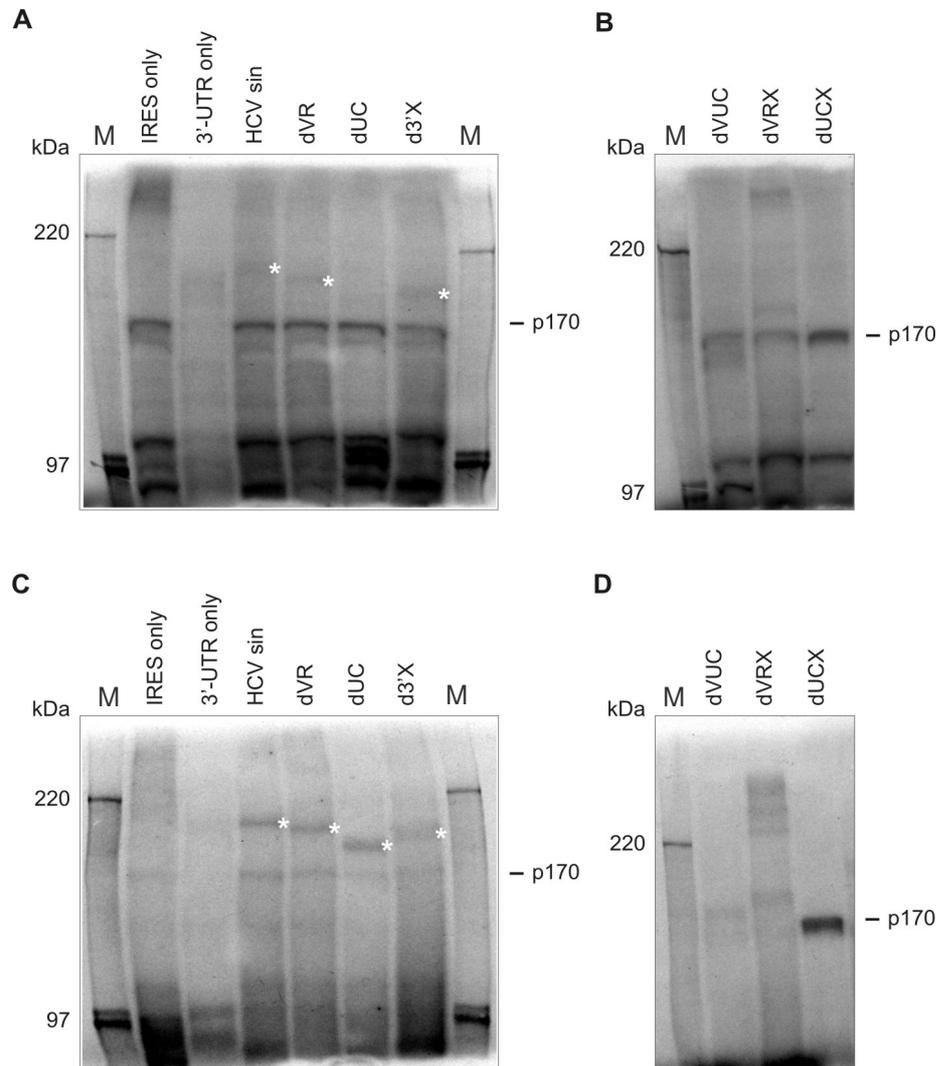


Abb. 17 Ergebnisse von UV-Crosslinks mit HeLa-Extrakt und Retikulozytenlysat

(A) und (B) UV-Crosslink-Experimente mit HeLa-Extrakt mit verschiedenen HCV-RNA-Konstrukten. (C) und (D) UV-Crosslink-Experimente mit Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL) mit verschiedenen HCV-RNA-Konstrukten. Die Proteine wurden auf einem SDS-6 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch indirekte Autoradiographie für 7 Tage bei -70°C sichtbar gemacht. Gekennzeichnet ist p170 als Untereinheit von eIF3. (*) Markierungen zeigen die neu beobachteten Proteine. Marker: ^{14}C -Proteinmarker

In den Abbildungen 17 A und B sieht man die Ergebnisse der UV-Crosslink-Ansätze mit HeLa-Extrakt, in Abbildungen 17 C und D die Ergebnisse mit Kaninchen-Retikulozytenlysat. Zur Orientierung wurde auch hier wieder p170 als Untereinheit von eIF3 gekennzeichnet. Bei den RNAs „HCV sin“, „dVR“, „dUC“ und „d3'X“ spiegelt sich das Bandenmuster der Experimente mit dem Huh7-Extrakt wider. Somit sind bei „HCV sin“ das p210 und bei den drei Deletionsmutanten die drei verschieden großen Proteine vorhanden. Alle vier beobachteten Proteine haben bei den Experimenten mit den jeweiligen Extrakten ungefähr die gleiche Größe.

Fazit: Auch mit HeLa-Extrakt und Kaninchen-Retikulozytenlysat ist mit der „HCV sin“-RNA das Protein p210 erkennbar. Die anderen drei unbekannt Proteine haben etwa die gleichen Größen wie im UV-Crosslink mit Huh7-Extrakt schon gezeigt wurde. Das lässt darauf schließen, dass es sich hierbei ebenso um die schon vorher im Huh7-Extrakt detektierten Proteine handelt, die aufgrund neuer Bindungsmöglichkeiten mit den nicht-translatierten Bereichen von HCV interagieren. Des Weiteren sind auch diese Proteine nicht gewebsspezifisch, da sie auch in HeLa-Zellen sowie in Kaninchen-Retikulozyten vorkommen.

2.1.3 Auftrennung der Proteine des Huh7-Extrakts

Bei den UV-Crosslink-Experimenten wurde gezeigt, dass die radioaktiv markierten HCV-RNA-Konstrukte gut mit Proteinen der verschiedenen Lysate interagieren und auf SDS-Polyacrylamidgelen darzustellen waren. Bei den Übersichten der SDS-12 % Polyacrylamidgele konnte man sehen, dass sehr viele Proteine in dem Größenbereich von 30 bis 69 kDa an die jeweiligen RNAs binden. Da jedoch das gesuchte Protein p210 in sehr geringem Maße im Vergleich zu den übrigen Proteinen im Lysat vorhanden ist, wäre es gut, wenn die großen Proteine angereichert würden. Dies kann dadurch erfolgen, dass entweder zuerst das Lysat mit großen Proteinen angereichert und kleine Proteine entfernt werden und man dieses konzentrierte Extrakt anschließend für einen UV-Crosslink verwendet, oder man reinigt die Ansätze erst nach dem Crosslink auf und isoliert die Fraktion, welche die großen Proteine enthält.

Die Isolierung verschiedener Proteine, hier die Anreicherung von Proteinen eines bestimmten Größenspektrums, kann entweder durch Filtration oder durch Gelchromatographie geschehen. Bei der Filtration können Filter verschiedener Porengrößen eingesetzt werden, durch die nur Proteine eines bestimmten Größenbereichs hindurch gelangen. Auf diese Art und Weise werden häufig kleine Proteine angereichert. Bei größeren Proteinen könnte das Lysat aber auch mittels Gelchromatographie aufgetrennt werden. Bei der Gelchromatographie werden jedoch die Proteine meist verdünnt, was bei den UV-Crosslink-Experimenten in dieser Arbeit hinderlich wäre, da die Detektion des Proteins p210 schon in unverdünnten Extrakten nicht immer in ausreichendem Maße möglich war. Daher wurde überprüft, ob sich das gesuchte Protein auch über eine Affinitätschromatographie aufreinigen und dabei gleichzeitig anreichern lässt. Dabei spielt zum einen die Ladung und zum anderen die Größe des gewünschten Proteins eine Rolle bei der Auswahl der Matrix.

2.1.3.1 Auswahl der Säulenmatrix

Bei der Anreicherung von Proteinen aus dem Huh7-Extrakt wurde in diesem Fall auf die Säulenmatrix 15Q bzw. 15S zurückgegriffen. Die hydrophilen Matrices der Source 15 bestehen aus kleinen, festen Polystyrol/Divinylbenzol-Kügelchen, die einen Durchmesser von 15 µm besitzen. Diese Kügelchen sind entweder mit quarternären Ammonium-Ionen (Q) oder mit Methylsulfonat (S) als Ionenaustauscher substituiert. Daher ist Source 15Q ein Anionen-, Source 15S dagegen ein Kationenaustauscher. Diese Art der Matrices erlaubt es, in einem weiten pH-Spektrum zu arbeiten, um Proteine zu eluieren.

Die Auftrennung der Proteine wurde im so genannten Batch-Verfahren getestet, da der spätere Umgang mit radioaktiven Proben bei dieser Methode einfacher ist. Hierbei werden die Ansätze nicht mittels einer Säule auf einer FPLC-Anlage (engl. *fast protein liquid chromatography*) gereinigt, sondern in einem kleineren Maßstab, in einem Eppendorfgefäß.

Die Matrices wurden dabei zunächst äquilibriert und anschließend mit den Proben unter Rotation inkubiert. Der Überstand wird abgenommen, die Matrix gewaschen und die Proteine dann mit steigender Kaliumionen-Konzentration im Puffer eluiert (siehe Kapitel 4.2.3.3). Zu Beginn wurde getestet, welche Säulenmatrix für die weiteren Experimente geeignet ist. Da möglicherweise beim Mischen eines UV-Crosslink-Ansatzes mit den Säulenmatrices noch kleine RNA-Oligonukleotide beziehungsweise freie Nukleotide vorliegen, wurde dafür zuerst die Bindungsaffinität der Säulenmatrices zu Ribonukleotiden getestet. Hier wurde radioaktiv markiertes rUTP benutzt, um die Elution von den Säulen besser verfolgen zu können.

In Abbildung 18 sieht man den Vergleich der zwei Experimente mit den Matrices Source 15Q und 15S. Während die Nukleotide bei Source 15Q weitestgehend an der Matrix haften, verbleiben sie bei Source 15S hauptsächlich im Überstand oder werden bei den ersten Elutionsschritten von der Matrix entfernt. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Source 15Q positiv geladen ist und somit die negativen Nukleotide besser bindet als eine negativ geladene Source 15S Matrix.

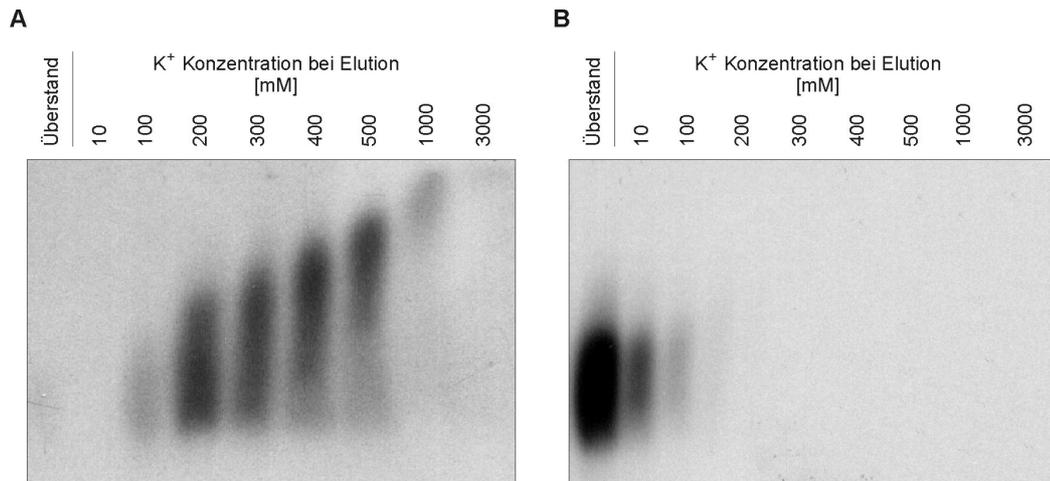


Abb. 18 Analyse der Bindung von ^{32}P -UTP an Source 15Q und 15S Matrices

(A) und (B) zeigen das Bindungsverhalten von radioaktiv markierten rUTPs zu Source 15Q oder Source 15S. (A) Dargestellt ist der Gehalt an ^{32}P -UTP in den verschiedenen Elutionsschritten nach einer Inkubation der Matrix *Source 15Q* mit ^{32}P -UTPs für 10 min. (B) Dargestellt ist der Gehalt an ^{32}P -UTP in den verschiedenen Elutionsschritten nach einer Inkubation der Matrix *Source 15S* mit ^{32}P -UTPs für 10 min. Die radioaktiv markierten rUTPs wurden mit einem denaturierenden 6 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch direkte Autoradiographie für 5 min bei RT sichtbar gemacht.

Fazit: Für die weiteren Experimente wurde die Säulenmatrix Source 15S verwendet, da an dieser Matrix keine freien Nukleotide haften bleiben und dadurch eine bessere Erfassung der Proteine aus einem UV-Crosslink gegeben ist. Allerdings ist nicht gewiss, ob das gesuchte Protein auch an diese Matrix bindet wird, da unklar ist, welche Ladung p210 besitzt.

2.1.3.2 Auftrennung bei verschiedenen pH-Werten

Als nächsten Schritt galt es, den optimalen pH-Wert zu bestimmen. Dieser Wert sollte so sein, dass die Proteine des Huh7-Lysats am besten voneinander getrennt werden.

Bei diesem Test wurden alle Puffer auf die pH-Werte 6, 7 oder 8 eingestellt, um die Bindung der Proteine an die Matrix und ihre Elution von der Matrix zu untersuchen. In Abbildung 19 ist das Resultat der drei Experimente zu sehen. Als Kontrolle wurde die Menge an Lysat aufgetragen, die in das jeweilige Experiment eingesetzt wurde. Danach folgen der Überstand, der Waschschritt (W1) und die Elutionsschritte (E1-E6).

Bei der Proteinauftrennung über Source 15S kann man deutlich sehen, dass die größte Menge an Protein entweder im Überstand verbleibt oder während des ersten Waschschrittes von der Säule entfernt wird. Die darauf folgenden Elutionsschritte lassen kaum noch Protein erkennen.

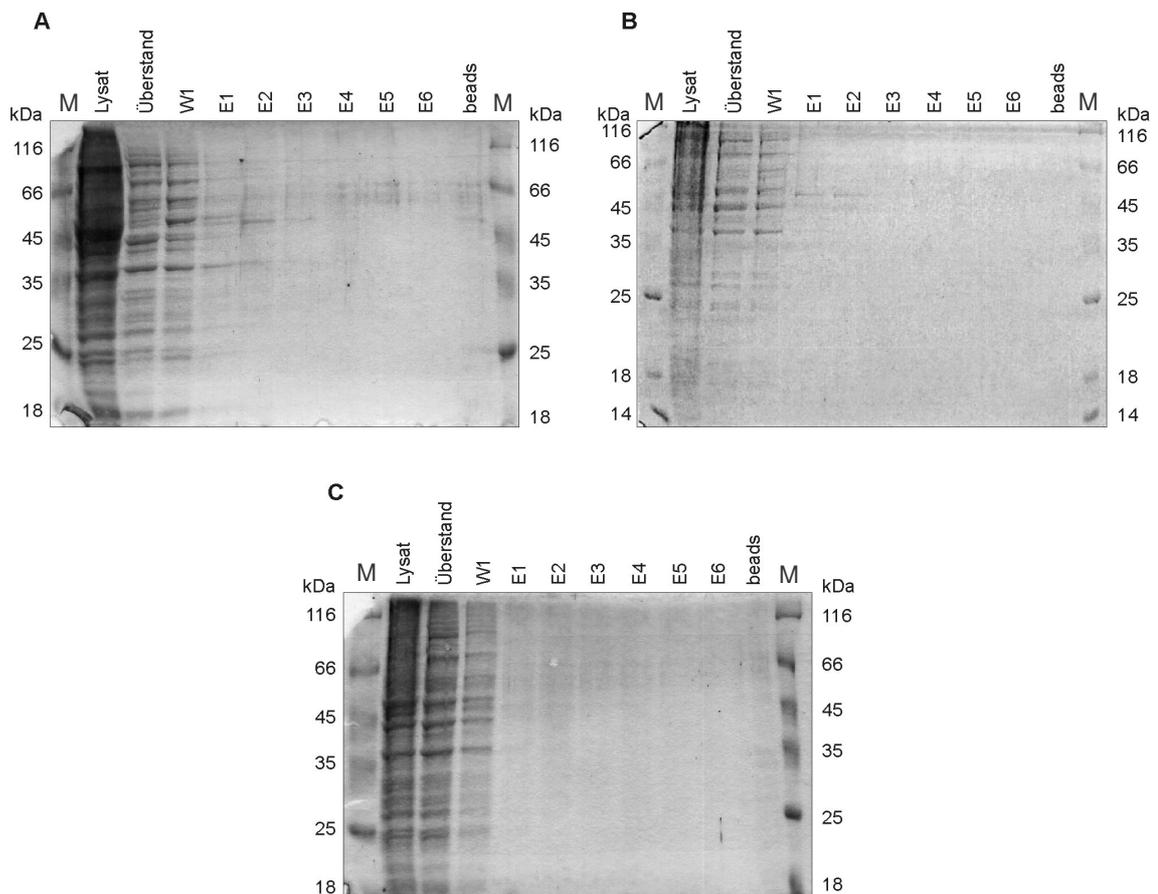


Abb. 19 Proteinauftrennung des Huh7-Lysats mit Source 15S bei unterschiedlichen pH-Werten (A), (B) und (C) zeigen die Bindung von Proteinen an Source 15S bei unterschiedlichen pH-Werten. Dargestellt sind Überstände der Säulenmatrix nach der jeweiligen Inkubation von 10 min rotierend bei RT. Nachdem die Säule gewaschen wurde (W1), wurden die Proteine in den Elutionsschritten (E1-6) von der Matrix eluiert. beads: Elution der an der Matrix verbleibenden Proteine im Probenpuffer. Die Auftrennung der Fraktionen erfolgte über ein SDS-12 % Polyacrylamidgel mit anschließender Coomassie-Färbung. (A) Pufferbedingungen mit pH 6. (B) Pufferbedingungen mit pH 7. (C) Pufferbedingungen mit pH 8.

Fazit: Die Auftrennung des Proteingemisches aus Huh7-Lysat ergab keine gezielte Fraktionierung der Proteine. Die Hauptmenge an Protein band entweder gar nicht an der Matrix oder wurde im ersten Waschschrift entfernt. Dabei spielt der pH-Wert bei der Bindung und Elution keine große Rolle.

2.1.4 Kompetitions-Crosslinks mit Huh7-Extrakt

Da die Auftrennung bzw. Anreicherung der Proteine aus dem Huh7-Lysat nicht erfolgreich war, wurde das Lysat weiterhin unfraktioniert für die weiterführenden UV-Crosslink-Experimente eingesetzt.

Da in einigen Versuchen das Protein p210 als Interaktionspartner der „HCV sin“-RNA identifiziert wurde und drei weitere noch nicht analysierte Proteine entdeckt wurden, wurde nun die Spezifität dieser Proteine untersucht. Dabei

wurde zum einen getestet, ob die Bindung des p210 durch nicht radioaktiv markierte „HCV sin“-RNA reduziert wird und damit ein schwächeres Signal bei der Autoradiographie liefert. Zum anderen wurde in den folgenden Experimenten geprüft, ob die 3'-UTR von HCV bei dieser Bindung beteiligt ist, und wenn ja, welche Region der 3'-UTR dabei eine Rolle spielt. Als Kontrolle dienten die RNAs „3'-UTR only“ und „IRES only“, da das Protein bei den vorangegangenen Versuchen beide Regionen benötigte, um zu binden.

Bei den Kompetitions-Crosslinks wurden wie üblich verschiedene Proteine des cytoplasmatischen Huh7-Extrakts mit Hilfe des UV-Crosslinks an die radioaktiv markierte „HCV sin“-RNA gebunden. Jedoch wurden zusätzlich steigende Mengen an entsprechender nicht radioaktiv markierter HCV-RNA dazugegeben. Somit wurde die radioaktive RNA (HCV sin) mit einer nicht radioaktiven RNA in einen Ansatz gegeben und damit die Bindung an das entsprechende Protein gegebenenfalls kompetiert. Da eine Bindung zwischen einer nicht radioaktiv markierten RNA und einem Protein durch Autoradiographie nicht mehr detektierbar ist, sollten bei einer erfolgreichen Competition durch steigende Mengen an unmarkierter RNA die Signale der zu beobachtenden Proteinbanden schwächer werden.

Durch einen solchen Kompetitions-Crosslink wird die Stärke der Bindung eines Proteins an die RNA analysiert, wohingegen im normalen UV-Crosslink-Experiment die Detektion eines Proteins nicht nur von der Affinität von einem Protein zur RNA abhängt, sondern auch von verschiedenen anderen Parametern wie zum Beispiel der räumlichen Nähe reaktiver Aminosäurereste zu Pyrimidinen beziehungsweise dem zur Markierung verwendeten Nukleotid.

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der verschiedenen Kompetitions-Crosslinks zusammengefasst. Um einen Vergleich der Signalstärke der Proteinbanden besser zeigen zu können, ist je Kompetitionsreihe, eine Spur mit einem UV-Crosslink-Ansatz ohne Kompetitor-RNA zu sehen. Bei den Competitionen wurden Standard UV-Crosslinks mit radioaktiver „HCV sin“-RNA durchgeführt, bei denen jeweils unterschiedliche Mengen (-, 1x, 2x, 5x und 10x Überschuss) an nicht radioaktiv markierter RNA hinzu gegeben wurden.

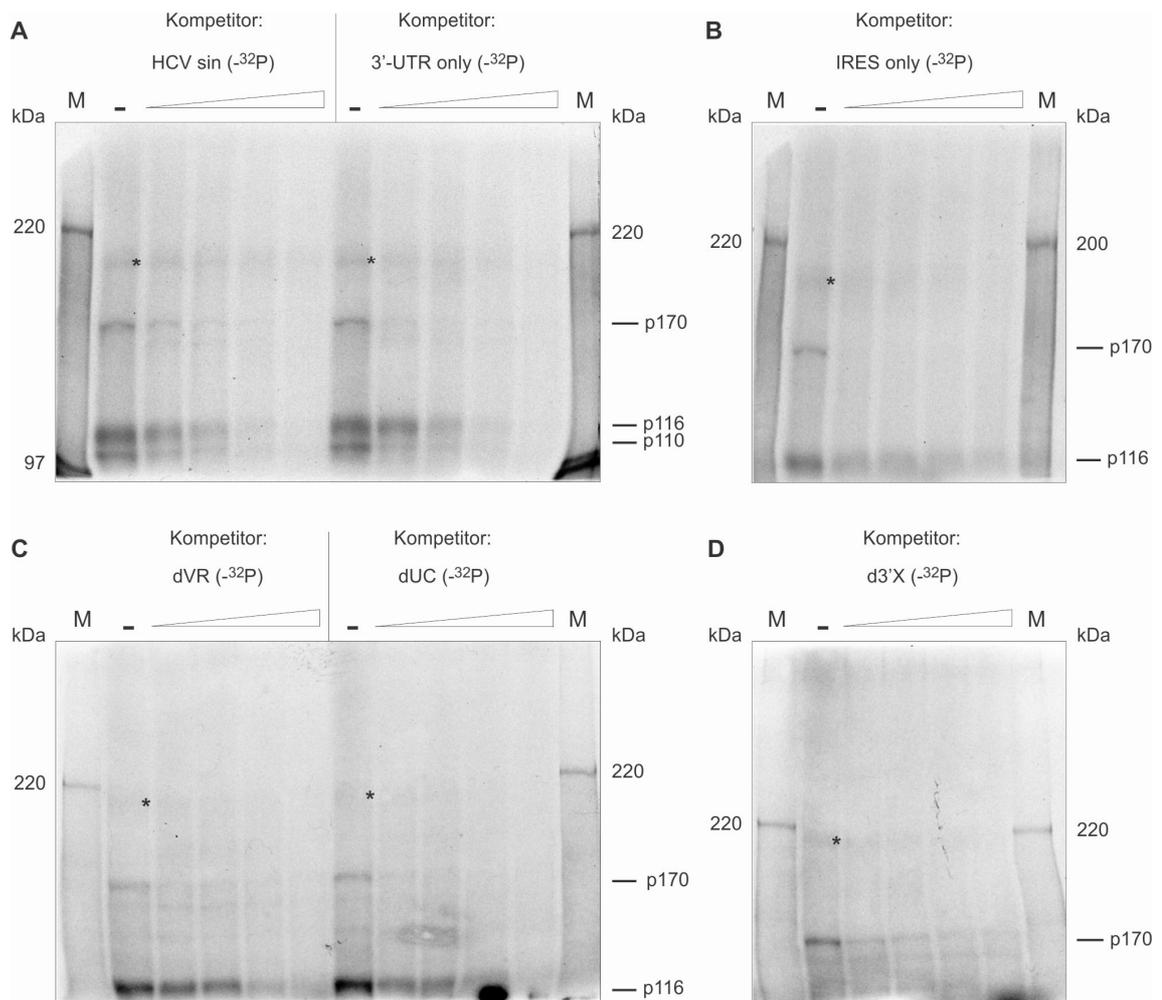


Abb. 20 Kompetitions-Crosslinks mit Huh7-Extrakt

(A) bis (D) UV-Crosslink-Experimente mit Huh7-Extrakt mit ^{32}P -markiertem „HCV sin“-RNA-Konstrukt und verschiedenen nicht radioaktiv markierten HCV-RNA-Kompetitoren in den Überschussmengen 1x, 2x, 5x und 10x. (A) Konkurrenz mit nicht radioaktiver „HCV sin“ und „3'-UTR only“-RNA. (B) Konkurrenz mit „IRES only“. (C) Konkurrenz mit „dVR“ und „dUC“. (D) Konkurrenz mit „d3'X“. Die Proteine wurden jeweils auf einem SDS-6 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch indirekte Autoradiographie für 7 Tage bei -70°C sichtbar gemacht. (*) Markierung des p210. „-“: ohne Kompetitor-RNA. „ ^{32}P “: ohne Einbau von ^{32}P -UTPs. M: ^{14}C -Proteinmarker

Bei den Kompetitions-Crosslinks mit den Kontroll-RNAs „3'-UTR only“ und „IRES only“ ist eine sehr schwache Bande bei etwa 210 kDa zu sehen, deren Signal kaum abnimmt, obwohl die kompetierende RNA-Menge steigt. Bei einer Konkurrenz mit „IRES only“ ist eine drastische Reduktion der Detektierbarkeit von p170 sehr gut zu erkennen. Bei diesem Ansatz kann nun eIF3 auch an das nicht radioaktiv markierte „IRES only“-RNA-Konstrukt binden und liefert daher kein Signal mehr. Obwohl bei „3'-UTR only“ das Signal des Proteins p210 bei einem zehnfachen Überschuss etwas an Intensität abnimmt, kann das Protein eventuell auch nur diesen Teil der nicht translatierten Region von HCV binden. Da aber ebenfalls p170 sowie p116 und p110 als Untereinheiten von eIF3 an Signalstärke abnehmen, ist dies wohl keine ausreichende Erklärung, da diese Proteine gewöhnlich an die IRES binden. Die übrigen Kompetitions-Crosslinks

mit „HCV sin“, „dVR“, „dUC“ und „d3'X“ als Kompetitor-RNAs lassen die Proteinbande bei 210 kDa auch nur sehr schwach erkennen, wobei auch hier kein bedeutender Unterschied durch eine Kompetition zu beobachten ist.

Fazit: Bei allen sechs gezeigten Kompetitionsexperimenten ist die Proteinbande von 210 kDa nur schwer zu detektieren. Allerdings wird in den einzelnen Tests kein deutlicher Unterschied in der Intensität der p210-Bande sichtbar, obwohl die Proteine p116 und p110 mit steigender Konzentration an Kompetitor-RNA an Signal-Intensität verlieren und dadurch das Kompetitionsexperiment technisch betrachtet als erfolgreich gewertet werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die UV-Crosslink-Experimente mit Huh7-, HeLa-Extrakt und RRL verschiedene neue Proteine in dem Größenbereich von 180 – 210 kDa detektiert wurden. Jedoch ist in allen erfolgten Experimenten die Darstellung dieser Proteine und insbesondere des Proteins p210 äußerst schwierig gewesen, da sie sehr wahrscheinlich in sehr geringen Mengen vorliegen und demzufolge oft nicht detektierbar waren. Dabei wurde eine maximale Menge an Lysat und radioaktiv markierter RNA eingesetzt. Allerdings wurden nur sehr schwache Signale erfasst, die auch mit einem PhosphorImager, der besonders sensitiv gegenüber ³²P-Strahlung ist, nicht immer detektierbar waren (Daten nicht gezeigt). Damit wurde mit dieser Nachweismethode ein Detektionslimit erreicht, was es nicht sinnvoll erscheinen ließ, weitere Tests in Bezug auf p210 durchzuführen.

Die Experimente mit p210 wurden daher an diesem Punkt aus technischen Gründen abgebrochen.

2.2 Diskussion Teil I

2.2.1 Interaktion der HCV-RNA mit zellulären Proteinen

Wie alle Viren rekrutiert auch HCV nach der Infektion der Wirtszelle viele zelluläre Proteine für seinen Replikationszyklus. Durch das HCV-Genom selbst werden nur einige wenige virale Proteine kodiert. So beinhaltet das HCV-Genom die Erbinformation für Nicht-Strukturproteine wie p7, NS1, NS2, NS3, NS4A/B oder NS5A/B sowie für Strukturproteine wie das Core-Protein und die Hüllproteine E1 und E2 (Bartenschlager u. Lohmann, 2000). Alle weiteren Proteine oder Faktoren, die zum Beispiel für die Translation benötigt werden, stammen von der Wirtszelle. Eine Vielzahl zellulärer Proteine bindet an die 5'-UTR der HCV-RNA und kann deren Translation regulieren. Auch die 3'-untranslatierte Region von HCV wird von einigen Proteinen als Bindungsstelle erkannt (s. Kapitel 1.1.2).

Bei dieser Arbeit sollte ein Protein charakterisiert werden, das eine Größe von ca. 210 kDa (p210) besitzt. Dieses Protein wurde in vorangegangenen Experimenten in dieser Arbeitsgruppe detektiert. Daraus ergaben sich die Fragen: Bindet dieses Protein (p210) spezifisch an die HCV-IRES? Um welches Protein handelt es sich dabei und welche Funktion übt es möglicherweise im Replikationszyklus von HCV aus? Welche Regionen der HCV-RNA sind für die Bindung von p210 notwendig?

2.2.2 Analyse der Bindung von p210 an die HCV-RNA

Mit Hilfe von UV-Crosslink-Experimenten wurde die Bindung des Proteins p210 an die HCV-RNA nachgewiesen. Dieses Protein benötigt für seine Bindung sowohl die 5'- als auch die 3'-UTR von HCV, wobei diese Regionen gemeinsam vorliegen müssen.

Für die Identifizierung des unbekanntes Proteins p210 wurde die Methode des UV-Crosslinks eingesetzt. Dabei kann eine direkte Interaktion zwischen Proteinen und RNA nachgewiesen werden (Pelletier u. Sonenberg, 1985). Der Vorteil eines UV-Crosslinks besteht darin, dass es sich um eine schnelle und einfache Methode handelt, die auch sehr kurz dauernde Bindungen nachweisen kann. Zudem handelt es sich nach dem Crosslinken um eine kovalente Verknüpfung zwischen der zu untersuchenden RNA und dem gebundenen Protein, so dass der Reaktionsansatz unempfindlicher gegenüber Scherkräften

ist und die Interaktionspartner nicht dissoziieren können. Insofern ist der UV-Crosslink für die Detektion von Proteinen, welche mit der HCV-RNA interagieren, eine geeignete Methode.

Der Nachteil eines UV-Crosslinks dagegen ist, dass nur etwa 10 % der vorhandenen Proteine mit der RNA verknüpft werden und mittels Autoradiographie nachweisbar sind (Song *et al.*, 2005). Daher wurde bei den in dieser Arbeit durchgeführten UV-Crosslinks eine große Menge an radioaktiv markierter RNA (8 pmol) eingesetzt, um eine ausreichende Menge an markierten Proteinen zu erhalten.

Da HCV speziell Hepatozyten infiziert, wurde für die UV-Crosslink-Experimente Extrakt aus Huh7-Hepatoma-Zellen hergestellt. Aus diesem Extrakt sollten große Proteine angereichert werden, um bei der Detektion des Proteins p210 stärkere Signale zu erhalten. Eine Methode der Anreicherung ist die Gelchromatographie mit einer FPLC (engl. *fast protein liquid chromatography*). Das erhaltene Eluat würde jedoch das gesuchte Protein in weniger konzentrierter Form enthalten. Außerdem würde eine große Menge an Lysat für die Fraktionierung erforderlich sein. Diese Menge an Lysat war jedoch limitierend, da die Bereitstellung einer ausreichenden Menge an adhären Zellen (Huh7) im benötigten Ausmaß nicht möglich war. Daher wurde mit Hilfe von Ionenaustauscher-Matrices (Source 15Q und 15S) versucht, das Lysat zu fraktionieren, was allerdings nicht das erhoffte Ergebnis lieferte. Daher wurden letztlich unfraktionierte Lysate in die UV-Crosslink-Experimente eingesetzt.

Für die Suche nach neuen Bindungspartnern für die HCV-RNA wurden verschiedene HCV-RNA-Konstrukte radioaktiv markiert und in UV-Crosslink-Experimenten mit Huh7-Extrakt verwendet. Da in vorangegangenen Tests festgestellt wurde, dass der Einbau von radioaktiv markiertem rUTP bei der Crosslinkdarstellung mehr und intensivere Banden zeigt als nach Einbau von radioaktiv markiertem rATP, rCTP oder rGTP (Dissertation Song, 2006), wurden in dieser Arbeit während der *in vitro*-Transkription die RNAs mit ³²P-rUTP markiert.

Die Ergebnisse der UV-Crosslinks zeigen, dass eine Vielzahl von Proteinen an die HCV-RNA bindet. Die meisten dieser Proteine haben eine Größe von 30 bis 69 kDa. In früheren Studien wurde schon gezeigt, dass Proteine wie PTB (Luo, 1999), das La Protein (Fontanes *et al.*, 2009), hnRNP L (Hwang *et al.*, 2009), PCBP (Spangberg u. Schwartz, 1999) oder diverse Untereinheiten eukaryotischer Initiationsfaktoren an die HCV-RNA binden. Neben diesen kleineren Proteinen können auch größere Proteine wie eIF3-Untereinheiten (110, 116 und 170 kDa) an die HCV-RNA binden. Bei den Experimenten in dieser Arbeit wurden vier unbekannte Proteine im Größenbereich von 175 und

210 kDa detektiert. Das gesuchte Protein p210 interagiert dabei ausschließlich mit der RNA „HCV sin“, die beide vollständigen UTRs enthält, während drei weitere unbekannte Proteine an die Deletionsmutanten „dVR“, „dUC“ und „d3'X“ binden. Die Bindung der drei Proteine an die Deletionsmutanten kann durch eine Veränderung der Sekundärstruktur der RNA ausgelöst worden sein. Durch die Deletion einzelner Regionen könnten neue Bindungsstellen entstanden sein, die von anderen, eventuell unspezifisch bindenden Proteinen erkannt wurden. Die p210-Bindung wurde jedoch nur bei der Wildtypvariante der HCV-RNA detektiert, was dadurch zu erklären ist, dass für die Bindung sowohl die 5'- als auch die 3'-UTR von HCV erforderlich ist. Entweder benötigt p210 eine Kombination dieser Bereiche für eine Sequenzerkennung und anschließende Bindung oder es erfasst hauptsächlich die Sekundärstruktur, die nur dann gegeben ist, wenn die 5'- und die 3'-Region gemeinsam vorliegen und dabei auch mindestens zwei Regionen der 3'-UTR anwesend sind. Die resultierende Protein-vermittelte Interaktion zwischen den beiden untranslatierten Bereichen könnte somit auf einen Ringschluss der RNA hinweisen (s. Abb. 21), der die RNA-Enden in eine räumliche Nähe bringt und damit die Reinitiation der Translation begünstigt.

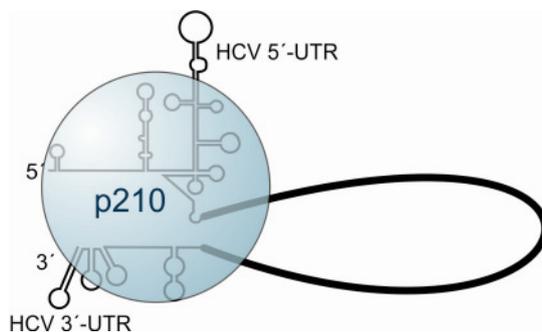


Abb. 21 Interaktion von p210 mit der HCV-RNA

Dargestellt ist eine mögliche Interaktion von p210 mit den nicht translatierenden Bereichen der HCV-RNA. Da dieses Protein nur an den Wildtyp bindet, benötigt es vermutlich alle Bereiche der 5'- und 3'-UTR.

Demzufolge könnte die Translationseffizienz durch eine schnellere Reassemblierung der Ribosomenuntereinheiten gesteigert werden. Da auch bei cap-abhängiger Translation ein Ringschluss der RNA durch PABP (Poly(A)-Bindeprotein), PAIP1 (PABP-interagierendes Protein 1) und eIF4G gebildet wird (Gale *et al.*, 2000), könnte auch hier bei HCV ein ähnlicher Mechanismus bei IRES-abhängiger Translation vorliegen.

2.2.3 p210 wird nicht Hepatozyten-spezifisch exprimiert

Da HCV gezielt Hepatozyten infiziert und p210 an die HCV-RNA bindet, wäre es möglich, dass dieses Protein somit die Translation der HCV-RNA speziell in Hepatozyten erleichtert beziehungsweise beschleunigt und damit eventuell zur gewebsspezifischen HCV-Infektion beiträgt.

Daher wurden die UV-Crosslinks mit den unterschiedlichen RNA-Konstrukten auch mit HeLa-Extrakt und Retikulozytenlysat aus Kaninchen (RRL) durchgeführt. Bei den Ergebnissen fällt auf, dass die Proteinbandenverteilung nach den UV-Crosslink-Experimenten mit HeLa-Extrakt und RRL große Ähnlichkeit mit dem Bandenmuster der Crosslink-Experimente mit Huh7-Extrakt hat. Auch mit HeLa-Extrakt und RRL binden verschiedene Initiationsfaktoren, ITAFs (engl. IRES trans-acting factors) und weitere zelluläre Proteine an die HCV-RNA. Bei einer genaueren Betrachtung ist das Protein p210 sowohl in HeLa- als auch in Retikulozytenlysat zu erkennen (s. Abb.16). Zudem sind die drei anderen unbekannt Proteine im Größenbereich von 175 bis 210 kDa detektierbar, die an die Deletionsmutanten „dVR“, „dUC“ und „d3'X“ binden (s. Abb. 17).

Das Protein p210 ist somit höchstwahrscheinlich in vielen Zelltypen vorhanden und möglicherweise ein ubiquitär vorliegendes Protein, das eventuell an allgemeinen Prozessen des Zellmetabolismus beteiligt ist. Da das Hepatitis C Virus viele für seine Replikation benötigten Proteine von der Zelle übernimmt, könnte es sich auch bei p210 um ein Protein des Proteinbiosynthese-Apparates oder um einen anderen Faktor handeln, welcher bis jetzt noch nicht als Interaktionspartner identifiziert wurde.

2.2.4 Eine spezifische Bindung von p210 an die HCV-RNA konnte nicht nachgewiesen werden

Um herauszufinden, ob die Bindung von p210 an die HCV-Wildtyp-RNA spezifisch ist, wurden so genannte Kompetitions-Crosslinks durchgeführt.

Durch einen solchen Kompetitions-Crosslink wird die Stärke der Bindung eines Proteins an die RNA analysiert, wohingegen im normalen UV-Crosslink-Experiment die Detektion eines Proteins nicht nur von der Affinität von einem Protein zur RNA abhängt, sondern auch von verschiedenen anderen Parametern wie der räumlichen Nähe reaktiver Aminosäurereste zu Pyrimidinen und dem zur Markierung verwendeten Nukleotid. Somit ist der Kompetitions-Crosslink unabhängig von der Betrachtung kovalenter Bindungen, und es geht nur darum, dass ähnliche RNAs um die Bindung an das gleiche Protein

kompetieren. Sobald eine RNA mit ähnlicher Sequenz zum Wildtyp von p210 gebunden wurde, kann die untersuchte radioaktiv markierte RNA (HCV sin) nicht mehr an das Protein binden, und dies resultiert in einer schwächeren Signal-Intensität bei der Autoradiographie.

Bei diesen Kompetitions-Crosslinks wurden UV-Crosslinks mit radioaktiv markierter „HCV sin“-RNA und nicht radioaktiv markierten Kompetitor-RNAs in einem Ansatz mit Huh7-Extrakt durchgeführt. Bindet bei diesen Ansätzen nun das p210 an die unmarkierte RNA, so kann diese Bindung nicht detektiert werden, da das Protein nach dem Crosslink nicht radioaktiv markiert ist und damit kein Signal bei der Autoradiographie liefern kann. Bei einer erfolgreichen spezifischen Konkurrenz sollte demzufolge die Signalstärke der gesuchten Bande (210 kDa) nur bei einer Konkurrenz mit der „HCV sin“-RNA abnehmen. Allgemein kann gesagt werden, dass die Methode der Konkurrenz in den durchgeführten Experimenten erfolgreich war, da bei allen Konkurrenzreihen mit zunehmender Menge unmarkierter RNA die Signale der eIF3-Untereinheiten (110, 116 und 170 kDa) an Stärke verloren. Der UV-Crosslink mit der radioaktiv markierten „HCV sin“-RNA, in Abwesenheit von Kompetitor-RNA, zeigte eine sehr schwache Bande bei 210 kDa. Der Signalarückgang dieser Bande war allerdings weder bei einer Konkurrenz mit nicht radioaktiv markierter „HCV sin“-RNA noch bei der Konkurrenz mit den Deletionsmutanten deutlich zu sehen. Bei allen Ansätzen erscheint lediglich eine schwache Bande, die schwer zu detektieren war, wodurch ein möglicher Signalarückgang nicht unbedingt auf die Konkurrenz schließen lässt. Zudem verlieren die Banden, die vermutlich eIF3-Untereinheiten darstellen, auch bei einer Konkurrenz mit „3'-UTR only“ an Intensität, obwohl Initiationsfaktoren nur an die IRES binden sollten. Insofern konnte eine spezifische Bindung des Proteins p210 an die 5'- und 3'-UTRs der HCV-RNA (HCV sin) nicht eindeutig bestätigt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Protein mit einer ungefähren Größe von 210 kDa als Bindungspartner der HCV-RNA detektiert wurde. Dieses Protein ist nicht gewebsspezifisch exprimiert, was auf eine mögliche Funktion in allgemeinen zellulären Prozessen hinweist. Wegen der sehr geringen Abundanz des Proteins und den daraus resultierenden Schwierigkeiten beim Nachweis des Proteins war es mit den zur Verfügung stehenden Mitteln technisch leider nicht möglich, eine spezifische Bindung des p210 an die HCV-RNA nachzuweisen und eine genaue Identifizierung des Proteins p210 durchzuführen.

Teil II

2.3 FACS-Analyse von Huh7- und HeLa-Zellen nach entsprechender Synchronisierungsmethode

Der Zellzyklus besteht vereinfacht dargestellt aus zwei Phasen; der Mitose-Phase und der Interphase. Die Interphase wird wiederum in die G_1 -, S- und G_2 -Phase aufgeteilt (s. Einleitung). G_0 geht als Ruhephase aus G_1 hervor. Viele Zelltypen verbleiben eine gewisse Zeit in der G_0 -Phase, können aber dann wieder in G_1 zurückkehren. Zu diesen Zellen gehören beispielsweise Hepatozyten (Dancygier, 2003).

Die Zellzyklusphasen können leicht durch eine FACS (engl. Fluorescence activated cell sorting)-Messung dargestellt werden. Dabei werden die zu messenden mit Propidiumiodid gefärbten Zellen durch Kapillaren gesogen und mit Lasern bestrahlt. Je nach Größe und Granularität der Zellen erhält man ein Streuungsprofil, welches von Detektoren erfasst werden kann. Das so genannte Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Scatter, FSC) ist ein Maß für die Lichtbeugung, das das Volumen der Zelle und somit deren Größe widerspiegelt. Das Seitwärtsstreulicht (engl. Sideways Scatter, SSC) dagegen ist ein Maß für die Granularität der Zelle, da der Lichtstrahl an Organellen stärker abgelenkt wird als in löslichem Zytosol.

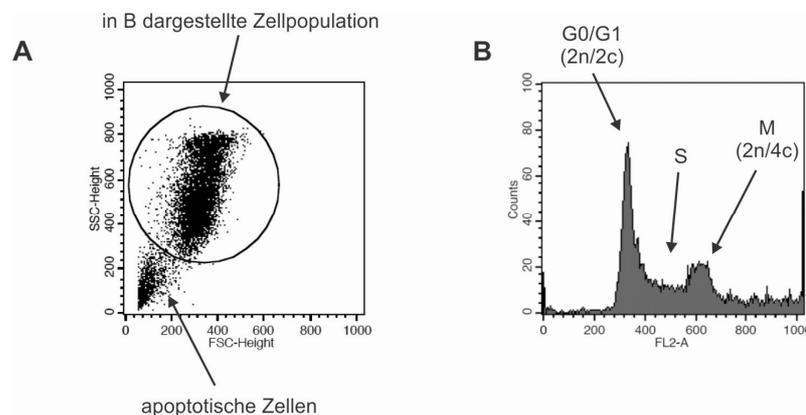


Abb. 22 Darstellung eines Ergebnisses einer FACS-Analyse

(A) Darstellung einer FACS-Messung aller Propidiumiodid-gefärbten Zellen. (B) Darstellung der Propidiumiodid-Färbung der aus (A) ausgewählten Zellpopulation für die Bestimmung der DNA-Menge und damit der Zellzyklusphase. G₀/G₁: G₀/G₁-Phase. S: S-Phase. M: G₂/M-Phase. 2n: diploid. 2c: 2-Chromatid-Chromosomen. 4c: 4-Chromatid-Chromosomen. Counts: Zellzahl. FL2-A: Fluoreszenzintensität.

In Abbildung 22 ist das Ergebnis einer FACS-Messung exemplarisch dargestellt. Dabei sind in Teil A der Abbildung die Zellpopulationen anhand der beiden Streuungsverhältnisse aufgezeigt. Kleine Zellen mit einem niedrigen FSC und niedrigem SSC lassen auf apoptotische Zellen schließen, wobei größere Zellen mit höherem SSC Wert auf intakte Zellen mit normalem DNA-

Gehalt hinweisen. Würde oberhalb dieser Zellpopulation noch weitere Zellen detektiert werden, wären diese polyploid. Die ausgewählte und markierte Zellpopulation wird anschließend gemessen und als Graphik wie in Abbildung 22 B angezeigt. Bei dieser Darstellung bedeutet „FL2-A“ die Fluoreszenz-Intensität, die durch die Propidiumiodid-Färbung gemessen wird, und „Counts“ gibt die Anzahl der bei der jeweiligen Intensität detektierten Zellen wieder. So werden die unterschiedlichen Zellzyklusphasen und die Zellzahl anhand der gemessenen DNA-Menge veranschaulicht. Eine geringe Fluoreszenz bedeutet, dass es sich um diploide Zellen mit Ein-Chromatid-Chromosomen ($2n/2c$, diploid mit 2-Chromatid-Chromosomen) handelt, die sich in der G_0 - bzw. G_1 -Phase befinden. Eine starke Fluoreszenz entspricht dagegen einem Satz Zwei-Chromatid-Chromosomen ($2n/4c$, diploid mit 4-Chromatid-Chromosomen) und daher dem Ausgangspunkt der Mitose-Phase.

2.3.1 Synchronisierung der Zellen in der G_2/M -Phase durch Nocodazol-Behandlung

Um die Zellen in der M-Phase untersuchen zu können, können Zellen mit Nocodazol behandelt und somit synchronisiert werden. Nocodazol hemmt reversibel die Polymerisierung von Mikrotubuli (Zieve *et al.*, 1980), wodurch kein Spindelapparat für eine erfolgreiche Mitose entstehen kann. Hier wurde die Synchronisierung in der G_2/M -Phase erreicht, indem die Zellen für 17 Stunden mit Nocodazol (400 ng/ml bei Huh7-, 300 ng/ml bei HeLa-Zellen) behandelt wurden. Die synchronisierten Zellen wurden dann mit 1x PBS gewaschen, mit Propidiumiodid gefärbt und mit Hilfe eines FACS analysiert.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der FACS-Messung nach einfacher Nocodazol-Behandlung dargestellt. Durch die Synchronisierung der Huh7-Zellen erkennt man beim Zeitpunkt „0h“, also direkt nach der Nocodazol-Behandlung, einen stärkeren Peak beim 4-Chromatid-Chromosomen-Stadium (4c), welches die G_2/M -Phase darstellt.

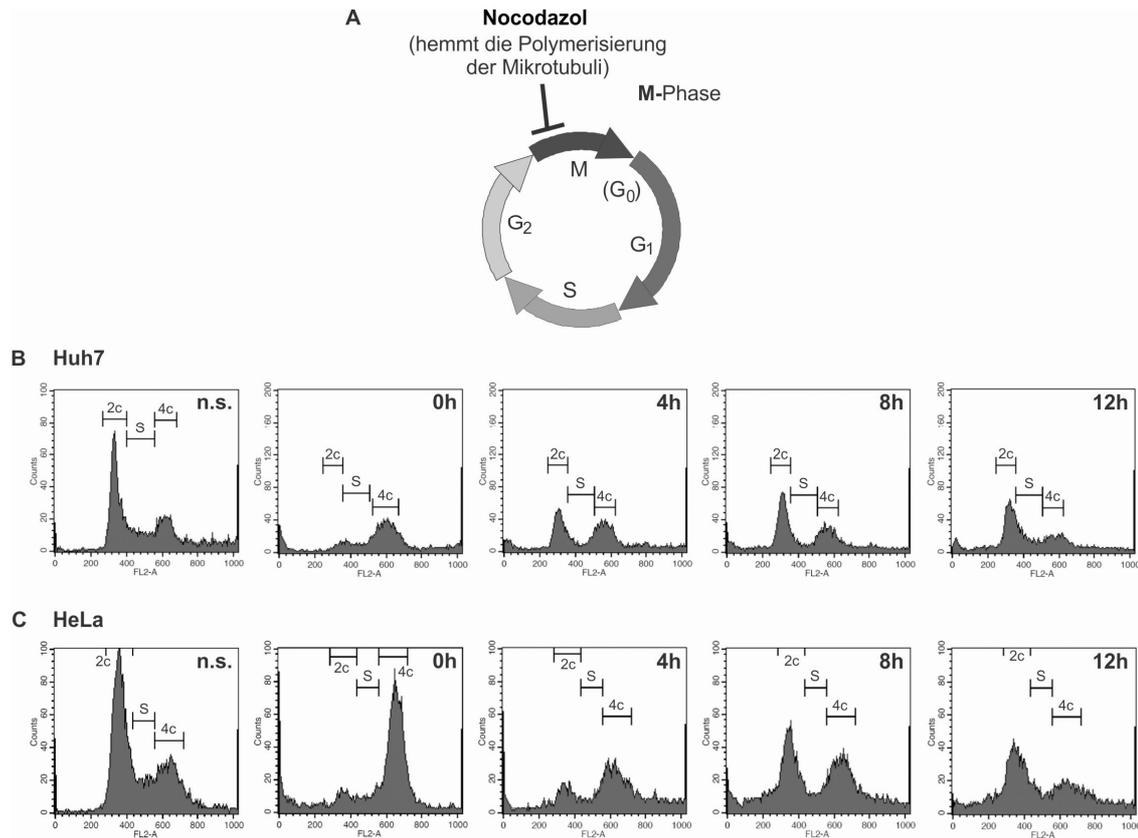


Abb. 23 Synchronisierung der Zellen durch Nocodazol-Behandlung

(A) Graphische Darstellung des Zellzyklus mit Kennzeichnung der Synchronisierungsmethode. (B) und (C) FACS-Analysen nach Synchronisierung mit Nocodazol zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Wiederaufnahme der Zellen in frisches Medium. (B) Synchronisierung von Huh7-Zellen durch Nocodazol-Behandlung. (C) Synchronisierung von HeLa-Zellen durch Nocodazol-Behandlung. „0h“ bedeutet die Analyse direkt nach der Nocodazol-Behandlung. „4 - 12h“ entsprechen Messungen zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Wiederaufnahme der Zellen in frisches Medium. Als Kontrolle dienten nicht synchronisierte Zellen (n.s.). 2c: 2-Chromatid-Chromosomen, G₀/G₁-Phase; S: S-Phase; 4c: 4-Chromatid-Chromosomen, G₂/M-Phase.

Bei nicht synchronisierten Zellen (n.s.) ist der „4c“-Peak deutlich schwächer ausgeprägt als der „2c“-Peak, der die G₀/G₁-Phase darstellt. Vier Stunden nach der Synchronisierung hat sich die Hälfte der Zellen geteilt und der „2c“-Peak nimmt an Intensität zu. Auch bei HeLa-Zellen ist ein deutlicher G₂/M-Peak zu erkennen, der ähnlich wie bei Huh7-Zellen nach vier Stunden deutlich zurückgeht. Die Counts unterscheiden sich zwischen Huh7- und HeLa-Zellen in Abbildung 23 B und C, da mehr HeLa-Zellen benutzt wurden und somit die Peaks höher sind als bei Huh7-Zellen. Jedoch muss angemerkt werden, dass die Synchronisierung in der G₂/M-Phase nicht ganz zufrieden stellend gelungen ist, da immer noch ein kleiner „2c“-Peak bei beiden Zelllinien zum Zeitpunkt „0h“ zu beobachten ist.

2.3.2 Synchronisierung der Zellen in der G₂/M-Phase durch Nocodazol und „Shake off“

Um nur jene Zellen zu erhalten, die sich eindeutig in der G₂/M-Phase befinden, wurde die Methode der Synchronisierung verbessert. Durch das Verfahren des so genannten „Shake off“ können Zellen, die sich abgerundet haben und nur noch leicht an der Oberfläche der Zellkulturschale angeheftet sind, durch seitliches Klopfen an die Schale abgelöst und gesammelt werden. Da die erhaltene Zellmenge bei dieser Methode jedoch nicht sehr hoch ist und man in regelmäßigen Zeitabständen kontrollieren muss, ob sich weitere Zellen abgerundet haben, wurde der „Shake off“ mit einer vorangegangenen Nocodazol-Behandlung kombiniert, um die Zellen vor dem „Shake off“ in der M-Phase anzureichern. Bei der Kombination dieser Methoden erhält man etwa 80 % der Zellen im abgerundeten mitotischen Zustand und kann diese anschließend mittels Propidiumiodid-Färbung im FACS messen.

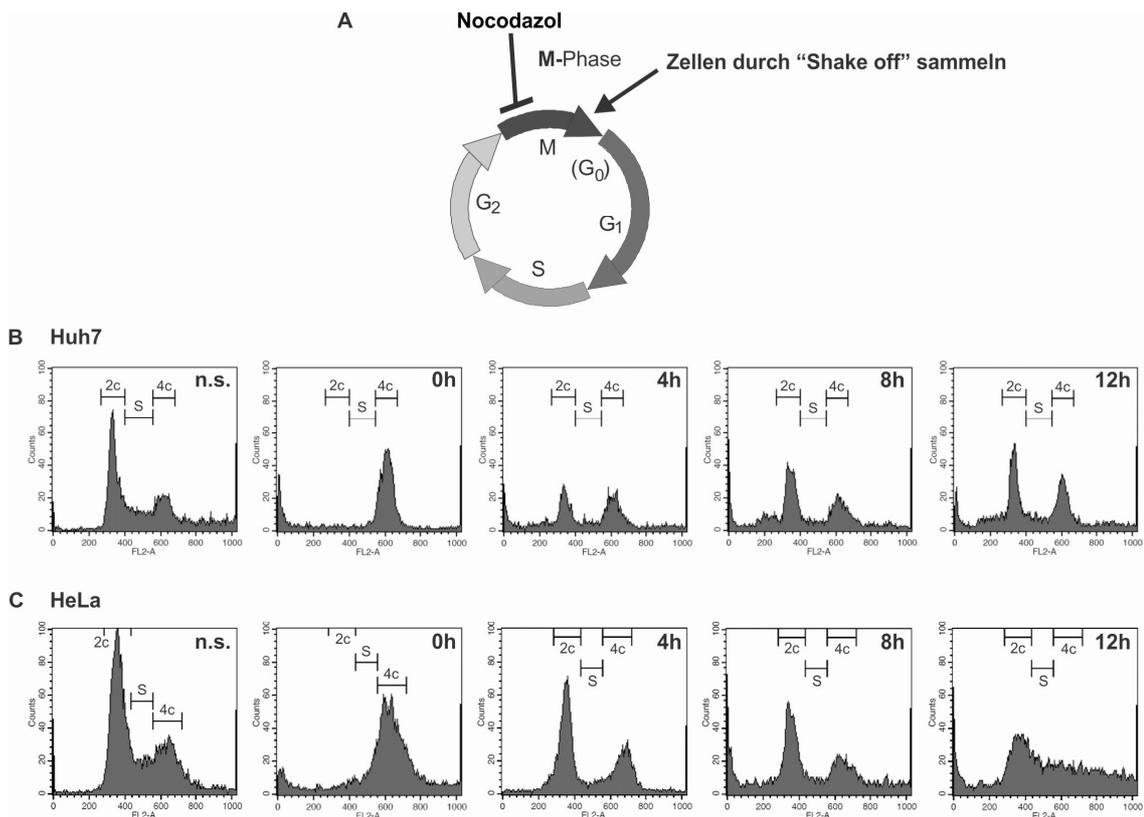


Abb. 24 Zell-Synchronisierung durch Nocodazol-Behandlung und anschließendem „Shake off“
(A) Graphische Darstellung des Zellzyklus mit Kennzeichnung der Synchronisierungsmethode. **(B)** und **(C)** FACS-Analysen nach Synchronisierung mit Nocodazol und „Shake off“ zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Wiederaufnahme der Zellen in frisches Medium. **(B)** Synchronisierung von Huh7-Zellen. **(C)** Synchronisierung von HeLa-Zellen. „0h“ bedeutet die Analyse direkt nach dem „Shake off“. „4 - 12h“ entsprechen Messungen zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Wiederaufnahme der Zellen in frisches Medium. Als Kontrolle dienten nicht synchronisierte Zellen (n.s.). 2c: 2-Chromatid-Chromosomen, G₀/G₁-Phase; S: S-Phase; 4c: 4-Chromatid-Chromosomen, G₂/M-Phase.

Wie in Abbildung 24 dargestellt sieht man nun bei Huh7- sowie bei HeLa-Zellen zu dem Zeitpunkt „0h“ direkt nach dem „Shake off“ keinen „2c“-Peak, da nun ausschließlich die Zellen gesammelt wurden, die sich in der G₂/M-Phase befanden. In Abb. 24 wie oben in Abb. 23 sieht man eine rasche Teilung der Zellen nach „Shake off“ und anschließender Wiederaufnahme in frischem Medium. Auch hier hat sich etwa die Hälfte der G₂/M-Phase-Zellen nach vier Stunden geteilt. Bei HeLa-Zellen ist jedoch zu beobachten, dass sie nach 12 Stunden keine homogene Zellpopulation mehr darstellen, da das Profil der FACS-Messung eine Mischung aus S-Phase und „4c“-Peak aufweist. Dies ist damit zu erklären, dass HeLa-Zellen empfindlicher auf die Behandlung ansprechen und vorsichtiger behandelt werden müssen.

Fazit: Für eine zufrieden stellende Zellsynchronisierung in der G₂/M-Phase ist es erforderlich, die Zellen zuerst mit Nocodazol zu behandeln, damit sie sich kurz vor der Teilung befinden. Da nicht alle Zellen das Nocodazol in gleichem Maße aufnehmen, müssen für eine exakte Synchronisierung der Zellen in der G₂/M-Phase die abgerundeten Zellen dann durch einen so genannten „Shake off“ mechanisch von der Zellkulturschale abgelöst werden.

2.3.3 Synchronisierung der Zellen in der G₀/G₁-Phase durch Kontaktinhibition

Für eine Untersuchung der G₀/G₁-Phase wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 100 % wachsen gelassen. Nach einer weiteren Inkubation von 24 Stunden wurden die Zellen für die Propidiumiodid-Färbung vorbereitet. Für eine zusätzliche Bestätigung der G₀/G₁-Phase wurde die Menge des p27^{Kip1} Proteins mit Hilfe eines Westernblots überprüft. Das Protein p27^{Kip1} ist in der G₀/G₁-Phase am stärksten exprimiert (Coats *et al.*, 1996 und Polyak *et al.*, 1994) und dient daher als Kontrolle einer erfolgreichen Synchronisierung.

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der G₀/G₁-Synchronisierung dargestellt. Bei den FACS-Daten in Teil C und D ist sowohl bei Huh7- als auch bei HeLa-Zellen der G₀/G₁-Phase-Peak (2c) am höchsten. Das bedeutet, dass sich die Zellen entweder in G₀ oder G₁ befinden. Diese Populationsverteilung kann man über sechs Stunden beobachten.

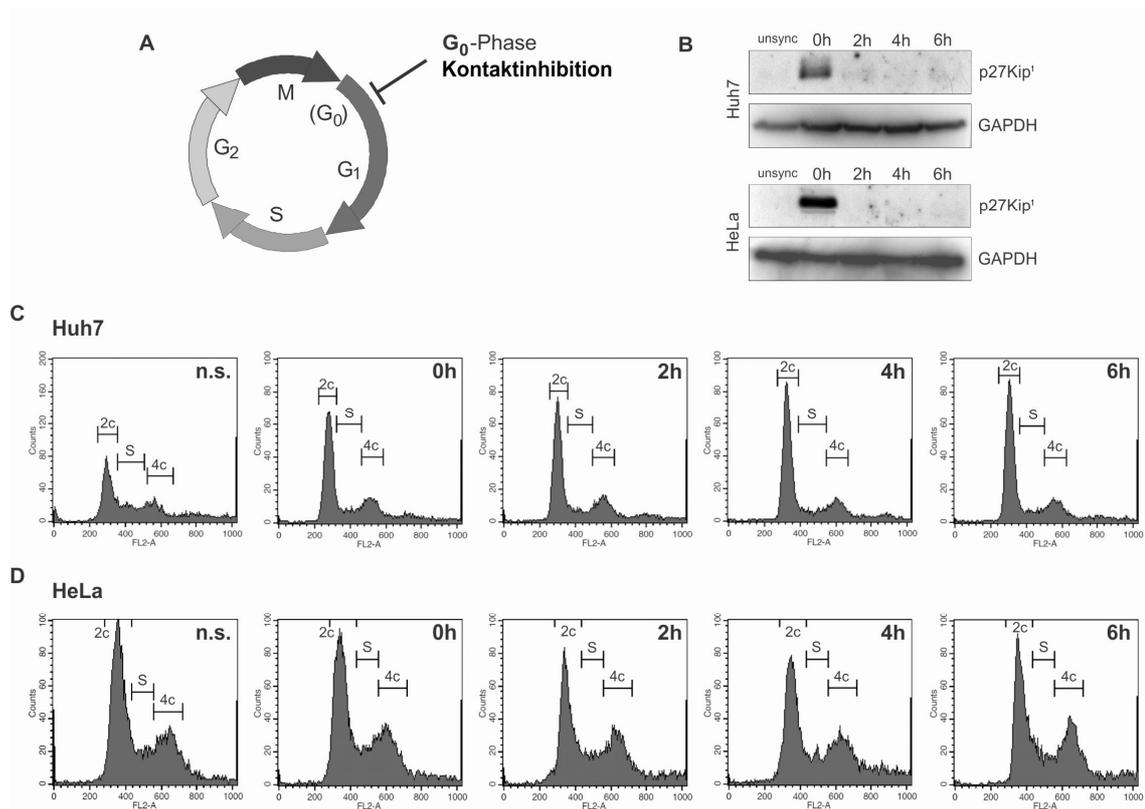


Abb. 25 Zell-Synchronisierung durch Kontaktinhibition

(A) Graphische Darstellung des Zellzyklus mit Kennzeichnung der Synchronisierungsmethode. (B) Westernblot gegen GAPDH als Kontrolle und p27^{Kip1} zur Verifizierung der G₀/G₁-Phase. (C) und (D) FACS-Analysen nach Synchronisierung durch Kontaktinhibition. Dargestellt sind unterschiedliche Zeitpunkte nach Wiederaufnahme der Zellen in frisches Medium. (C) FACS-Analysen nach Synchronisierung durch Kontaktinhibition in Huh7-Zellen. (D) Synchronisierung von HeLa-Zellen durch Kontaktinhibition. „0h“ bedeutet eine Analyse direkt nach Ablösen der Zellen. „4 - 12h“ entsprechen Messungen zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Wiederaufnahme der Zellen in frisches Medium. Als Kontrolle dienen unsynchronisierte Zellen (n.s.). 2c: 2-Chromatid-Chromosomen, G₀/G₁-Phase; S: S-Phase; 4c: 4-Chromatid-Chromosomen, G₂/M-Phase.

Da die Zellen jedoch nach der Kontaktinhibition von der Zellkulturschale abgelöst und in neue Schalen mit frischem Medium gegeben wurden, kann es durchaus sein, dass die Zellen wieder in die G₁-Phase übergehen und dies nicht in den FACS-Messungen zu erkennen ist. Daher ist in Abbildung 25 Teil B der zu den FACS-Daten passende Westernblot gezeigt, der deutlich macht, dass die Zellen schon nach zwei Stunden in die G₁-Phase übergehen und das Protein p27^{Kip1} kaum noch exprimiert wird.

Fazit: Durch eine Kontaktinhibition werden die Zellen eindeutig in der G₀-Phase gestoppt. Allerdings ist zu beachten, dass sich die Zellen nach Splitten und Wiederaufnahme in frisches Medium innerhalb von zwei Stunden wieder in der G₁-Phase befinden, was durch den Expressionsrückgang des Proteins p27^{Kip1} ersichtlich ist und schon durch mehrere bekannte Veröffentlichungen (Coats *et al.*, 1996; Polyak *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1994) gezeigt wurde.

2.3.4 Synchronisierung der Zellen in der S-Phase durch doppelten Thymidin-Block

Eine Zellsynchronisierung in der S-Phase kann durch einen doppelten Thymidin-Block erreicht werden. Dabei wird Thymidin (Desoxythymidin) den Zellen im Überschuss angeboten, wodurch eine allosterische Inhibierung der Ribonukleotid-Reduktase und der Desoxynukleosid-Kinase hervorgerufen wird (Mikkelsen *et al.*, 2003) und die DNA-Synthese stark verlangsamt wird. Der erste Thymidin-Block akkumuliert die meisten Zellen in der S-Phase. Nach Zugabe von frischem Medium durchlaufen alle Zellen die S-Phase und die anderen Phasen des Zellzyklus bevor sie erneut durch Gabe von Thymidin am Beginn der nächsten S-Phase gebremst werden.

Der doppelte Thymidin-Block wurde wie in Kapitel 4.2.4.11.2 beschrieben zunächst bei Huh7-Zellen angewandt. In Abbildung 26 sieht man das Ergebnis eines solchen Experiments mit dieser Methode.

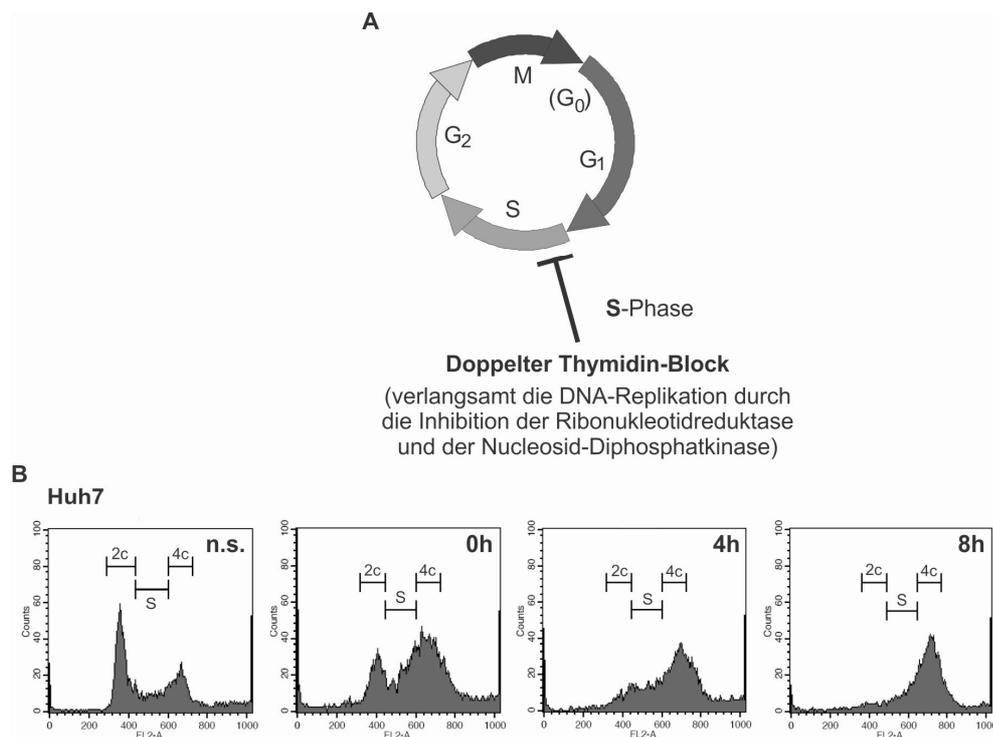


Abb. 26 Zell-Synchronisierung durch doppelten Thymidin-Block

(A) Graphische Darstellung des Zellzyklus mit Kennzeichnung der Synchronisierungsmethode. (B) FACS-Analysen nach Synchronisierung durch einen doppelten Thymidin-Block in Huh7-Zellen. Dargestellt sind unterschiedliche Zeitpunkte nach Wiederaufnahme der Zellen in frisches Medium. Als Kontrolle dienen unsynchronisierte Zellen (n.s.). 2c: 2-Chromatid-Chromosomen, G₀/G₁-Phase; S: S-Phase; 4c: 4-Chromatid-Chromosomen, G₂/M-Phase.

Man erkennt, dass zum Zeitpunkt „0h“ keine gelungene Synchronisierung zu Beginn der S-Phase stattgefunden hat. Bei einer erfolgreichen Synchronisierung sollte der „2c“-Peak etwas höher sein und nach kurzer Zeit

der Bereich, der in FACS-Ergebnissen mit „S“ gekennzeichnet, ist ausgedehnter erschienen. Hier jedoch sind zwei eng zusammen liegende Peaks sichtbar, wobei sich nach vier Stunden schon die meisten Zellen in der G₂/M-Phase befinden.

Fazit: Durch wiederholte Synchronisierung mit Hilfe des doppelten Thymidin-Blocks war es nicht möglich, die Zellen in der S-Phase zu akkumulieren. Daher wurde nach einer anderen Variante der Synchronisierung gesucht, die zu einem erfolgreichen Ergebnis führt.

2.3.5 Synchronisierung der Zellen in der S-Phase durch Nocodazol (mit „Shake off“) und Thymidin-Behandlung

Da der doppelte Thymidin-Block nicht zu dem gewünschten Ergebnis geführt hatte, wurden verschiedene Methoden kombiniert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit Nocodazol in der G₂/M-Phase gestoppt und durch einen „Shake off“ von der Zellkulturschale gelöst, wie dies auch für die Zellen der G₂/M-Phase-Synchronisierung praktiziert wurde. Nachdem so ausschließlich G₂/M-Phase-Zellen isoliert wurden, wurden diese in frischem Medium aufgenommen und in eine neue Zellkulturschale überführt. Danach konnten die Zellen für acht Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ wachsen und die Mitose abschließen. Dann wurde Thymidin mit einer Endkonzentration von 2 mM zum Medium gegeben. Nach einer Inkubation von weiteren 18 h wurden die Zellen gewaschen, in verschiedenen Zeitabständen trypsiniert und mit Propidiumiodid gefärbt.

Das Ergebnis dieser Methodenkombination ist in Abb. 27 dargestellt. Dabei sieht man, dass sich die Huh7-Zellen direkt nach der Behandlung an der Grenze zwischen G₁- und der S-Phase befinden. Nach weiteren vier bis sechs Stunden haben die Zellen dann die S-Phase erreicht. Dies ist daran zu sehen, dass die Signale zwischen den „2c“ und „4c“ Bereichen gleichmäßig verteilt sind, die Zellen also einen DNA-Gehalt zwischen „2c“ und „4c“ haben, ein Charakteristikum der S-Phase beziehungsweise der Replikation der DNA. Bei HeLa-Zellen ist ebenfalls eine erfolgreiche Synchronisierung zu beobachten. Anders als bei Huh7-Zellen sind die HeLa-Zellen schon ab dem Zeitpunkt „0h“, also der Entfernung des Thymidins aus dem Medium, in der S-Phase gesammelt.

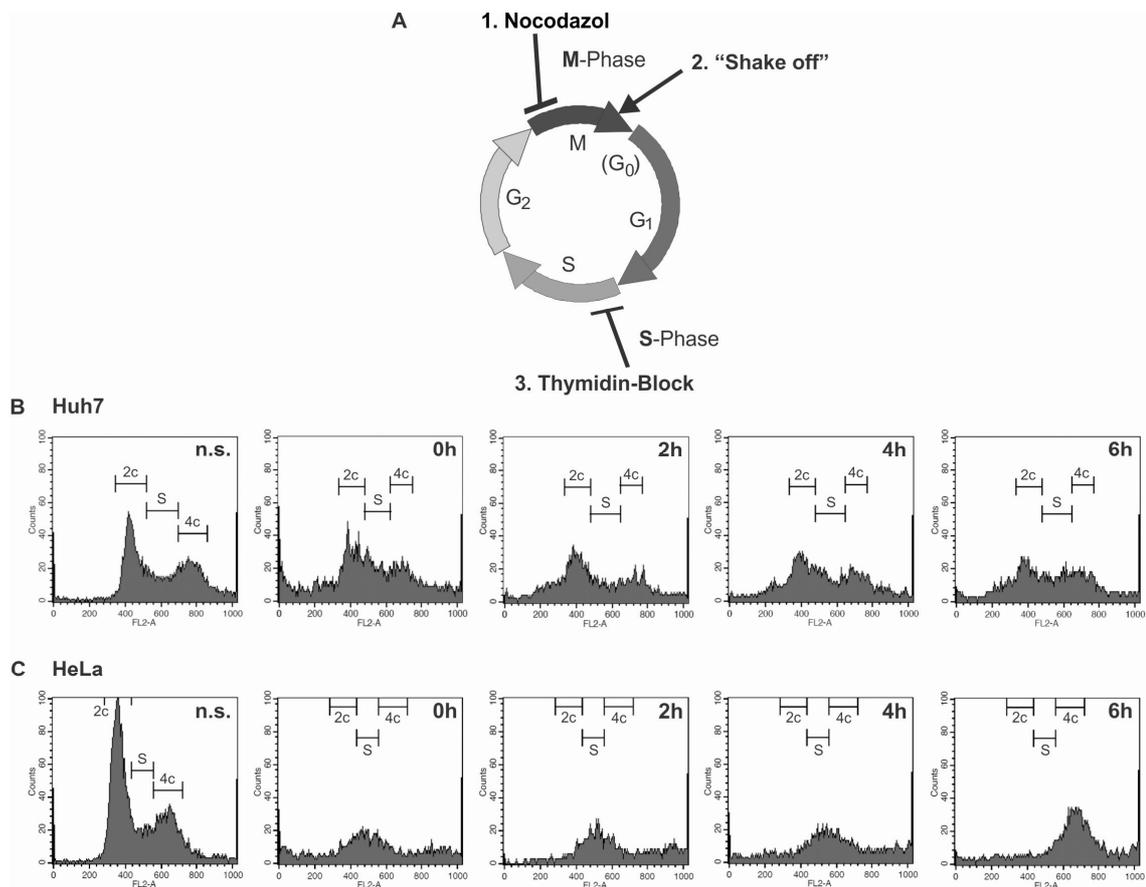


Abb. 27 Zell-Synchronisierung durch die Kombination von Nocodazol, Shake off und Thymidin-Behandlung

(A) Graphische Darstellung des Zellzyklus mit Kennzeichnung der Synchronisierungsmethode. **(B)** und **(C)** FACS-Analysen nach Synchronisierung durch Nocodazol, „Shake off“ und Thymidin-Behandlung. **(B)** FACS-Analysen in Huh7-Zellen. **(C)** FACS-Analysen in HeLa-Zellen. Dargestellt sind unterschiedliche Zeitpunkte nach Wiederaufnahme der Zellen in frisches Medium. „0h“ bedeutet die Analyse direkt nach dem „Shake off“. „4 - 12h“ entsprechen Messungen zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Wiederaufnahme der Zellen in frisches Medium. Als Kontrolle dienen nicht synchronisierte Zellen (n.s.). 2c: 2-Chromatid-Chromosomen, G₀/G₁-Phase; S: S-Phase; 4c: 4-Chromatid-Chromosomen, G₂/M-Phase.

Dieses Stadium hält bis zu vier Stunden an. Erst danach ist eine Verschiebung des Peaks zu „4c“, der G₂/M-Phase erreicht. Jedoch ist anhand der niedrigen Counts eine geringere Zellzahl zu erkennen, was durch die höhere Empfindlichkeit der HeLa-Zellen gegenüber der Synchronisierungs-Behandlung zu erklären ist. So werden HeLa-Zellen mit nur 300 ng/ml Nocodazol behandelt und lassen sich leichter im abgerundeten Zustand von der Zellkulturschale lösen.

Fazit: Durch die Kombination von Nocodazol-Behandlung, „Shake off“ und anschließender Thymidin-Behandlung lassen sich die Zellen sehr gut in der S-Phase akkumulieren. Die Huh7-Zellen befinden sich nach der Synchronisierungs-Behandlung und Wiederaufnahme in frischem Medium nach etwa vier Stunden in der S-Phase. Dagegen replizierten die HeLa-Zellen schneller und hatten bereits vier Stunden nach Reaktivierung die S-Phase weitestgehend abgeschlossen.

2.4 Einfluss der Zellzyklusphasen auf die Translation von HCV und auf den stimulatorischen Effekt der miR-122

In neueren Forschungsberichten wurden mit Hilfe verschiedener siRNA-Experimente Proteine identifiziert, die wichtig für eine effektive HCV-Replikation sowie -Sekretion sind. Allgemein sind Gene für die Proteinsynthese und -Degradation, posttranslationale Modifikationen, Vesikel-Transport und des Zytoskeletts durch eine HCV-Infektion reguliert (Nishimura-Sakurai *et al.*, 2010). Zusätzlich wurden eine vermehrte Expression der Proteine RAB (ein GTP-bindendes Protein), CYP1A1 (Cytochrom p450 Untereinheit), ABLIM3 (Actin-bindendes LIM Protein 3) und TXNIP (Thioredoxin interagierendes Protein) (Blackham *et al.*, 2010) nachgewiesen. Eine Überexpression von TXNIP induziert die G₀-Phase des Zellzyklus (Yamaguchi *et al.*, 2008). In dieser Phase ist auch das p27^{Kip1} verstärkt exprimiert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass durch eine HCV-Infektion das Protein Rb (Retinoblastom Tumor Suppressor) negativ beeinflusst und dadurch das Fortschreiten des Zellzyklus veranlasst wird (Munakata *et al.*, 2005).

Durch diese Untersuchungen kam die Frage auf, inwiefern die HCV-RNA innerhalb des Zellzyklus unterschiedlich effizient translatiert wird. Es wurde schon gezeigt, dass die miR-122 die HCV-Translation stimuliert (Henke *et al.*, 2008), wobei sich nun die Frage stellte, ob die miR-122 in den einzelnen Zellzyklusphasen eine unterschiedlich starke Wirkung auf die HCV-Translation aufweist.

2.4.1 Transfektionen in synchronisierten Huh7- und HeLa-Zellen

Um den Einfluss leberspezifischer Faktoren auf die Translation der HCV-RNA zu erforschen, wurde ein monocistronisches HCV-Reporterkonstrukt (HCV-CLX-CMV) in Zellen transfiziert. Dabei wird die HCV-RNA in Abhängigkeit der viralen cis-regulatorischen Elemente translatiert und die Translationseffizienz indirekt durch eine Aktivitätsbestimmung des integrierten Reporters gemessen. Das Reporterkonstrukt wird durch eine *in vitro*-Transkription der durch PCR entstandenen DNA-Matrize hergestellt. Die daraus resultierende RNA enthält am 5'-Ende die HCV-IRES mit den beiden Bindestellen für die microRNA-122, gefolgt von 264 nts der Core-Sequenz, der *Firefly*-Luziferase (FLuc) und der 3'-UTR von HCV (siehe Abbildung 28). Damit die Funktionalität der IRES gewährleistet wird, ist der Anfang der Core-Sequenz enthalten (Reynolds *et al.*, 1995). Das authentische und exakte Ende der nicht-translatierten 3'-Region von

HCV ist durch die Transkription des PCR-Produkts gegeben, was für eine effiziente Stimulation der IRES durch die 3'-UTR sorgt (Song *et al.*, 2006). Für die korrekte Prozessierung des N-Terminus der *Firefly*-Luziferase enthält das HCV-Reporterkonstrukt eine Ubiquitin-Sequenz, die eine co-translationale Abspaltung des unvollständigen Core-Proteins vermittelt. Die enzymatische Aktivität des FLuc-Reporter-Proteins ist dann ein indirektes Maß für die Effizienz der HCV-IRES-vermittelten Translation.

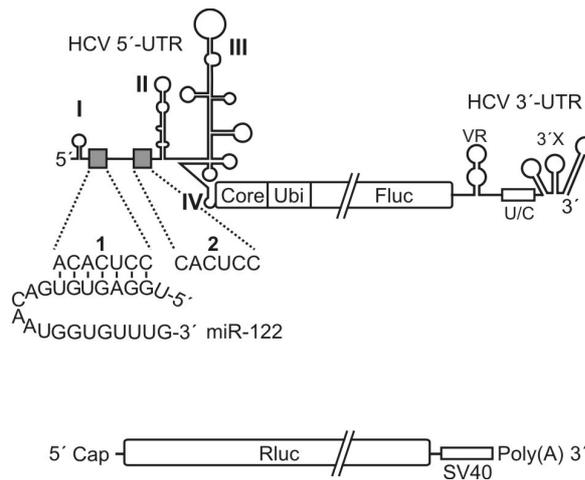


Abb. 28 Reporterkonstrukte für Transfektionsexperimente in Huh7- und HeLa-Zellen

(A) HCV Reporterkonstrukt (HCV-CLX-CMV) bestehend aus der HCV-IRES, Core- und Ubiquitin-Sequenz, *Firefly*-Luziferase und der 3'-UTR von HCV. (B) Co-Reporter (phRL null) mit 5'-Cap, *Renilla*-Luziferase, SV40-Sequenz und Poly(A)-Schwanz.

Zur Normalisierung der Transfektionsergebnisse wurde zum einen das WST-1 Reagenz (Roche) verwendet und zum anderen eine zweite Reporter-RNA mit in die Zellen transfiziert. Dieser Co-Reporter (phRL null) entsteht durch eine *in vitro*-Transkription eines PCR Produktes, welches die *Renilla*-Luziferase (RLuc) und eine anschließende SV40-Sequenz besitzt, in Anwesenheit von Capping-Nukleotiden. Durch eine anschließende Polyadenylierungsreaktion mit einer Poly(A)-Polymerase werden etwa 200 rATPs an das 3'-Ende der RLuc-RNA angefügt.

2.4.2 Vergleich der Translationseffizienz in unterschiedlichen Zellzyklusphasen

Wie in Kapitel 2.4 erwähnt, beeinflusst HCV den Zellzyklus durch vermehrte Expression von TXNIP (Blackham *et al.*, 2010), wodurch die Zellen in der G₀-Phase arretieren. Aber hat der Zellzyklus selbst auch einen Einfluss auf die Translation der HCV-RNA? Um diese Frage zu beantworten, wurden die Zellen (Huh7 und HeLa) durch die diversen Synchronisierungsmethoden in den

Phasen G_0 , G_0/G_1 , S und G_2/M akkumuliert und mit nicht synchronisierten Zellen verglichen. Die Transfektionen wurden wie im Methoden-Teil beschrieben mit den Reporterkonstrukten für HCV und einem Co-Reporter (s. Abb. 28) durchgeführt. Da die Normalisierung bei diesen Versuchen viele Parameter einbeziehen sollte, wurden neben der Co-Transfektion auch die metabolische Aktivität der Zellen durch eine WST-1 Messung einbezogen.

2.4.2.1 Die Effizienz der Cap- und IRES-abhängigen Translation in verschiedenen Zellzyklusphasen in Huh7-Zellen

Die Transfektionen in diesem Teil wurden in Huh7-Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen synchronisiert und in eine 24-well-Platte ausgesät. Nachdem sich die Zellen nach 2 Stunden abgesetzt haben, konnten sie transfiziert werden. Die Zellen für die G_0 -Phase wurden in der 24-well-Platte bis zur Kontaktinhibition wachsen gelassen und dann transfiziert. Die Transfektionskomplexe mit den RNAs wurden für 1,5 Stunden auf den Zellen belassen, von den Zellen aufgenommen und translatiert. Für die Normalisierung der daraus resultierenden Daten und für eine Bestätigung der metabolischen Aktivität der Zellen wurde anschließend das WST-1 Reagenz in farblosem DMEM (ohne Serum und FBS) auf die Zellen gegeben und für 30 min inkubiert. Durch die Umsetzung des Tetrazoliumsalses zu Formazan und den damit entstandenen Farbumschlag konnte die Absorption bei 450 nm gemessen werden. Danach wurden die Zellen lysiert und die Luziferase-Aktivität im Luminometer gemessen. Die Ergebnisse der Translationseffizienz sind in Abbildung 29 zusammengefasst. Hier sind zum einen die *Firefly*-, *Renilla*- und WST-1 Daten einzeln dargestellt und zum anderen auf WST-1 oder den Co-Reporter RLuc normalisiert. Da die gemessenen Rohdaten zwischen den jeweiligen Versuchstagen (Messung einer Charge synchronisierter Zellen) stark schwanken können, wurden sie, um sie miteinander vergleichen zu können, pro Versuch prozentual zu unsynchronisierten Zellen berechnet, wobei diese dabei gleich 100 % gesetzt wurden.

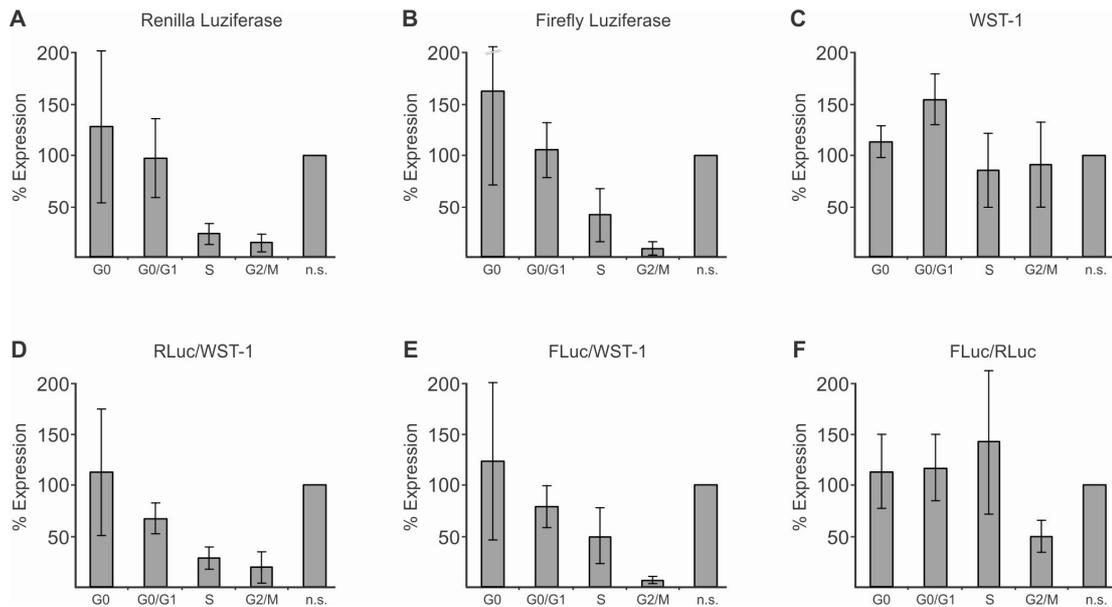


Abb. 29 Effizienz der Translation der RLuc- und HCV-FLuc-RNA in Huh7-Zellen

(A) bis (F) dargestellt sind die gemessenen Aktivitäten der transfizierten Reporter-RNAs sowie die metabolische Aktivität mittels WST-1 in Huh7-Zellen. (A) *Renilla*-Expression in den verschiedenen Zellzyklusphasen bezogen auf nicht synchronisierte Huh7-Zellen. (B) *Firefly*-Expression in den verschiedenen Zellzyklusphasen bezogen auf nicht synchronisierte Huh7-Zellen. (C) WST-1 Messungen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen. (D) und (E) Normalisierung von RLuc bzw. FLuc auf die metabolische Aktivität. (F) Normalisierung der FLuc-Daten auf den Co-Reporter RLuc. Alle Werte beziehen sich jeweils auf nicht synchronisierte Zellen (n.s.), die auf 100 % gesetzt sind.

Die Einzeldarstellung der FLuc- und RLuc-Daten zeigt deutlich, dass die Translation in G_0 -Phase-Zellen am besten funktioniert. Jedoch nimmt die Translationseffizienz über die G_0/G_1 - und S-Phase zur G_2/M -Phase hin stark ab (Abb. 29 A und B). Dies bedeutet, dass in diesen Phasen sowohl die cap-abhängige als auch die IRES-abhängige Translation in den Zellen reduziert wird. Das wäre dadurch zu erklären, dass der Schwerpunkt in der S-Phase auf der DNA-Replikation und in der Mitose-Phase auf der Zellteilung liegt. Somit wird das Maß der Proteinbiosynthese möglicherweise herabgesetzt.

Der Rückgang der Translationseffizienz kann allerdings nicht unbedingt mit der jeweiligen Synchronisierungsmethode begründet werden, da zum Beispiel eine Nocodazol-Behandlung der Zellen schnell reversibel ist (Zieve *et al.*, 1980). Außerdem ist die metabolische Aktivität der Huh7-Zellen relativ stabil (Abb. 29 C). Damit ergibt eine Normalisierung auf WST-1 sehr ähnliche Ergebnisse wie bei der Einzeldarstellung von FLuc und RLuc (Abb. 29 D und E) gezeigt ist. Allein die Normalisierung der FLuc-Werte auf den Co-Reporter (Abb. 29 F) zeigt eine höhere Translationseffizienz in der G_0/G_1 -, S- und G_2/M -Phase im Vergleich zu einer Normalisierung auf WST-1 (Abb. 29 E). Besonders in der S-Phase ist die Translation dadurch auf 150 % gestiegen, während in den übrigen Phasen die Steigerung maximal 25 % beträgt.

Durch Arbeiten mit der Kollegin C. Bung wurde gezeigt, dass sich die *Renilla*-Luziferase-Aktivität nicht in allen Experimenten unabhängig zur FLuc-Aktivität verhält, eventuell wegen einer gegenseitigen Beeinflussung der RNAs in *trans*. Dadurch entstehen bei einer Normalisierung möglicherweise verfälschte Werte. Da allerdings bei den Zellzyklus-Experimenten viele Faktoren zu berücksichtigen sind, wurde bei dieser Arbeit nicht auf eine Co-Transfektion verzichtet und die Daten jeweils einzeln betrachtet beziehungsweise nach unterschiedlichen Normalisierungen dargestellt.

Fazit: Die Translationseffizienz sowohl des HCV-Reporterkonstrukts als auch des Co-Reporters sind in der G₀-Phase am höchsten und nehmen stark in der S- und G₂/M-Phase ab, obwohl die metabolische Aktivität der Zellen deutlich geringere Schwankungen unterworfen ist. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass unterschiedliche Vorgänge während diesen beiden Phasen in der Zelle ablaufen. So liegt der Fokus in der S-Phase hauptsächlich auf der DNA-Replikation, während die Zellen in der G₂/M-Phase die Zytokinese einleiten.

2.4.2.2 Die Effizienz der Cap- und IRES-abhängigen Translation in verschiedenen Zellzyklusphasen in HeLa-Zellen

Um die Effizienz der Translation der HCV-RNA in HeLa-Zellen zu überprüfen, wurden die Transfektionen wie bei den Huh7-Zellen beschrieben durchgeführt. Die HeLa-Zelllinie wurde als Kontrolle verwendet, da diese keine endogene microRNA-122 exprimiert und somit die Translation des HCV-Konstrukts dadurch nicht beeinflusst werden kann. Zudem können eventuelle leberspezifische Faktoren ausgeschlossen werden.

In Abbildung 30 Teil A ist die Verteilung der Expression der *Renilla*-Luziferase gezeigt. Sie ist in den einzelnen Zellzyklusphasen ähnlich zu der Verteilung in Huh7-Zellen. Auch in HeLa-Zellen ist die Translationseffizienz in der G₀-Phase am höchsten und nimmt zur G₂/M-Phase hin drastisch ab. Betrachtet man die FLuc-Daten, ist ein deutlicher Unterschied zu Huh7-Zellen sichtbar. Die Translationseffizienz liegt hier sowohl in der G₀- als auch in der G₀/G₁-Phase zwischen 38 - 52 %, wohingegen sie in der S-Phase bei 84 % liegt und zur G₂/M-Phase wieder drastisch sinkt. Wie in Abbildung 30 Teil C ersichtlich ist, schwanken hier die WST-1 Messungen deutlich innerhalb des Zellzyklus.

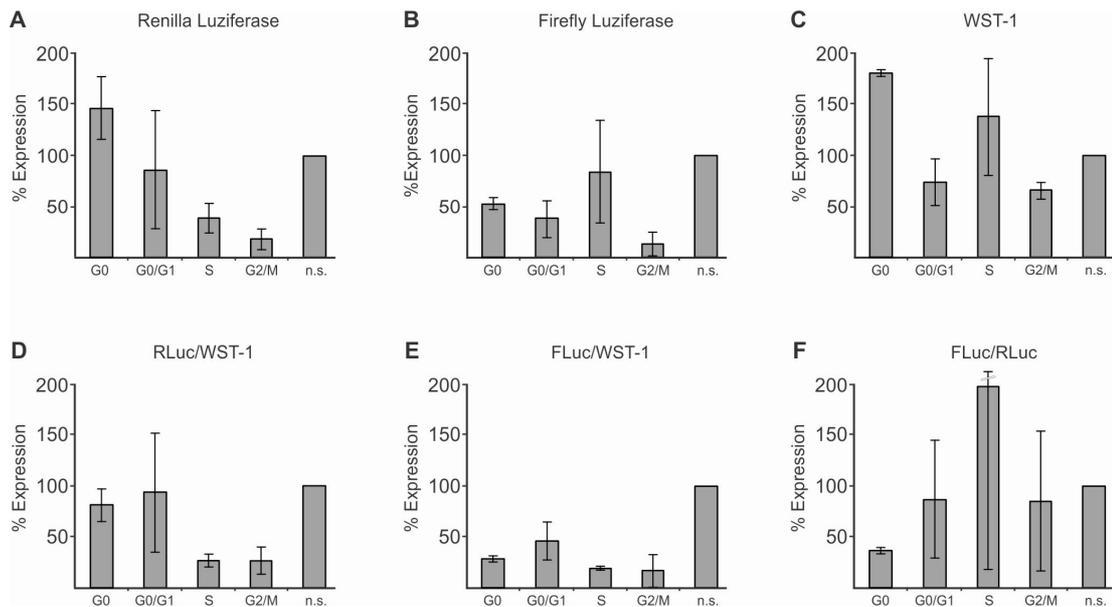


Abb. 30 Effizienz der Translation der RLuc- und HCV-FLuc-RNA in HeLa-Zellen

(A) bis (F) dargestellt sind die gemessene Aktivitäten der transfizierten Reporter-RNAs sowie die metabolische Aktivität mittels WST-1 in HeLa-Zellen. (A) *Renilla*-Expression in den verschiedenen Zellzyklusphasen bezogen auf nicht synchronisierte HeLa-Zellen. (B) *Firefly*-Expression in den verschiedenen Zellzyklusphasen bezogen auf nicht synchronisierte HeLa-Zellen. (C) WST-1 Messungen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen. (D) und (E) Normalisierung von RLuc bzw. FLuc auf die metabolische Aktivität. (F) Normalisierung der FLuc-Daten auf den Co-Reporter RLuc. Alle Werte beziehen sich jeweils auf nicht synchronisierte Zellen (n.s.), die auf 100 % gesetzt sind.

Werden die RLuc- und FLuc-Werte auf WST-1 normalisiert, erkennt man, dass in Abb. 30 Teil D und E die Translationseffizienz in der G₀- sowie in der S-Phase, im Vergleich zu den jeweiligen nicht normalisierten Werten (Abb. 30 A und B), stark sinkt. Die RLuc-Werte sinken in G₀ auf 81 %, in der S-Phase auf 26 %. Die FLuc-Werte sinken in G₀ auf 29 % und in der S-Phase sogar auf 19 %. Allerdings verändert eine Normalisierung der FLuc-Werte auf den co-transfizierten RLuc-Reporter die Translationseffizienz in eine andere Richtung (Abb. 30 F). Werden die Messungen auf diese Weise miteinander verglichen, steigt die Translation von FLuc in der S-Phase auf das Doppelte des Wertes in nicht synchronisierten Zellen an. Allerdings kommt dieser hohe Wert in der S-Phase hauptsächlich auch durch den starken Unterschied zwischen dem FLuc- und RLuc-Wert in der S-Phase zustande.

Fazit: Die Transfektionsergebnisse in HeLa-Zellen sind schwer zu interpretieren, da die WST-1 Messungen zwar schwanken, jedoch diesen Werten eher vertraut werden kann als dem co-transfizierten RLuc-Reporter, der anscheinend einen Einfluss auf die Translation der HCV-RNA hat. Somit ist eine Aussage der Normalisierung auf WST-1 glaubwürdiger.

2.4.3 Effekt der microRNA-122 auf den HCV-Reporter in unterschiedlichen Zellzyklusphasen

In verschiedenen Veröffentlichungen (s. Einleitung) wurde gezeigt, dass HCV und dessen Translation mit dem Zellzyklus in Verbindung stehen. Entweder beeinflusst die HCV-RNA den Zellzyklus selbst, indem verschiedene zelluläre Proteine vermehrt exprimiert werden (z.B. TXNIP, ABLIM3 oder RAB (Blackham *et al.*, 2010)) oder virale Proteine wie NS5B den Eintritt der Zelle in die nächste Phase fördern (McGivern *et al.*, 2011). Möglicherweise wird aber auch die Stimulation der Translation von HCV durch die microRNA-122 vom Zellzyklus beeinflusst. Unterschiedliche microRNAs werden zellzyklus-abhängig reguliert oder regulieren die Expression mehrerer zellzyklus-regulierender Proteine (Vasudevan *et al.*, 2007 und Boutz *et al.*, 2011). Könnte es dadurch auch zu einer phasen-abhängigen Stimulation von HCV durch die miR-122 kommen? Diese Hypothese sollte im Folgenden überprüft werden.

2.4.3.1 Einfluss der miR-122 auf die HCV-Translation in verschiedenen Zellzyklusphasen in Huh7-Zellen

Um einen möglichen Effekt der miR-122 auf die Effizienz der Translation der HCV-RNA in verschiedenen Zellzyklusphasen zu zeigen, wurden Huh7-Zellen nach den oben beschriebenen Verfahren synchronisiert und mit dem HCV-Reporterkonstrukt sowie dem Co-Reporter transfiziert. Obwohl Huh7-Zellen moderate Mengen an endogener miR-122 enthalten, wurden dennoch miR-122-Duplexe zu den entsprechenden Ansätzen gegeben, um einen eindeutigen und gut messbaren Effekt zu erzielen. Die Luziferase-Aktivitäten wurden 2 Stunden nach der Transfektion gemessen.

Die Effekte, die mit der miR-122 gemessen wurden, sind in den jeweiligen Phasen in Bezug zur normalen HCV-FLuc-Expression berechnet und in Abbildung 31 veranschaulicht. Es sind wieder die FLuc- und RLuc-Werte allein oder die entsprechenden Normalisierungen gezeigt. Man kann erkennen, dass die miR-122 in den Phasen G_0 , G_0/G_1 und G_2/M die Translation des HCV-Reporters stimuliert (Abb. 31 A und C), wohingegen in der S-Phase nur eine geringe Stimulation vorhanden ist. Dagegen ist die Translation des Co-Reporters nicht durch die Zugabe der microRNA-122 beeinflusst. Hier schwanken die Werte um 0,7 - 0,9 (Abbildung 31 B).

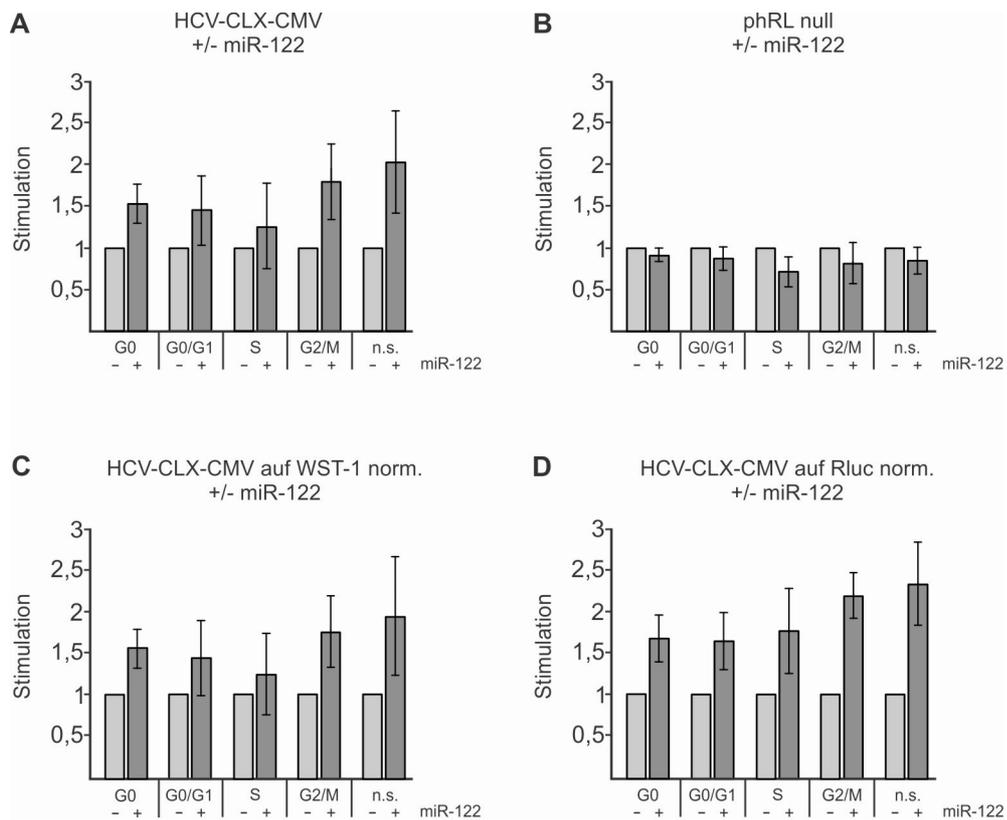


Abb. 31 Effekt der miR-122 auf die Translation von HCV in verschiedenen Zellzyklusphasen in Huh7-Zellen

(A) bis (D) dargestellt sind die Effekte der miR-122 auf die transfizierten Reporter sowie die normalisierten Werte. (A) Stimulation der miR-122 auf die HCV-FLuc-Expression in den verschiedenen Zellzyklusphasen bezogen auf die jeweilige Translationseffizienz des HCV-FLuc-Reporters (auf 1 gesetzt). (B) Effekt der miR-122 auf die RLuc-Expression in den verschiedenen Zellzyklusphasen bezogen auf die jeweilige Translationseffizienz des RLuc-Reporters (auf 1 gesetzt). (C) Normalisierung der Effekte des HCV-FLuc-Reporters auf WST-1. (D) Normalisierung der Effekte der FLuc-Daten auf den Co-Reporter RLuc.

Werden nun die Daten auf WST-1 normalisiert, erhält man ein ähnliches Stimulationsmuster wie bei der separaten Betrachtung der FLuc-Werte (Vergleich Abb. 31 Teil A mit Teil C). Auch hier ist die Stimulation in der G₂/M-, G₀- und G₀/G₁-Phase zu beobachten. Normalisiert man auf RLuc (Abb. 31 D), erhöhen sich die Effekte der miR-122 in der G₂/M- und besonders in der S-Phase. Die Stimulation in unsynchronisierten Zellen im Vergleich zu G₂/M-Phase Zellen ist gleichermaßen angestiegen. Da allerdings die Normalisierung auf RLuc wie oben gezeigt oft nicht nutzbar ist und auch hier die Stimulation in der S-Phase nach der Normalisierung erhöht ist, stellt sich die Frage, ob der dadurch erhaltene Wert in der S-Phase als Stimulation gewertet werden kann. Die Stimulationen durch die miR-122 im Laufe des Zellzyklus sind sehr wahrscheinlich nur in der S-Phase nicht oder kaum vorhanden. Des Weiteren kann man trotz der allgemein niedrigen Translationseffizienz zur G₂/M-Phase hin (Kapitel 2.4.2.1), einen Stimulationseffekt der miR-122 auf die HCV-Translation beobachten.

Fazit: Trotz einer geringen allgemeinen Effizienz der Translation der HCV-RNA kann man in Huh7-Zellen den Effekt der miR-122 auf die HCV-Translation sehen. In den Phasen G_0 , G_0/G_1 und G_2/M ist die Stimulation erhöht und erreicht nahezu den Effekt, der in unsynchronisierten Zellen auftritt. Allein in der S-Phase ist nur eine geringe Stimulation messbar. Die Ursachen dieser Beobachtung gilt es noch weiter zu untersuchen.

2.4.3.2 Einfluss der miR-122 auf die HCV-Translation in verschiedenen Zellzyklusphasen in HeLa-Zellen

Um in einem Kontroll-Experiment den miR-Effekt auch in Nicht-Hepatom-Zellen nachweisen zu können, wurden HeLa-Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusstadien synchronisiert und mit den RNA-Reporter-Konstrukten transfiziert. Zu den entsprechenden Ansätzen wurden miR-122-Duplexe gegeben, um die Stimulation der Translation des HCV-FLuc Konstruktes durch die miR-122 nachweisen zu können.

Die Auswertung der Daten erfolgte wie bei den Experimenten in Huh7-Zellen. Das Translationsniveau des HCV-FLuc Konstruktes in der jeweiligen Zellzyklusphase wurde gleich eins gesetzt und die durch die miR-122 hervorgerufenen Effekte in Relation dazu dargestellt (Abbildung 32 Teil A bis D). Dabei ist zu erkennen, dass in HeLa-Zellen die Stimulation der Translation des HCV-Konstruktes durch die miR-122 in der G_2/M -Phase mit 1,9-fach am höchsten ist (Abb. 32 A). Danach folgt die G_0 Phase mit einer 1,4-fachen Stimulation. In der G_0/G_1 -Phase wird eine geringe Stimulation von 1,3 erreicht. In der S-Phase allerdings wurde auch in HeLa-Zellen kein wesentlicher Effekt gemessen. Somit spiegelt das Ausmaß der Stimulation in unsynchronisierten Zellen hier eine Situation wider, die in etwa dem durchschnittlichen Effekt der einzelnen Phasen entspricht. Auf die Translation des RLuc-Konstruktes dagegen hat die microRNA-122 keinen (phRL null, Abb. 32 B).

Werden die erhaltenen Daten auf WST-1 normalisiert, bleibt die Aussage der einzeln betrachteten FLuc-Werte bestehen. In Abb. 32 Teil C ist erkennbar, dass die Stimulation in der G_2/M -Phase am höchsten ist, gefolgt von der G_0 -Phase. Der Effekt der miR-122 bleibt dagegen in der G_0/G_1 - und S-Phase aus. Bei einer Normalisierung auf den Co-Reporter „phRL null“ wurde eine ähnliche Verteilung der Stimulationen erhalten (Abb. 32 Teil D).

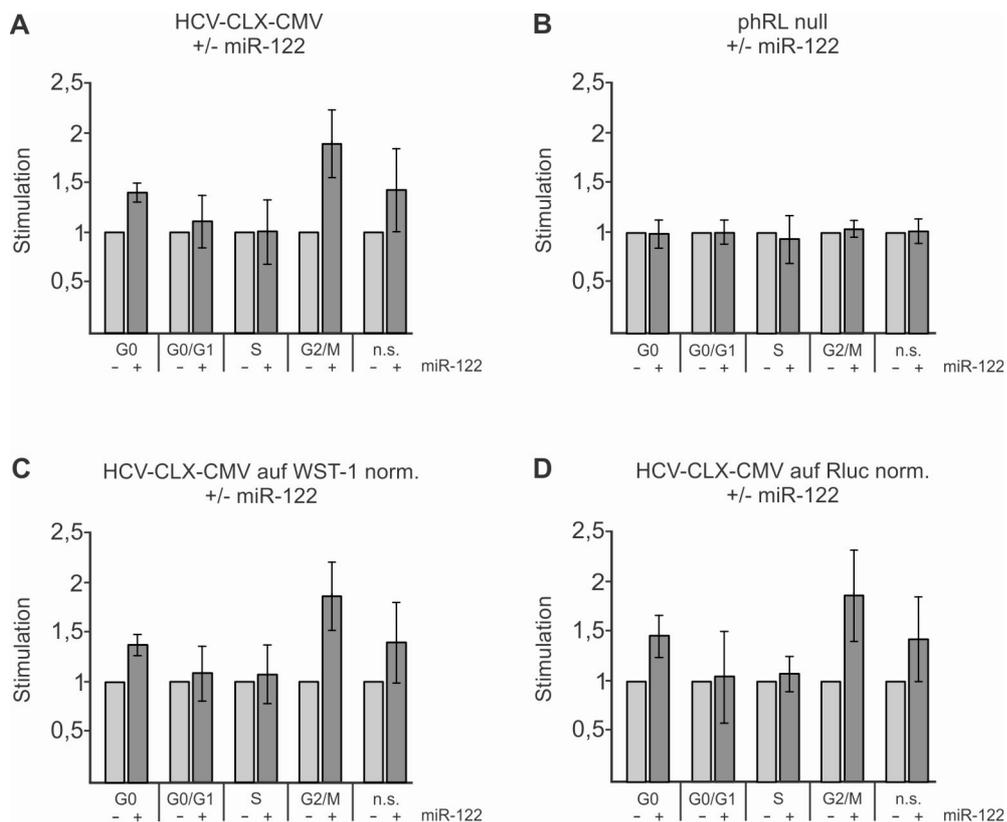


Abb. 32 Effekt der miR-122 auf die Translation von HCV in verschiedenen Zellzyklusphasen in HeLa-Zellen

(A) bis (D) dargestellt sind die Effekte der miR-122 auf die transfizierten Reporter sowie die normalisierten Werte. (A) Stimulation der miR-122 auf die HCV-FLuc-Expression in den verschiedenen Zellzyklusphasen bezogen auf die jeweilige Translationseffizienz des HCV-FLuc-Reporters (auf 1 gesetzt). (B) Effekt der miR-122 auf die RLuc-Expression in den verschiedenen Zellzyklusphasen bezogen auf die jeweilige Translationseffizienz des RLuc-Reporters (auf 1 gesetzt). (C) Normalisierung der Effekte des HCV-FLuc-Reporters auf WST-1. (D) Normalisierung der Effekte der FLuc-Daten auf den Co-Reporter RLuc.

Fazit: In HeLa-Zellen ist eine ähnliche Verteilung der Stimulation der Translation des HCV-FLuc-Reporters wie in Huh7-Zellen zu beobachten. Der Effekt der miR-122 ist in der G₂/M-Phase des Zellzyklus am höchsten. In der G₀-Phase erfolgt eine Stimulation von ungefähr 1,4-fach. In der S-Phase jedoch bleibt der stimulierende Effekt praktisch aus.

2.4.4 Unterschiedliche Expression der microRNA-122 innerhalb des Zellzyklus

Zu Beginn der Transfektionsversuche wurde angenommen, dass in der S- und G₂/M-Phase die Effizienz der Translation nur sehr gering ist und damit wohl auch die Stimulation durch die microRNA-122 schwer zu messen ist. Jedoch wurde diese Theorie nicht bestätigt. Die Zelle setzt zwar in diesen erwähnten Phasen des Zellzyklus nicht den Schwerpunkt auf die Translation von mRNA, dennoch könnten weitere Faktoren und Proteine eine Rolle bei der zellzyklus-

abhängigen Stimulation der Translation der HCV-RNA spielen. Da von einigen Gruppen schon bestätigt wurde, dass microRNAs zellzyklus-abhängig exprimiert werden und sogar den Zellzyklus betreffende Proteine beeinflussen (Vasudevan *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010 und Boutz *et al.*, 2011), könnte es auch sein, dass ebenfalls die Menge der leberspezifisch exprimierten miR-122 im Laufe des Zellzyklus variiert.

Um diese Frage zu beantworten, wurden Huh7-Zellen in den jeweiligen Phasen des Zellzyklus synchronisiert und die gesamte zelluläre RNA extrahiert (s. Kapitel 4.2.1.4.3). Da jedoch die miR-122 praktisch ausschließlich in Leberzellen vorkommt, jedoch nicht in großen Mengen vorliegt, mussten in der S-Phase mindestens 20 µg der gesamten extrahierten RNA auf das Analyse-Gel aufgetragen werden, damit die miR-122 noch detektiert werden konnte. Dabei wurden die Probenaufträge aus verschiedenen Zellzyklusphasen auf die gleiche Zellzahl angeglichen und die miR-122 im Northernblot nachgewiesen.

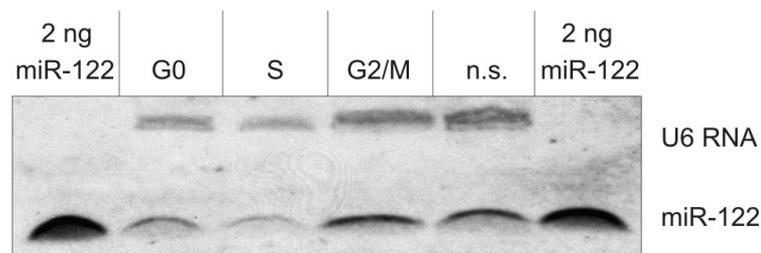


Abb. 33 Expression der miR-122 in verschiedenen Phasen des Zellzyklus in Huh7-Zellen

Dargestellt ist die zellzyklus-abhängige Expression der miR-122 und der snRNA U6 in Huh7-Zellen. In jeder Spur wurde die extrahierte Gesamt-RNA von etwa $1,4 \times 10^8$ Zellen aufgetragen. Als Kontrolle dienten 2 ng der einzelsträngigen miR-122. n.s.: nicht synchronisierte Zellen.

In Abbildung 33 ist die zellzyklus-abhängige Expression der miR-122 und der snRNA U6 gezeigt. Als Kontrolle wurden jeweils 2 ng einzelsträngige miR-122 aufgetragen. Es ist deutlich zu sehen, dass die Expression der miR-122 in der S-Phase am geringsten ist und zur G₂/M-Phase zunimmt. Auch in der G₀-Phase ist die Menge an miR-122 höher als in der S-Phase. Dieses Expressionsmuster korreliert also mit dem Stimulationseffekt der HCV-FLuc-RNA durch die miR-122 in Huh7- sowie in HeLa-Zellen. Obwohl der beobachtete Effekt in Huh7-Zellen stärker war, jedoch auch in HeLa-Zellen gesehen wurde und diese keine endogene miR-122 besitzen, müssen noch weitere zellzyklus-spezifische Faktoren an diesem Effekt beteiligt sein.

Als gängige Beladungskontrolle von RNA-Gelen für Northernblots sollte die snRNA (engl. small nuclear RNA) U6 dienen, was jedoch in diesem Fall nicht funktioniert, da diese zellzyklus-abhängig exprimiert wird (White *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2004). Daher wurden die auf das Analyse-Gel aufzutragenden Mengen

an die Zellzahl angeglichen, um eine Fehlinterpretation der miR-122-Mengen zu umgehen.

Fazit: Die Expression der microRNA-122 ist in der G₂/M-Phase am stärksten und nimmt über die G₀-Phase zur S-Phase hin ab. Dieses Expressionsmuster der miR-122 in den verschiedenen Zellzyklusstadien stimmt mit der Stimulation der Translation der HCV-FLuc-RNA in den jeweiligen Zellzyklusstadien überein.

2.4.5 Zellzyklus-abhängige Expression weiterer Faktoren in Bezug auf die Stimulation der HCV-Translation

Weitere Faktoren, die an der Stimulation der HCV-RNA beteiligt sind, könnten zum Beispiel die Argonaute (Ago)-Proteine sein. Da diese zum einen in RISC-Komplexen zusammen mit microRNAs vorliegen und zum anderen die miR-122 die HCV-Translation stimuliert (siehe Abb. 31 und Henke *et al.*, 2008), könnten möglicherweise auch Ago2 oder weitere Proteine wie zum Beispiel GW182 einen Einfluss auf die Stimulation haben beziehungsweise beteiligt sein. Ago2 ist ein Teil von so genannten miRNP (microRNA-Protein)-Komplexen, welche bei der Regulation von mRNAs beteiligt sind. Es wurde gefunden, dass Ago-Proteine mit den P-Bodies kolokalisieren (Liu *et al.*, 2005 und Meister *et al.*, 2005), in denen sich neben Proteinen, die in der mRNA-Degradation oder der Translationsreprimierung involviert sind, auch deren Ziel-mRNAs befinden (Eulalio *et al.*, 2007).

Das GW182-Protein ist assoziiert mit spezifischen mRNAs und interagiert zum Beispiel auch mit Ago1. Es ist in den gleichen vereinzelt Regionen des Cytoplasma zu finden wie die Argonaute-Proteine, nämlich in den P- oder auch GW-Bodies (Eystathioy *et al.*, 2002 und Eulalio *et al.*, 2007). Da schon gezeigt wurde, dass GW-Bodies in verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedlich stark vorhanden sind (Yang *et al.*, 2004), stellt sich die Frage, ob auch Argonaute-Proteine zellzyklus-abhängig in der Zelle vorliegen.

Für die Beantwortung dieser Frage wurden HeLa- sowie Huh7-Zellen in den jeweiligen Zellzyklusstadien synchronisiert und anschließend lysiert (s. Kapitel 4.2.4.6.2). In diesen Zellextrakten wurden Ago2 und GW182 mittels Westernblot nachgewiesen.

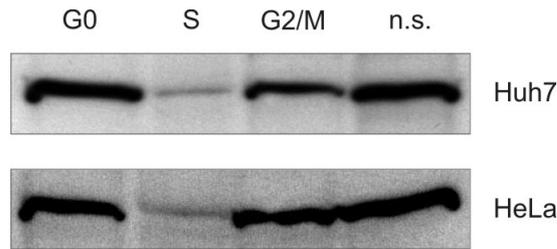


Abb. 34 Expression des Argonaute-2 Proteins in verschiedenen Zellzyklusphasen

Dargestellt ist die zellzyklus-abhängige Expression von Ago2 in Huh7- und HeLa-Zellen. Je Spur wurde Zellextrakt von 2×10^4 Zellen aufgetragen. Dieser Westernblot wurde von K. D. Conrad nach der Methode von Rüdél *et al.* (2008) durchgeführt. Der Ago2-Antikörper wurde uns von G. Meister (Regensburg) bereitgestellt. n.s.: nicht synchronisierte Zellen.

Bei der Analyse der Verteilung von Ago2 innerhalb des Zellzyklus (Abbildung 34) erkennt man eindeutig, dass die Expression in der S-Phase sowohl in Huh7- als auch in HeLa-Zellen stark zurückgeht. In der G_0 -Phase ist die Expression am stärksten, gefolgt von der G_2/M -Phase. Die nicht synchronisierten Zellen sind eine Mischung aus Zellen unterschiedlicher Zellzyklusstadien, und damit ist auch dort die Menge an Ago2 stark ausgeprägt.

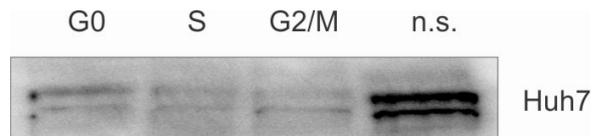


Abb. 35 Expression von GW182 in verschiedenen Phasen des Zellzyklus

Dargestellt ist die zellzyklus-abhängige Expression von GW182 in Huh7-Zellen. Pro Spur wurde Zellextrakt von 2×10^4 Zellen aufgetragen. Dieser Westernblot wurde von K. D. Conrad durchgeführt. n.s.: nicht synchronisierte Zellen.

Bei der Verteilung von GW182 in den unterschiedlichen Zellzyklusstadien (Abbildung 35) lässt sich kein zellzyklus-spezifisches Muster wie bei dem Ago2-Protein beobachten. Dieses Ergebnis korreliert nicht mit der Beobachtung, dass GW-Bodies in der späten S- und G_2 -Phase verstärkt vorliegen, jedoch in der G_1 - und frühen S-Phase nur schwer zu detektieren sind (Lian *et al.*, 2006 und Yang *et al.*, 2004).

Fazit: Das Ago2-Protein ist innerhalb des Zellzyklus unterschiedlich exprimiert. So ist in der G_0 -Phase die höchste Menge an Ago2 vorhanden. In der G_2/M -Phase ist diese Expression etwas reduziert und in der S-Phase fast gar nicht mehr vorhanden. Das Protein GW182 ist im Gegensatz dazu nicht eindeutig zellzyklus-abhängig exprimiert.

2.5 Diskussion Teil II

2.5.1 Optimierung der Zellsynchronisierung

Da in Untersuchungen der verschiedenen Zellzyklusphasen meist HeLa-, HEK293- oder NIH/3T3-Zellen benutzt werden, ergab sich zunächst die Aufgabe, die Synchronisierungs-Protokolle für die in dieser Arbeit verwendeten Huh7-Zellen zu optimieren.

In Zellzyklus-Studien werden Zellen gezielt in der gewünschten Phase arretiert und in weiteren Experimenten als homogene Zellpopulation, die sich in einer definierten Zellzyklusphase befindet, analysiert. Bei Untersuchungen des Zellzyklus wurde bisher eine Vielzahl von Zelltypen durch unterschiedliche Methoden synchronisiert (zusammengefasst in Jackman u. O'Connor, 2001). Um Zellen in der G₁/S-Phase zu arretieren, behandelt man die Zellen mit Desoxythymidin zur allosterischen Inhibierung der Ribonukleotid-Reduktase und der Desoxynukleosid Kinase (Mikkelsen *et al.*, 2003) oder mit Mimosin, wodurch die Zellen daran gehindert werden in die S-Phase überzugehen (Bostock *et al.*, 1971; Hughes u. Cook, 1996 und Urbani *et al.*, 1995). Für die Synchronisierung in der S-Phase können Hydroxyharnstoff, das die Ribonukleotid-Reduktase hemmt, oder Aphidicolin, welches die DNA-Polymerase inhibiert, verwendet werden (Ikegami *et al.*, 1978; Darzynkiewicz *et al.*, 1979 und Urbani *et al.*, 1995). Möchte man Zellen in der G₂/M-Phase blocken, erfolgt dies am besten mit Nocodazol, Colcemid (verhindern die Mikrotubuli-Polymerisierung) oder mit dem so genannten „Shake off“ (Schorl u. Sedivy, 2007; Zieve *et al.*, 1980 und Urbani *et al.*, 1995). Die G₀- oder Ruhephase kann erreicht werden, indem die Zellen entweder unter Entzug von Wachstumsfaktoren oder bis zur Kontaktinhibition inkubiert werden (Schorl u. Sedivy, 2007).

In dieser Arbeit wurde zunächst nach geeigneten Methoden der Synchronisierung für die Zelllinien Huh7 und HeLa gesucht. Eine Synchronisierung in der G₂/M-Phase mit der Behandlung durch Nocodazol zeigte in der FACS (fluorescence activated cell sorting)-Analyse einen starken Peak für das 4-Chromatid-Chromosomenstadium, also der G₂/M-Phase. Allerdings wurde auch ein Peak von G₀/G₁-Zellen detektiert. Somit waren nicht alle Zellen, die mit dieser Methode synchronisiert, wurden in der G₂/M-Phase, und alle weiterführenden Versuche hätten Zellen mit einbezogen, die sich noch in der G₀/G₁-Phase befinden, und dadurch das Ergebnis möglicherweise verfälscht.

Eine alternative Methode stellt der „Shake off“ dar. Dabei werden abgerundete mitotische Zellen mechanisch von der Zellkulturschale gelöst (Hulleman *et al.*, 1999). Da aber die Ausbeute an abgerundeten mitotischen Zellen sehr gering ist und daher besonders viele Zellen als Ausgangsmaterial verwendet werden müssen, wurde hier die Nocodazol-Behandlung mit dem „Shake off“ kombiniert. So wurden die Zellen zunächst mit Nocodazol behandelt. Im Anschluss daran konnten dann viele mitotische abgerundete Zellen durch den „Shake off“ von der Zellkulturschale gelöst werden. Als Ergebnis erhält man bei der FACS-Analyse einen einzelnen Peak von Zellen in der G₂/M-Phase.

Für eine Synchronisierung der Zellen in der S-Phase wurden zunächst Huh7-Zellen mit der Methode des doppelten Thymidin-Blocks gestoppt. Dabei stellte sich heraus, dass auch diese Methode für Huh7-Zellen nicht zum Erfolg führte. Deshalb wurden hier wiederum verschiedene Methoden kombiniert. Zuerst wurden die Zellen mit Hilfe des Nocodazol-Blocks in der M-Phase arretiert und mit Hilfe des „Shake off“ gesammelt. Diese Zellen wurden dann mit Thymidin für 19 Stunden inkubiert. Bei dieser Kombination der Methoden erhält man dann nach kurzer Rekultivierung der Zellen in frischem Medium ohne Thymidin Zellen in der S-Phase.

Die G₀-Phase der Huh7- und HeLa-Zellen wurde in dieser Arbeit mit einem Wachstum der Zellen bis zu einer Dichte von 100 % erreicht. Nachdem diese Dichte erreicht wurde, wurden die Zellen zusätzliche 24 Stunden inkubiert. In der FACS-Analyse ist ein deutlicher Peak beim 2-Chromatid-Chromosomenstadium, das der G₀- oder G₁-Phase entspricht, zu erkennen. Dieser Peak ist gleich bleibend für etwa sechs Stunden zu beobachten. Allerdings gehen die Zellen nach dem Splitten und einer Rekultivierung in frischem Medium schnell wieder in die G₁-Phase über, was nur durch einen Westernblot detektierbar war. In der G₀-Phase wird das Protein p27^{Kip1} sehr stark exprimiert (Polyak *et al.*, 1994; Llyod *et al.*, 1999 und Coats *et al.*, 1996). Bei den analysierten Zellen konnte dieses Protein nur bis maximal zwei Stunden nach der Rekultivierung nachgewiesen werden. Folglich mussten alle Experimente, die in der G₀-Phase erfolgen sollten, innerhalb dieser Zeit durchgeführt werden. Bei den in der hier vorliegenden Arbeit folgenden Transfektionsversuchen wurden die Huh7- und HeLa-Zellen daher für die G₀-Phase in der 24-well-Platte bis zur Konfluenz von 100 % inkubiert und dann im selben Well transfiziert, um sicherzustellen, dass kein Übergang zur G₁-Phase stattfinden kann.

2.5.2 Normalisierungsprobleme bei Zellzyklus-Experimenten

Bei Untersuchungen zellzyklus-abhängiger Vorgänge ist es schwer, ein geeignetes Mittel für eine Normalisierung zu finden, da viele Parameter bei den Experimenten eine Rolle spielen.

Für eine Normalisierung der aufzutragenden RNA-Mengen bei einem Northernblot wurde bei dieser Arbeit auf die gängige Angleichung der snRNA U6 verzichtet. In dieser Arbeit konnte bei Experimenten mit HeLa-Zellen eine etwas stärkere Expression von U6 in der S-Phase im Vergleich zu den übrigen Zellzyklusphasen detektiert werden. Im Gegensatz dazu ist bei Huh7-Zellen in der S-Phase die geringste Konzentration an U6 detektierbar.

Es wurde berichtet, dass die Expression von U6 in den einzelnen Zellzyklusphasen unterschiedlich ist (White *et al.*, 1995 und Hu *et al.*, 2004). Für die Transkription des U6-Gens ist die Polymerase III verantwortlich (Brow u. Guthrie, 1988). Diese wird unter anderem durch die Proteinkinase CK2 reguliert. CK2 phosphoryliert zu unterschiedlichen Zeiten des Zellzyklus verschiedene Proteine des Polymerase-Komplexes und reguliert dadurch die Transkription (Hu *et al.*, 2004). Bei den Untersuchungen von White und Hu wurde beobachtet, dass U6 in der S-Phase in großen Mengen vorliegt, die Menge jedoch in der M- und in der G₀-Phase reduziert ist (White *et al.*, 1995 und Hu *et al.*, 2004). In der Studie von White *et al.* (1995) wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Methoden synchronisiert und dann analysiert. Anhand der FACS-Ergebnisse befinden sich die Zellen jedoch statt in der S-Phase eher am Übergang zwischen G₁ und S, da der Peak der analysierten Zellpopulation nicht zwischen den beiden Hauptpeaks der G₀/G₁- und G₂/M-Phase liegt. Bei den Experimenten von Hu *et al.* wurden HeLa-Zellen nur durch die Behandlung von Hydroxyharnstoff synchronisiert und zu bestimmten Zeitpunkten analysiert. Jedoch sind dort keine FACS-Daten gezeigt, die belegen, dass sich die Zellen tatsächlich in den angegebenen Phasen befinden. Bei beiden Gruppen kam heraus, dass die U6-Menge in der S-Phase am größten ist, in der G₂-Phase abnimmt, während der Mitose keine U6-RNA detektiert ist und U6 in der G₁-Phase nur in geringen Mengen vorliegt.

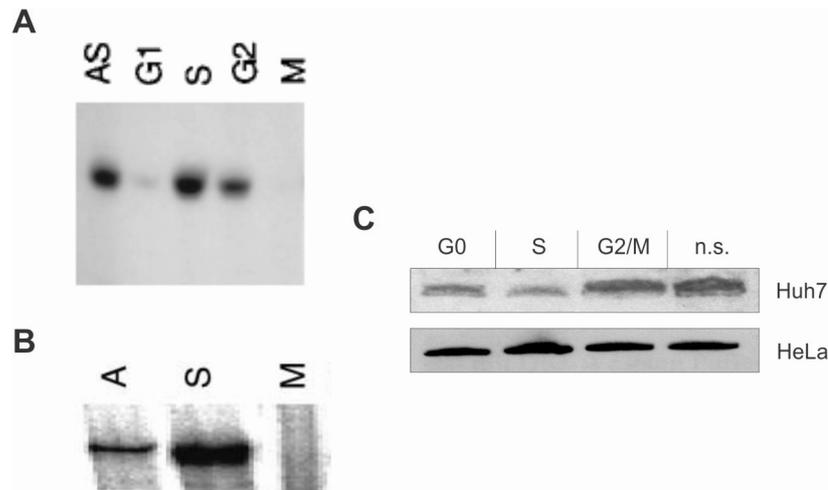


Abb. 36 Expression von U6 während unterschiedlichen Zellzyklusphasen

(A) bis (C) dargestellt ist die Expression von U6 in verschiedenen Zellzyklusphasen. (A) Graphik übernommen aus White *et al.*, 1995. Northernblot für snRNA U6 aus HeLa-Zellen. (B) Graphik übernommen aus Hu *et al.*, 2004. Northernblot für snRNA U6 aus HeLa-Zellen. (C) Northernblots für die snRNA U6 aus Huh7- und HeLa-Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusstadien (eigene Daten). A, AS und n.s.: asynchron gewachsene Zellen. G0: G₀-Phase. G1: G₁-Phase. S: S-Phase. G2: G₂-Phase. G2/M: G₂/M-Phase. M: M-Phase.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte bei Experimenten mit HeLa-Zellen eine etwas stärkere Expression von U6 in der S-Phase im Vergleich zu den anderen Phasen nachgewiesen werden. Die Mengen von U6 in den Phasen G₀ und G₂/M sind jedoch annähernd gleich (s. Abb. 36 C). Bei Huh7-Zellen ist im Gegensatz dazu in der S-Phase die geringste Konzentration an U6 detektierbar, wobei das Verhältnis G₂/G₁ etwa mit der Berechnung von White *et al.* übereinstimmt (G₂/G₁ = 2,6).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Normalisierung auf die Menge der snRNA U6 bei RNA-Expressionsuntersuchungen für Zellzyklus-Experimente per Northernblot nicht geeignet ist und daher eine Normalisierung auf die Zellzahl eine sinnvollere Option darstellt.

Ein weiteres Problem der Normalisierung besteht bei Transfektionsexperimenten in verschiedenen Zellzyklusstadien. Dabei gibt es eine Vielzahl von Variablen, die beachtet werden sollten, was es erschwert, einen geeigneten Parameter für eine Normalisierung der gemessenen FLuc-Daten zu finden. Zum Teil handelt es sich um unterschiedliche Zellzahlen. Diese Zellen können verschiedene Zellvolumina haben, woraus sich eventuell unterschiedliche Proteinmengen ergeben. Des Weiteren können auch durch größere Zellvolumina mehr Zellorganellen vorliegen, die zum Beispiel den Zellmetabolismus fördern können. Da bei Transfektionen die Translation einer Reporter-RNA untersucht wird, sollte man ebenso die Translation eines Co-

Reporters betrachten. Damit ist es schwer einen Parameter zu bestimmen, der für eine Normalisierung sinnvoll erscheint.

Die Zellzahl kann bei Transfektionen nicht in allen Fällen gut bestimmt werden, da die Zellen für die G₀-Phase in einer 24-well-Platte bis zur Kontaktinhibition wachsen und es bei konfluenten Zellkulturen problematisch ist, die Zellzahl zu bestimmen. Die co-transfizierte RLuc-RNA war ebenso nicht sonderlich gut geeignet, da zum Beispiel die durch RLuc normalisierten FLuc-Ergebnisse (FLuc/RLuc) in der S-Phase deutlich anstiegen und die Translation des RLuc-Reporters bei einigen Experimenten mit der Translation der HCV-FLuc-RNA korrelierte. In dieser Arbeit wurde auch die Proteinmenge der transfizierten Zellen sowie die metabolische Aktivität durch die Messung der Umsetzung von WST-1 bestimmt. Diese beiden Faktoren korrelierten weitestgehend. Da die metabolische Aktivität auch in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus sehr ähnlich war, war die WST-1 Messung ein gutes Mittel für die Normalisierung der FLuc-Daten.

3 Schlussdiskussion

3.1 Die Effizienz von Cap- und IRES-abhängiger Translation geht in der Mitose-Phase am stärksten zurück

Die Translationseffizienz des HCV-FLuc-Reporterkonstrukts wie auch des Co-Reporters (phRL null) sind in der G₀-Phase am höchsten und nehmen in der S- und G₂/M-Phase stark ab, während die metabolische Aktivität der Zellen nur geringen Schwankungen unterworfen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei RNA-Konstrukte verwendet. Zum einen ein HCV-Reporterkonstrukt, bei dem die *Firefly*-Luziferase (FLuc) Sequenz von der 5'- und 3'-UTR des HCV flankiert ist, zum anderen ein gecappter und polyadenylierter Co-Reporter kodierend für die *Renilla*-Luziferase (RLuc). Die cap-abhängige Translation der RLuc-Reporter-RNA nimmt stetig von der G₀-Phase über die S-Phase zur G₂/M-Phase hin ab. Die Translationseffizienz bei der HCV-RNA korreliert mit der des RLuc-Reporters. So ist die Translation der HCV-RNA in der G₀/G₁-Phase am höchsten und nimmt in der S- und G₂/M-Phase deutlich ab.

Der Rückgang der Effizienz cap-abhängiger Translation in der M-Phase stimmt mit den Ergebnissen bekannter Veröffentlichungen übereinstimmt (Bonneau u. Sonenberg, 1987 und Pyronnet *et al.*, 2001). So ist die cap-abhängige Translation zum einen durch Phosphorylierung von eIF2 α während der Mitose gehemmt (Datta *et al.*, 1999 und Tinton *et al.*, 2005). Zum anderen ist die cap-abhängige Translation durch die Inhibierung des Initiationsfaktors eIF4E reduziert (Spriggs *et al.*, 2008 und Pyronnet *et al.*, 2001). Dies erfolgt durch den eIF4F-Komplex, dessen Aktivität durch die Regulation des eIF4E mit Hilfe spezieller Bindeproteine (4E-BPs) gesteuert wird (Poulin *et al.*, 1998). Binden 4E-BPs an eIF4E, so kann keine Interaktion zwischen eIF4G und eIF4E erfolgen, und die Translation ist inhibiert. In nicht proliferierenden Zellen liegt 4E-BP1 hypophosphoryliert vor und bindet an eIF4E, wodurch sich der eIF4F-Komplex nicht formieren kann. Wird jedoch die Zelle zur Teilung angeregt, wird 4E-BP1 phosphoryliert, und der eIF4F-Komplex kann sich bilden (Spriggs *et al.*, 2008).

In diesen Situationen erfolgt die Translation bestimmter RNAs über deren IRES-Elemente. Jedoch werden zum Beispiel in der Mitose-Phase diverse RNAs mit einer IRES nicht gleich gut translatiert (Qin u. Sarnow, 2004; Kozak, 2005). Je nach dem wie stark der Einfluss der IRES ist, kann es auch in der M-Phase zu einer Reprimierung der Translation kommen. Außerdem kann die Effizienz der cap-abhängigen Translation trotz eines Rückgangs auf 30 % in der Mitose-Phase, im

Vergleich zur Translationseffizienz in anderen Phasen, höher sein als die Effizienz einer IRES-abhängigen Translation zu diesem Zeitpunkt (Kozak, 2005).

In der hier vorliegenden Arbeit ist die Translation der HCV-RNA in der G₀/G₁-Phase am höchsten und nimmt in der S- und G₂/M-Phase deutlich ab. Anders als in einer Studie von Honda *et al.* (2000), in der eine Steigerung der Translation einer HCV-RNA während der M-Phase berichtet wurde, ist ebenso in der Gruppe von A. Dasgupta ein Rückgang der Translation von HCV in der G₂/M-Phase detektiert worden (Venkatesan *et al.*, 2003). In der S-Phase zeigte dort das Verhältnis von FLuc zu RLuc einen höheren Wert als in der G₁- und G₂/M-Phase, was auch den in der hier vorliegenden Arbeit ermittelten Werten entspricht (s. Abb. 29 und 30). Allerdings ist dies wohl eher ein Effekt, der durch den Rückgang der Effizienz der RLuc-Translation in der S-Phase zustande kommt, als ein Anstieg der HCV-abhängigen FLuc-Translation. Bei der Veröffentlichung von Honda *et al.* (2000) handelt es sich nicht eindeutig um eine homogene Zellpopulation, die sich in der G₂/M-Phase befindet, weshalb wahrscheinlich auch Zellen, die sich in der G₁-Phase befinden, mit in die Auswertung einfließen. Bei der hier vorliegenden Arbeit hingegen wurden durch eine Nocodazol-Behandlung mit anschließendem „Shake off“ nur die Zellen analysiert, die sich tatsächlich in der G₂/M-Phase befinden (s. Abb. 23).

Möglicherweise wurden bei der Studie von Honda *et al.* die Zellen nur ein Mal mit Aphidicolin synchronisiert und dann zu bestimmten Zeitpunkten analysiert, um eine Schädigung der Zellen durch mehrmaliges Durchführen verschiedener Synchronisierungsmethoden auszuschließen. So kann zum Beispiel durch die Behandlung der Zellen mit Nocodazol die Endozytose beeinträchtigt werden (Breitfeld *et al.*, 1990), was verfälschte Transfektionsergebnisse liefern würde. Allerdings ist eine Behandlung mit Nocodazol schnell reversibel (Zieve *et al.*, 1980 und De Brabander *et al.*, 1981). Da die Transfektionen in der hier vorliegenden Arbeit erst ca. zwei Stunden nach der jeweiligen Synchronisierungsbehandlung erfolgten, kann man davon ausgehen, dass sich die Zellen bis zu diesem Zeitpunkt vollständig von der vorangegangenen Nocodazol-Behandlung erholt haben. Dies ist auch bei der metabolischen Aktivität der Zellen zu erkennen, da diese in den verschiedenen Zellzyklusphasen jeweils zum Zeitpunkt der Transfektion beziehungsweise der Ernte der Zellen etwa gleich hoch war, was auf die Funktionstüchtigkeit der Zellen schließen lässt.

3.2 HCV und Zellzykluskontrolle

Die Ergebnisse der Untersuchung der Translationseffizienz von HCV zeigen, dass HCV am besten in der G₀- und G₁-Phase translatiert. Dieser Befund passt gut damit zusammen, dass Hepatozyten sich meist in der G₀-Phase befinden (Dancygier, 2003) und somit die initiale Translation der HCV-RNA dort unter optimalen Bedingungen erfolgen kann. Hinzu kommen einige Proteine von HCV, die bei der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind und die den Verbleib der Hepatozyten in diesen Zellzyklusphasen begünstigen (Nishimura-Sakurai *et al.*, 2010 und Blackham *et al.*, 2010). Ein Überblick über die verschiedenen Wirkungen der HCV-Proteine auf den Zellzyklus ist in der Tabelle 2 (s. unten) dargestellt.

Das HCV-Core-Protein vermindert die Aktivität von cdk2 und cdk4 durch eine Interaktion mit der CDK (Cyclin abhängige Kinasen) aktivierenden Kinase (Ohkawa *et al.*, 2004), was einen Stopp in der G₁-Phase hervorruft. Auch kann das Core-Protein Zellen in der G₀-Phase arretieren, indem es p27^{Kip1} ebenfalls stabilisiert (Yao *et al.*, 2003). Als unprozessiertes Vorläuferprotein kann Core ebenso zu einer erhöhten Expression von p21 führen und auch auf diese Weise in der G₀/G₁-Phase den Zellzyklus hemmen (Nguyen *et al.*, 2003). Die Infektion mit HCV führt unter anderem zu einer vermehrten Expression des Proteins TXNIP1 (Blackham *et al.*, 2010). Durch dieses Protein wird p27^{Kip1} stabilisiert und kann somit nicht ubiquitinyliert und abgebaut werden (Yamaguchi *et al.*, 2008 und Dunn *et al.*, 2010), was auch dazu beiträgt, dass die G₀-Phase bestehen bleibt. Diese Aufrechterhaltung der G₀/G₁-Phase in Hepatozyten durch Proteine des Hepatitis C Virus kann somit zu Beginn einer HCV-Infektion zu einer verbesserten Translation der HCV-RNA in den Hepatozyten beitragen.

Im weiteren Verlauf der Krankheit wird dann wahrscheinlich die Proliferation der Leberzellen bevorzugt. So hat Core als prozessiertes Protein die Wirkung, dass die p21-Expression reprimiert wird (Nguyen *et al.*, 2003 und Lee *et al.*, 2002) und verschiedene MAP-Kinasen oder Transkriptionsfaktoren aktiviert werden (Erhardt *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2001a und Cho, *et al.*, 2001b), was ein Fortschreiten des Zellzyklus veranlasst. Ebenso wird das Rb (Retinoblastom Tumor Suppressor)-Protein vermindert exprimiert (Cho *et al.*, 2001a) oder bildet mit dem viralen NS5B-Protein einen Komplex, so dass E2F freigesetzt wird und Gene verschiedener Zellzyklus regulierender Proteine transkribiert werden können (Munakata *et al.*, 2005 und McGivern u. Lemon, 2011), die den Verlauf des Zellzyklus vorantreiben.

Tabelle 2: Auswirkungen der HCV-Proteine auf den Zellzyklus

Protein	Wirkung auf Zellzyklus	Referenz
Core	Proliferation durch geringere Expression von Rb und erhöhte Level von E2F-1 bzw. Cyclin E	Cho <i>et al.</i> , 2001a; b
	Proliferation durch Aktivierung von MAP-Kinasen und der Transkriptionsfaktoren AP-1 bzw. ATF-2	Erhardt <i>et al.</i> , 2002
	Zellproliferation durch Expressionsrückgang von p21	Lee <i>et al.</i> , 2002
	G ₀ /G ₁ -Stop durch Stabilisierung von p27	Yao <i>et al.</i> , 2003
	unprozessiertes Core: G ₀ /G ₁ -Stopp durch vermehrte p21-Expression prozessiertes Core: Proliferation durch Repression von p21	Nguyen <i>et al.</i> , 2003
	G ₁ /S-Phase-Stopp durch verringerte cdk2-Expression	Ohkawa <i>et al.</i> , 2004
NS2	S-Phase-Stopp durch verringerte Cyclin A-Expression	Yang <i>et al.</i> , 2006
NS3	Proliferation durch Reprimierung der p21-Transkription	Kwun <i>et al.</i> , 2001
	Zellproliferation durch Aktivierung von JNK und der Transkriptionsfaktoren AP-1 bzw. ATF-2	Hassan <i>et al.</i> , 2005
NS5A	verspäteter Zellzyklus-Stopp während der Mitose	Baek <i>et al.</i> , 2006
NS5B	Proliferation durch erhöhte Level von E2F, da NS5B Komplex mit Rb bildet	Munakata <i>et al.</i> , 2005
	Verlängerung der S-Phase durch Toll-Like Rezeptor 3 und IFN- β	Naka <i>et al.</i> , 2006
	Proliferation durch Rb-Ubiquitinylierung	McGivern u. Lemon, 2011

3.3 Zellzyklus-abhängige Stimulation der Translation der HCV-RNA durch die leberspezifische miR-122

Die Translation der HCV-RNA wird nicht nur im Laufe des Zellzyklus reguliert, sondern darüber hinaus auch von einigen Faktoren beeinflusst wie von der leberspezifische miR-122 (Henke *et al.*, 2008). Da die Translationseffizienz von HCV wie in dieser hier vorliegenden Arbeit zellzyklus-abhängig ist, kam die Frage auf, ob die Stärke der Stimulation durch die miR-122 auch im Laufe des Zellzyklus variiert. microRNAs binden an eine Ziel-mRNA durch eine nicht vollständige Basenpaarung, wobei einzelne miRNAs viele mRNAs regulieren können. So sind sie an der Regulation der Aktivität einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt (Pillai *et al.*, 2007 und Inui *et al.*, 2010). Einige miRNA-Gene befinden sind beim Menschen in Regionen, die verschiedene Gene kodieren, die mit der Entstehung von Krebs

assoziiert sind (Orom *et al.*, 2008). Zusätzlich wurde gezeigt, dass auch eine gestörte Regulation von microRNAs direkt an einer Krebsentstehung beteiligt sein kann (He *et al.*, 2005 und Voorhoeve *et al.*, 2006). Infolgedessen können microRNAs nicht nur „normale“ Ziel-mRNAs beeinflussen, sondern zum Beispiel auch auf den Zellzyklus einwirken, indem die Expression Zellzyklus regulierender Proteine inhibiert oder stimuliert wird (Bueno u. Malumbres, 2011).

microRNAs können aber nicht nur den Zellzyklus beeinflussen, sondern sie können auch in den verschiedenen Zellzyklusphasen eine unterschiedliche Funktion haben. Die Gruppe von J. Steitz zeigte 2008, dass die miR-369-3 die Translation des TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) in der G₀-Phase, jedoch nicht in proliferierenden Zellen, stimuliert (Vasudevan u. Steitz, 2007 und Vasudevan *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Stimulation der miR-122 auf die Translation der HCV-RNA in den unterschiedlichen Zellzyklusstadien in Huh7- und HeLa-Zellen untersucht. Das Ergebnis zeigt, dass die Stimulation der Translation der HCV-RNA am besten während der G₀-, G₁- und G₂/M-Phase erfolgt. In der S-Phase findet keine oder kaum eine Stimulation durch die miR-122 statt. Dieses Muster wurde sowohl in Huh7- als auch in HeLa-Zellen gesehen, wobei die Stimulation während der G₂/M-Phase in HeLa-Zellen stärker ausgeprägt war als in Huh7-Zellen.

Da die Stimulation der Translation der HCV-RNA nur in manchen Phasen erfolgt, stellte sich die Frage, ob die miR-122 in Hepatozyten gleich bleibend exprimiert wird oder ihre Menge auch innerhalb des Zellzyklus variiert.

Das Expressionsmuster der miR-122 in Huh7-Zellen zeigt eine Übereinstimmung mit der Stimulation der Translation durch die miR-122 in den einzelnen Zellzyklusphasen. Während in der S-Phase nur sehr wenig miR-122 nachzuweisen war, konnte sie in den anderen Phasen gut detektiert werden (s. Abb. 33).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass zu Beginn der HCV-Infektion die vorherrschenden Bedingungen nicht proliferierender Hepatozyten die HCV-Translation begünstigen. Das Hepatitis C Virus hat sich die miR-122 zu Nutze gemacht und integriert sie sowohl in seine Translation als auch in seine Genomreplikation (Niepmann, 2009; Jangra *et al.*, 2010; Machlin *et al.*, 2011 und Villanueva *et al.*, 2010).

Die Rolle der miR-122 in den späteren Stadien einer chronischen Hepatitis und bei der Entstehung eines Leberkarzinoms ist jedoch noch nicht geklärt. Die miR-122 scheint in Hepatozyten den Lipid- und Cholesterollowerstoffwechsel zu fördern und dadurch die Funktion der Leber aufrecht zu erhalten (Esau *et al.*, 2006). Dies wird durch Untersuchungen an Maus-Embryonen bestätigt, bei denen steigende Mengen an miR-122 mit der Differenzierung des Lebergewebes korrelieren (Chang *et al.*, 2004). Bei der Entstehung eines Leberkarzinoms (HCC) dagegen ist die miR-122-Expression meist verringert (Ma *et al.*, 2010 und Gramantieri *et al.*, 2007). Jedoch kann die Entstehung von HCC nicht nur durch den Rückgang der miR-122-Menge

erklärt werden, da die HCC-Entstehung ein komplexer Vorgang ist und viele Faktoren daran mitwirken (McGivern u. Lemon, 2011). Die Reduktion der miR-122 Menge in Hepatozyten des HCC kann eine erhöhte Expression des Cyclins G1 verursachen (Esau *et al.*, 2006 und Gramantieri *et al.*, 2007), was eine erhöhte Proliferationsrate zur Folge hat und möglicherweise auf lange Sicht einen undifferenzierten Zustand der Zellen hervorrufen kann.

3.4 Welche Faktoren sind an der Stimulation der Translation von HCV durch die miR-122 noch beteiligt?

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Translationseffizienz und die Stimulation der Translation von HCV in verschiedenen Zellzyklusphasen in unterschiedlichem Maße ablaufen. Zudem konnte eine Korrelation der Translationsstimulation der HCV-RNA mit der microRNA-122-Expression nachgewiesen werden.

Da microRNAs in so genannten miRNP-Komplexen gebunden und diese Komplexe aus verschiedenen Proteinen zusammengesetzt sind, könnten eben diese Proteine auch an der Wirkung der miR-122 in Bezug auf die Translation von HCV beteiligt sein. Eines dieser Proteine gehört zur Familie der Argonaute-Proteine, das so genannte Ago2. Die Argonaute-Proteine besitzen zwei microRNA-Bindedomänen, PAZ und PIWI. Die miRNAs können so mit ihrem 3'-Ende an der PAZ-Domäne und ihrem 5'-Ende an der PIWI-Domäne binden (Song *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2004 und Parker *et al.*, 2005), wodurch der 5'-Bereich der microRNA mit der „Seed“-Region (meist die Nukleotide 2 - 8) an die Ziel-RNA binden kann (Parker *et al.*, 2005). Da schon gezeigt wurde, dass die miR-122 mit der HCV-RNA interagiert (Henke *et al.*, 2008 und Jopling *et al.*, 2005), erscheint es plausibel, dass Ago2 auch bei dessen Translation eine Rolle spielt.

Durch den Nachweis von Ago2 mit Hilfe eines Westernblots zu den unterschiedlichen Zellzyklusphasen erkennt man, dass die Menge an Ago2 in der Zelle in der G₀-Phase am höchsten ist. In der G₂/M-Phase ist die Expression etwas geringer und in der S-Phase nur sehr schwach zu detektieren (s. Abb. 34). Die Menge anderer Proteine scheint dagegen in der S-Phase im Vergleich zu den übrigen Phasen unverändert zu sein. Das Ergebnis der Ago2-Expression zeigt demnach eine enge Korrelation mit der miR-122-Expression und den unterschiedlichen Stimulationsstärken der HCV-Translation durch die miR-122 innerhalb des Zellzyklus. Diese Korrelation legt nahe, dass die Stärke der Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 zum einen von der Menge an verfügbarer miR-122, zum anderen aber auch von der Verfügbarkeit der Kernkomponente von miRNP-Komplexen, dem Ago2-Protein, abhängt.

Die Gruppe um C. Richardson hat durch Experimente mit Ago2- und miR-122-Depletionen herausgefunden, dass der stimulierende Effekt der miR-122 auf die Translation von HCV durch Ago2 verstärkt wird (Wilson *et al.*, 2011). Wie jedoch die genaue Interaktion abläuft, ist noch nicht bekannt. Da es sich bei HCV um eine Stimulation der Translation handelt, ist möglicherweise auch der Effektor-Komplex mit miR-122 und Ago2 aus anderen Komponenten zusammengesetzt als bei der Repression der Translation normaler mRNAs. Neben Ago2 könnten auch verschiedene andere Proteine an dieser Stimulation beteiligt sein.

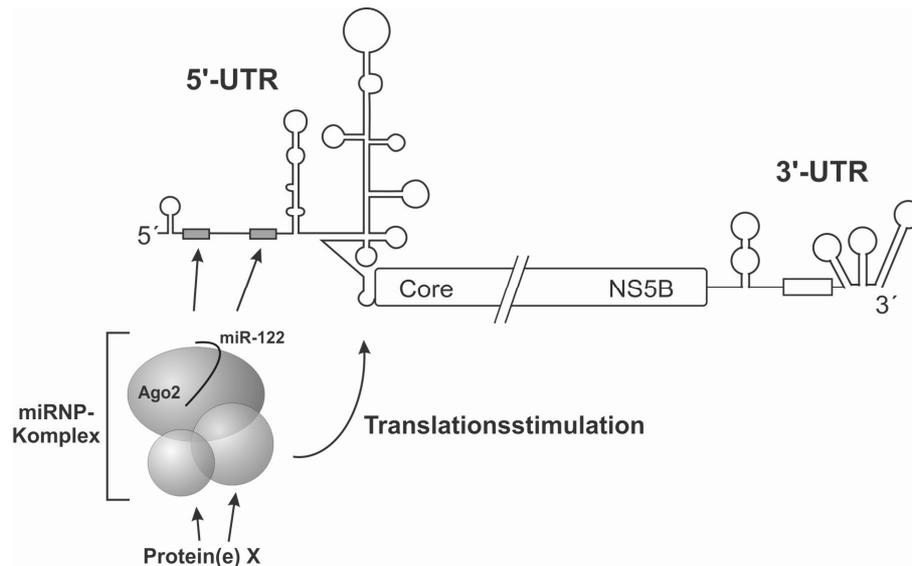


Abb. 37 Auswirkung von miRNP-Komponenten auf die Translationsstimulation der HCV-RNA

Zusammensetzung eines miRNP-Komplexes. Gezeigt ist die Ago2-miR-122-Interaktion mit eventuell zusätzlich bindenden Proteinen, die ebenso an der Stimulation der Translation der HCV-RNA durch die miR-122 beteiligt sind.

Ein bekanntes Protein, das sich in RISC-Komplexen befindet und mit Ago2 interagiert, ist GW182 (Takimoto *et al.*, 2009). Das GW182-Protein ist häufig in so genannten GW-Bodies im Cytoplasma der Zelle verteilt (Lian *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass diese GW-Bodies während des Zellzyklus in ihrer Größe und Anzahl variieren (Lian *et al.*, 2006 und Yang *et al.*, 2004). In der Studie von Lian *et al.* wurde in Immunfluoreszenz-Experimenten sowohl die Verteilung von Ago2 als auch von GW182 in der Zelle analysiert. Das Ergebnis war, dass die GW-Bodies und somit GW182 verstärkt in der späten S- und G₂-Phase vorliegen, und dass die Ago2-Verteilung mit den GW-Bodies korreliert. Bei der Untersuchung von Yang *et al.* wurde die Verteilung der GW-Bodies zum einen mit Fluoreszenz-Experimenten und zum anderen mit Hilfe Gold-markierter Antikörper gegen GW182 mit einem Elektronenmikroskop analysiert. Die größte Anzahl an GW-Bodies wurde auch in dieser Studie in der späten S- und G₂-Phase aufgezeigt. Möglicherweise ist dies ein Hinweis darauf, dass GW182 zellzyklus-abhängig exprimiert wird. Um diese Frage zu

klären, wurden zum Schluss dieser hier vorliegenden Arbeit Westernblots durchgeführt, die GW182 in den verschiedenen Zellzyklusphasen nachweisen. Das Resultat weicht allerdings von den Immunfluoreszenz-Ergebnissen von Lian und Yang ab. In Huh7-Zellen sind bei der Mengenverteilung von GW182 in den einzelnen Phasen des Zellzyklus keine eindeutigen Unterschiede zu erkennen (siehe Abb. 36). Bei diesem Nachweis wurde die Gesamtmenge an GW182 gezeigt, was in Immunfluoreszenz-Versuchen nicht gegeben ist. Dort wird meist nur eine Proteinverteilung innerhalb einer Zelle dargestellt, die zwar in ihrer Intensität variieren kann, aber nicht die Gesamtmenge eines Proteins zeigt. Die Proteinmenge von GW182 korreliert also weder mit der Expression von Ago2 noch mit der der miR-122, was darauf hinweist, dass GW182 an der Translationsstimulation der HCV-RNA möglicherweise nicht beteiligt ist. Außerdem ist von GW182 bekannt, dass es eine wichtige Komponente für die Repression der Translation durch die microRNA ist (Buchan u. Parker, 2007), was im Falle von HCV eben nicht zutrifft. Auch Wilson *et al.* (2011) gehen davon aus, dass es sich bei der HCV-Translationsstimulation um einen miRNP-Komplex handelt, bei dem eventuell andere Proteine beteiligt sind als jene, die im RISC-Komplex vorliegen.

Die Datenlage dieser Arbeit lässt erkennen, dass das Ausmaß der Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 in der G₀/G₁-Phase in nicht proliferierenden Hepatozyten mit der Expression der miR-122 und der miRNP-Komponente Ago2 korreliert. Damit zeigen die Ergebnisse, dass HCV die Regulation seiner Translation im Frühstadium der Infektion optimal auf die in nicht proliferierenden Hepatozyten vorherrschenden Bedingungen abgestimmt hat.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Materialien für Zellkultur und mikrobiologische Arbeiten

4.1.1.1 Bakterienstämme und Zelllinien

***E. coli* XL1-Blue** (von Stratagene)

Charakterisierung: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]

Naive Huh7-Zellen (von AG Bartenschlager, Heidelberg)

Charakterisierung: permanente Zelllinie humaner Hepatoma-Zellen

HeLa-Zellen (von European Collection of Cell Cultures)

Charakterisierung: permanente Zelllinie eines humanen Zervixkarzinoms

4.1.1.2 Zellextrakte

Die aufgelisteten Zellextrakte werden hauptsächlich bei den in dieser Arbeit durchgeführten UV-Crosslinks eingesetzt. Alle Huh7-Lysate werden wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben hergestellt und für Crosslinks, Westernblots und bei Luziferase Messungen eingesetzt.

Name	Firma
Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL)	Promega, Mannheim
Cytoplasmatischer HeLa-Zellextrakt	Cilbiotech, Belgien
Cytoplasmatischer Huh7-Zellextrakt	während dieser Arbeit selbst hergestellt

4.1.1.3 Nährmedien für die Mikrobiologie

Agar-Platten werden vom Institut für medizinische Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bezogen.

Name	Bestandteile	Endkonzentration	Firma
Agar-Platten	Bacto Agar LB Medium	1,5 % (w/v)	JLU Gießen
LB Medium (pH 7,5)	Hefeextrakt Trypsin-verdautes Pepton Natriumchlorid	0,5 % (w/v) 1 % (w/v) 1 % (w/v)	Roth, Karlsruhe

4.1.2 Chemikalien für die Zellkultur und mikrobiologische Arbeiten

Name	Endkonzentration	Firma
Ampicillin	150 µg/ml	Roth, Karlsruhe
Glycerol		Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	5 µg/ml	Sigma, Taufkirchen
100x Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)	1x	Invitrogen, Karlsruhe
10x Trypsin-EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA)	1x	Invitrogen, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FBS)	10 %	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)		Invitrogen, Karlsruhe
DMEM (ohne Phenolrot)		Invitrogen, Karlsruhe
DMSO		Merck, Darmstadt

4.1.3 Materialien für molekularbiologische Arbeiten

4.1.3.1 Nukleinsäuren

4.1.3.1.1 Plasmide

Name	Beschreibung	Hergestellt von
pHCV 3'-UTR only	Sp6, HCV 3'-UTR	Y. Song
pHCV-CLX-CMV	T7, HCV 5'-UTR, Core, Ubi, <i>Firefly</i> -Luziferase, HCV 3'-UTR	Y. Song
pHCV-dUC	pHCVsin mit Deletion des Poly-U/C Traktes (UC)	Y. Song
pHCV-dVUC	pHCVsin mit Deletion der VR und des UC Traktes	Y. Song
pHCV-dVR	pHCVsin mit Deletion der Variablen Region (VR)	Y. Song

Name	Beschreibung	Hergestellt von
pHCV sin	T7, HCV 5'-UTR, 96nts ORF, HCV 3'-UTR	Y. Song
phRL null	T7, <i>Renilla</i> -Luziferase, SV40	Promega, Mannheim

4.1.3.1.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden hergestellt von der Firma Biomers (Ulm).

DNA Oligonukleotide

Name	Länge	Sequenz (5'-3')
3'-UTR-only for	24 bp	CGTCAGAAGCTAGCGATTTAGGTG
HCMV 4986 for	27 bp	CCAATAGGCCGAAATCGGCAAATCCC
WT for	25 bp	TTAATACGACTCACTATAGCCAGCC
3XA rev	23 bp	GATGGAGCCACCATTAAAGAAGG
5'-UTR rev	24 bp	GGTTGGTGTACGTTTGGTTTTTC
dUCX rev	22 bp	CAGGAAATGGCTTAAGAGGCCG
HCV 3X rev	22 bp	ACATGATCTGCAGAGAGGCCAG

DIG-markierte DNA Oligonukleotide

Diese Oligonukleotide sind am 5'- sowie am 3'-Ende mit Digoxigenin markiert und werden bei Northernblot Analysen verwendet.

Name	Länge	Sequenz (5'-3')
hra-U6 probe	30 bp	GCAGGGGCCATGCTAATCTTCTCTGTATCG
mi-122 probe	23 bp	ACAAACACCATTGTCACTCCA

RNA Oligonukleotide

Name	Länge	Sequenz (5'-3')
miR-122 mat	22 bp	(PHOS)UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
miR-122*	22 bp	(PHOS)AACGCCAUUAUCACACUAAAUA

* Gegenstrang zur Duplexherstellung

4.1.3.1.3 Nukleotide

Bei den angewandten molekularbiologischen Methoden werden reguläre Nukleotide sowie radioaktiv markiertes Uridin-Triphosphat benutzt.

Beschreibung	Firma
Capping Nukleotid (m7GpppG)	Promega, Mannheim
Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Roche, Mannheim
Ribonukleosid-Triphosphate (rNTPs)	Roche, Mannheim
[α - ³² P]-UTP (800 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	Perkin Elmer, Rodgau
Thymidin	Sigma, München

4.1.3.2 Enzyme

4.1.3.2.1 Enzyme zur Modifikation von DNA, RNA und Proteinen

Die unten aufgelisteten Enzyme werden für alle molekularbiologischen Methoden und nach Herstellerprotokoll verwendet.

Enzym	Konzentration	Firma
DNase I (RNase frei)	10 U/ μ l	NEB, Frankfurt
GoTaq Flexi DNA-Polymerase	5 U/ μ l	Promega, Mannheim
Poly(A) Polymerase	600 U/ μ l	USB Corporation, USA
Proteinase K	10 μ g/ μ l	Merck, Darmstadt
RNase A	10 μ g/ μ l	NEB, Frankfurt
Sp6 RNA-Polymerase	20 U/ μ l	Fermentas, St. Leon-Rot
T7 RNA-Polymerase	20 U/ μ l	Fermentas, St. Leon-Rot

4.1.3.3 Größenstandards

4.1.3.3.1 DNA Größenstandard

Name	Firma/Beschreibung
HyperLadder I	Bioline, Luckenwalde 10000 bp, 8000 bp, 6000 bp, 5000 bp, 4000 bp, 3000 bp, 2500 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1000 bp, 800 bp, 600 bp, 400 bp, 200 bp

4.1.3.3.2 Protein Größenstandard

Name	Firma/Beschreibung
PAGE Ruler (prestained)	Fermentas, St. Leon-Rot 170 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 26 kDa, 17 kDa, 10 kDa
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas, St. Leon-Rot 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18 kDa, 14 kDa
[¹⁴ C]-Proteinmarker	GE Healthcare, München 220 kDa, 97 kDa, 69 kDa, 43 kDa, 30 kDa, 14 kDa

4.1.3.4 Antikörper

Name	Beschreibung	Firma
Anti-GAPDH	mouse, IgG, monoklonal	HyTest, Finnland
Anti-p27Kip1	rabbit, IgG, polyklonal	BioLegend, Fell
Anti-Ago2	rat, IgG, monoklonal	G. Meister, Regensburg
Anti-GW182	mouse, IgG, monoklonal	Abcam, UK
IgG-POD1	anti mouse, polyclonal, Peroxidase gekoppelt, (Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Kit)	Roche, Mannheim
IgG-POD2	anti rabbit, polyclonal, Peroxidase gekoppelt, (Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Kit)	Roche, Mannheim

4.1.3.5 Kits

Name	Inhalt	Firma
NucleoBond AX 100	Resuspensionspuffer S1 Lysepuffer S2 Neutralisierungspuffer S3 Äquilibrierungspuffer N2 Waschpuffer N3 Elutionspuffer N5	Machery-Nagel,
Wizard Plus Minipreps DNA Purification System	Cell Resuspension Solution Cell Lysis Solution Neutralization Solution Wash Solution	Promega, Mannheim
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Capture buffer Wash buffer	GE Healthcare, München
RNeasy Purification Kit	RLT-Puffer	Qiagen, Hilden

Name	Inhalt	Firma
GoTaq Flexi DNA Polymerase	Waschpuffer RPE	Promega, Mannheim
	GoTaq Flexi-Puffer	
Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Kit	GoTaq Flexi DNA Polymerase	Roche, Mannheim
	MgCl ₂ (25 mM)	
	Anti-Rabbit IgG-POD	
	Anti-Mouse IgG-POD	
	Lumi-Light Enhancer Solution	
DIG Nucleic Acid Detection Kit	Lumi-Light Peroxide Solution	Roche, Mannheim
	Anti-Digoxigenin-AP (750 U/ml)	
	NBT/BCIP (50x)	
	Blocking Reagent	

4.1.4 Andere Chemikalien und Reagenzien

Methode	Beschreibung	Firma
DNA/RNA-Arbeiten	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
	EDTA	Merck, Darmstadt
	Ethidiumbromid (EtBr)	Merck, Darmstadt
	Formaldehyd (37 %)	Roth, Karlsruhe
	Formamid	Sigma, Taufkirchen
	Harnstoff	Roth, Karlsruhe
	Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
	N-Lauroylsarcosin	Sigma, Taufkirchen
	Phenol	Sigma, Taufkirchen
	Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
	TEMED	Merck, Darmstadt
	Trizol, peqGold TriFast	Peqlab, Erlangen
	Tween20	Sigma, Taufkirchen
	Xylencyanolblau	Roth, Karlsruhe
	Proteinbiochemisch	Aceton
Acrylamid-Lösung		Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)		Serva, Heidelberg
β-Mercaptoethanol		Sigma, Taufkirchen

Methode	Beschreibung	Firma
	Coelenterazin	Roche, Mannheim
	Coomassie-Brilliant-Blau R250	Serva, Heidelberg
	D-Luciferin	Promega, Mannheim
	Lipofectamine2000	Invitrogen, Karlsruhe
	Glycylglycin	Roth, Karlsruhe
	Magnesiumcarbonat-hydrat	Sigma, Taufkirchen
	Passiver Lyse-Puffer (PLB)	Promega, Mannheim
	Rotiload	Roth, Karlsruhe
	SkimMilk	Difco BD, USA
	Source 15Q	GE Healthcare, München
	Source 15S	GE Healthcare, München
	TEMED	Merck, Darmstadt
	Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
	Tricine	ICN Biomed., Frankfurt
	Tween20	Sigma, Taufkirchen
Wechselwirkungen	tRNA	Sigma, Taufkirchen
Zellkultur	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
	WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche, Mannheim
	Nocodazol	BioTrend, Schweiz

4.1.5 Geräte

Name	Firma
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Blotapparatur, Fastblot B43/44	Biometra, Göttingen
CO ₂ -Inkubator Serie CB	Binder GmbH, Tuttlingen
Elektroporator, Easyject Prima	Equibio, England
Elisa-Reader, ELx800	BioTek, Bad Friedrichshall
FACScalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Filmkassetten, Cronex Lightning Plus	Du Pont, USA
Geldokumentationssystem, GelDoc XR	Biorad, München
Gelkammern	von Keutz, Reiskirchen
Geltrockner, Gel Dryer 583	Biorad, München
Heizblock, MBT 250	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Hera Safe Sterilbank	Heraeus, Hanau
Hybridisierungssofen, HB-1000 Hybridiser	UVP, USA
Horizontalschüttler 3020	GFL, Burgwedel
Isopropanol-Tank	Quallilab/Olivet, Frankreich
Kippschüttler, Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Kontaminationsmonitor, LB 124	Berthold, Bad Wildbad

Name	Firma
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Luminometer, Lumat LB9501	Berthold, Bad Wildbad
Minigelsystem	AGS, Heidelberg
Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau
Netzgerät EPS 500/400	Pharmacia LBK, Freiburg
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Platteninkubator	Thermo Scientific, Schwerte
Taumel-Rollenmischer RM 5	CAT, Staufen
Thermocycler, TProfessional	Biometra, Göttingen
UV-Handlampe (8 W, 254 nm)	Benda, Wiesloch
Vortex Genie 2	Scientific Industries B., New York

4.1.6 Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
Cryo-Röhrchen	TPP, Schweiz
Elektroporationsküvetten	Biorad, München
Luminometerröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatte (24-, 96-well)	Greiner Bio-one, Essen
Nylonmembran, Roti Nylon Plus	Roth, Karlsruhe
Plastikpipetten, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF Membran, Immobilon-P	Millipore Corp., Schwalbach
Röntgenfilme, Kodak X-omat XAR	Eastman Kodak, USA
Röntgenfilmentwickler und -fixierer	Agfa, Köln
Whatman Papier	Machery-Nagel, Düren
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen (100 mm x 20 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen (150 mm x 20 mm)	Sarstedt, Nümbrecht

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien, Reagenzien und Materialien stammen von den Firmen Invitrogen, Merck, Qiagen, Roche, Roth, Sarstedt oder Sigma-Aldrich.

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Gelelektrophorese

4.2.1.1.1 Agarosegel-Elektrophorese

Diese Art von Elektrophorese eignet sich für einen Nachweis von DNA- und RNA-Fragmenten in einem Größenbereich von 0,5 bis 25 kb. Allerdings sollte darauf geachtet werden, dass für die Auftrennung von RNAs autoklavierte Agarose und Puffer verwendet werden, damit ein RNase-freies Arbeiten ermöglicht wird. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wird das Gel mit 1 bis 1,5 %-iger Agarose in den dafür vorgesehenen Gelapparaturen gegossen (Mini-Gelsystem, von Keutz). Als Laufpuffer, in dem auch die Agarose gelöst wird, wird TAE Puffer (pH 8,5, 40 mM Tris-HCl, 40 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA) verwendet. Die Stromstärke beträgt 220 mA bei einer Dauer von ca. 20 min.

Um die Dichte der Nukleinsäurelösung zu erhöhen und damit ein Absinken in die Geltasche zu gewährleisten, werden die Proben, bevor sie auf ein Gel aufgetragen werden, mit einem Ladepuffer (75 % Glycerol, 50 mM EDTA, 2 mg/ml Bromphenolblau, 4 mg/ml Xylencyanol) im Verhältnis 1:1 gemischt. Da der Ladepuffer zusätzlich die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol enthält, kann das Laufverhalten der Proben beobachtet werden.

Im Anschluss an die Auftrennung wird das Gel mit Ethidiumbromid (2 µg/ml in TAE) gefärbt und die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar gemacht.

4.2.1.1.2 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Qualitätskontrolle radioaktiv markierter RNA und zur Abschätzung des erfolgten Einbaus radioaktiv markierter Nukleotide werden denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Die Nukleinsäurelösung wird 1:3 mit denaturierendem Probenpuffer (80 % Formamid, 50 mM EDTA, 1 mg/ml Bromphenolblau, 2 mg/ml Xylencyanol) gemischt, erhitzt und auf 6 oder 15 % Polyacrylamidgele mit 7 M Harnstoff aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt hier in TBE-Puffer (pH 8,3; 90 mM Tris-Borat; 2,5 mM EDTA) bei 25 mA und ca.

10 - 15 min pro Gel. Anschließend wird das Gel mit Frischhaltefolie bedeckt und die radioaktive RNA mittels Autoradiographie nachgewiesen.

4.2.1.2 Aufreinigung, Fällung und Konzentrierung von DNA

4.2.1.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* XL-1 blue wird entweder in großem Maßstab aus 100 ml Übernachtskultur unter Verwendung des NucleoBond AX 100 Kits (Machery-Nagel) oder in kleinerem Maßstab aus 1,5 ml Übernachtskultur unter Verwendung des Wizard Plus SV Miniprep Kits (Promega) nach den Herstellerprotokollen durchgeführt. Bei beiden Kits werden zuerst die Bakterien unter alkalischen Bedingungen in Anwesenheit von SDS lysiert. Dabei wird sowohl die chromosomale als auch die Plasmid-DNA denaturiert. Durch die folgende Neutralisierung mit Kaliumacetat präzipitieren die chromosomale DNA und andere Zellbestandteile, wohingegen die kleinere Plasmid-DNA korrekt renaturieren kann und somit in Lösung bleibt. Nach einer Zentrifugation wird der Überstand auf eine Säule geladen. Bei hohen Salzkonzentrationen und niedrigem pH bindet nun die Plasmid-DNA an die Matrix der Säule und wird anschließend mit TE-Puffer oder ddH₂O eluiert und durch Zugabe von Isopropanol gefällt.

4.2.1.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*) wird genutzt, um DNA-Fragmente spezifischer Sequenz und Größe *in vitro* zu vervielfältigen. Hier werden kurze DNA-Oligonukleotide (Primer) benutzt, die komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments sind. Zum Erstellen solcher Primer wurde das Programm OligoCalc (Northwestern University Medical School, Illinois) verwendet, womit Schmelztemperatur und potentielle Sekundärstrukturen der Primer analysiert werden können. Ein Zyklus aus Denaturierung der DNA (94 °C, 2 min), Anlagerung der Primer (Temperatur abhängig vom Primer, 1 min) und DNA-Synthese (72 °C, 1 - 2 min) wurde 28 Mal wiederholt. Diesem Prozess geht eine initiale Denaturierung (94 °C, 2 min) voraus, und er wird mit einer finalen DNA-Synthese (72 °C, 3 min) abgeschlossen. Zur Amplifikation der DNA wird die hitzestabile Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* mit einem Temperaturoptimum von 72 °C verwendet.

Standard Reaktionsansatz:

Endkonzentration	Bestandteile
1x	GoTaq Flexi Puffer
250 µM	dNTPs
2,5 mM	MgCl ₂
0,5 µM	Primer A
0,5 µM	Primer B
10 ng/µl	DNA-Matrize
1 Unit/50 µl	GoTaq Flexi-Polymerase

4.2.1.2.3 Aufreinigung von DNA über präparative Agarosegele

Diese Technik dient zur Isolierung und Aufreinigung von bestimmten DNA-Fragmenten nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau aus einem Agarosegel. Die Elektrophorese erfolgt nach der analytischen Agarosegel-Elektrophorese, wobei das präparative Gel 0,5 - 1 cm dick gegossen wird und die Stromstärke 180 mA beträgt. Die Auftrennung erfolgt nach ca. einer Stunde. Die anschließende Ethidiumbromidfärbung und die Bestrahlung mit UV-Licht können ein störender Faktor bei nachfolgenden Versuchen sein, weil sie möglicherweise Mutationen in der DNA-Sequenz hervorrufen. Daher sollte das Gel nur sehr kurz mit UV-Licht bestrahlt und die benötigten Banden herausgeschnitten werden. Das gewünschte DNA-Fragment wird nun über das GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) nach Herstelleranleitung extrahiert.

4.2.1.2.4 Proteinase K-Verdau

Die Proteinase K gehört zu den Serinproteasen, welche von dem Pilz *Tritirachium album* gebildet wird. Sie besitzt sowohl eine endo- als auch eine exoproteolytische Aktivität.

Das Enzym wird durch Calcium (1 - 5 mM) und einen pH-Wert von 7,5 - 8,0 aktiviert und verdaut Proteine bevorzugt hinter hydrophoben Aminosäuren. Die Proteinase K wird zur Reinigung der DNA-Matrizen (PCR-Produkt oder geschnittene Plasmid-DNA) für die nachfolgende *in vitro*-Transkription verwendet. Die DNA-Lösung wird mit CaCl₂ (Endkonzentration 2 mM), Tris-Cl pH 7,5 (Endkonzentration 50 mM) und Proteinase K (Endkonzentration 0,2 µg/µl) gemischt und für 1 bis 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend

werden die Proteinase K und unverdaute Proteine mittels Phenol-Chloroform Extraktion aus dem Probenansatz entfernt.

4.2.1.2.5 Phenol-Chloroform Extraktion

Bei der Reinigung von Nukleinsäuren durch organische Lösungsmittel wie Phenol und Chloroform erfolgt die Trennung der Proteine von den Nukleinsäuren durch eine Phasenbildung der Lösungen.

Die Proben werden mit 1 Vol. Phenol gemischt und zentrifugiert (2 min, 13000 x g). Das Phenol denaturiert die Proteine und sammelt sie in der unteren organischen Phase und in der Interphase der Flüssigkeiten. Die Nukleinsäuren hingegen befinden sich in der oberen wässrigen Phase. Die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. Phenol:Chloroform (1:1) sorgfältig gemischt. Durch das Chloroform werden nun zusätzlich Fette aus der wässrigen Phase entfernt und die Auftrennung verbessert. Nach einer erneuten Zentrifugation (2 min, 13000 x g) wird die obere Phase noch einmal mit 1 Vol. Chloroform versetzt und die danach entstandene obere Phase durch eine Ethanol-Fällung konzentriert und mögliche Phenolrückstände entfernt.

4.2.1.2.6 Alkoholfällung

Die Alkoholfällung dient zur Konzentrierung und Reinigung von Nukleinsäuren. Es werden 1/10 Vol. Natriumacetat (3 M) sowie 3 Vol. Ethanol (99 %) zu der Nukleinsäurelösung gegeben und für 30 min bis 2 h bei -20°C inkubiert. Die präzipitierte Nukleinsäure wird durch Zentrifugation pelletiert (30 min, 13.000 x g, 4°C). Um eventuell vorhandene Salzreste zu entfernen, wird das Pellet zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen, anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und in einem geeigneten Volumen RNase-freiem ddH₂O gelöst.

4.2.1.3 RNA-Synthese

4.2.1.3.1 Standard *in vitro*-Transkription

Bei einer *in vitro*-Transkription erfolgt die Synthese von RNA durch SP6- oder T7-RNA-Polymerasen. Um sogenannte „run-off“ Transkripte anzufertigen, werden die DNA-Matrizen mittels Restriktionsverdau von Plasmid-DNA hergestellt. Für RNAs definierter Länge werden jedoch PCR Produkte verwendet. Alle Matrizen sind gereinigt und in RNase-freiem ddH₂O gelöst. Die einzelnen Komponenten des Transkriptionsansatzes werden bei Raumtemperatur pipettiert, damit das im Transkriptionspuffer enthaltene Spermidin nicht zur Präzipitation der Template-DNA führt.

Standard-Transkriptionsansatz:

Endkonzentration	Bestandteile
1x	Transkriptionspuffer
10 mM	DTT
0,5 mM	rNTPs
0,01 - 0,02 µg/µl	DNA-Matrize
1 Unit/µl	RNA-Polymerase

Der verwendete Transkriptionspuffer enthält üblicherweise 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂ und 10 mM Spermidin. Die Inkubation erfolgt für eine Stunde bei 37°C (T7-RNA-Polymerase) oder 42°C (SP6-RNA-Polymerase) im Wasserbad. Anschließend wird die RNA auf einem Agarosegel überprüft.

4.2.1.3.2 *In vitro*-Transkription radioaktiv markierter RNA

Für die Detektion von RNA-Protein-Komplexen durch den UV-Crosslink wird die RNA durch den Einbau von radioaktiv markierten Nukleotiden während einer Transkriptionsreaktion markiert. Für die Synthese solch gelabelter RNA wurde in dieser Arbeit [α -³²P]-UTP mit einer Aktivität von 10 mCi/ml eingesetzt.

Transkriptionsansatz:

Endkonzentration	Bestandteile
1x	Transkriptionspuffer
10 mM	DTT
250 µM	rNTPs (A, C, G)
10 µM	rUTP
2,5 µM	[α - ³² P]-UTP
0,02 – 0,04 µg/µl	DNA-Matrize
1 Unit/µl	RNA-Polymerase

Die Transkription wird je nach RNA-Polymerase bei ihrem Temperatur-Optimum im Wasserbad für eine Stunde inkubiert. Danach wird ein Aliquot zur Kontrolle mit Hilfe eines denaturierenden Polyacrylamidgels aufgetrennt und durch Autoradiographie überprüft.

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

Zur Herstellung von Reporter-RNAs, welche eukaryotischen mRNAs entsprechen sollen, wird die so genannte „Capping-Transkription“ mit darauf folgender Polyadenylierung durchgeführt. Hierbei wird am 5'-Ende der RNA eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe während der RNA-Synthese eingebaut. Dabei wird in der *in vitro*-Transkription (s. oben) die Konzentration des rGTPs auf 50 mM herabgesetzt und ein „Capping Nukleotid“ (m⁷GpppG, Promega) mit einer Endkonzentration von 500 µM zugefügt. Nach dieser Transkription wird die RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) gereinigt.

Die Polyadenylierung erfolgt durch Inkubation des unten gezeigten Reaktionsansatzes für 10 min bei 37 °C im Wasserbad und anschließender Inkubation für 2 min auf Eis.

Endkonzentration	Bestandteil
1x	Poly(A)-Puffer
1 mM	rATPs
variabel	Gereinigte RNA
6 U/µl	Poly(A)-Polymerase

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

4.2.1.4 Präparation und Aufreinigung von RNA

4.2.1.4.1 DNase I-Verdau

Eine DNase-Verdau erfolgt meist nach einer *in vitro*-Transkription, um größere Mengen an DNA-Matrize-Resten zu entfernen und somit unerwünschte Einwirkungen dieses Templates auf Folgereaktionen auszuschließen. Dazu wird dem Reaktionsansatz DNase I in einer Endkonzentration von 0,1 U/ μ l und MgCl₂ (Endkonzentration 1 mM) zugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Um danach das Enzym und die verdauten DNA-Reste zu entfernen, wird die RNA über das RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt.

4.2.1.4.2 Aufreinigung von RNA

Zur Entfernung von Enzymen, DNA-Resten oder freien Nukleotiden wird die RNA über das RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt. Diese Reinigung erfolgt nach der im Kit enthaltenen Beschreibung. Um nicht eingebaute radioaktive Nukleotide zu entfernen und die radioaktiv markierte RNA zu reinigen, wird das mini Quick Spin Columns Kit von Roche nach dessen Anleitung verwendet. In beiden Kits sind alle dafür benötigten Materialien vorhanden.

4.2.1.4.3 RNA-Extraktion aus Zellen

Für einen Northernblot wird die gesamte RNA aus Huh7-Zellen während der unterschiedlichen Zellzyklusphasen und den unsynchronisierten Zellen als Kontrolle extrahiert. Hierfür werden große Mengen Zellen (pro Zyklusphase eine große Schale mit ca. 80 % Konfluenz) nach der jeweiligen Behandlung pelletiert mit 1x PBS gewaschen und gezählt. Zu den Zellen wird 500 μ l Trizol (peqGold TriFast) gegeben, die Zellen mit Hilfe einer Pipette lysiert und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 100 μ l Chloroform wird der Ansatz mehrmals mit einer Pipette gemischt und lässt ihn erneut für 5 min inkubiert. Die Phasen werden nun bei 12000 x g für 10 min bei 4°C getrennt. Das Ergebnis sind drei Phasen: Die untere Phase enthält alle zellulären Proteine (Phenol-Phase), die mittlere Schicht enthält die DNA und die obere somit die gesamte zelluläre RNA. Daher wird vorsichtig die obere Schicht abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Jetzt wird die darin enthaltene RNA mit 250 μ l Isopropanol für 15 min bei -20°C gefällt und anschließend bei 12000 x g für 10 min bei 4°C pelletiert. Das entstandene Pellet wird mit Ethanol

gewaschen und bei RT getrocknet und resuspendiert. Die RNA der unsynchronisierten Zellen wird in 100 µl ddH₂O aufgenommen, während die RNA der anderen Zellzyklusphasen ihrer Zellzahl entsprechend resuspendiert und in Aliquots bei -20°C gelagert wird.

4.2.1.4.4 Herstellung von microRNA-Duplexen

microRNAs werden in dieser Arbeit für Transfektionen in eukaryotischen Zellen verwendet und *in vitro* durch Biomers (Ulm) hergestellt. Um diese miRNAs jedoch transfizieren und Effekte in Zellen untersuchen zu können, müssen sie als Duplex-RNA vorliegen. Dazu mischt man gleiche Mengen an reifer einzelsträngiger microRNA (miR mat) mit ihren komplementären Gegensträngen (miR mat*) und inkubiert diese in einem Wasserbad bei ca. 80°C bis das Wasser auf Raumtemperatur abgekühlt ist. Die entstandenen partiell doppelsträngigen miRNA-Duplexe können anschließend bei -20°C für 2 - 3 Wochen gelagert werden.

4.2.1.5 Northernblot

Als weiterführende Kontrolle für die Transfektionen in den verschiedenen Zellzyklusphasen und damit zur Analyse endogener miR-122 in Huh7-Zellen werden zuerst cytoplasmatische RNAs aus Huh7-Zellen wie oben beschrieben extrahiert und aufgereinigt. Für den Blot wird dann je Zellzyklusphase das gleiche Volumen der RNA-Extraktion über ein denaturierendes 15 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. Währenddessen wird die Nylonmembran für 10 min in 1x TBE gewaschen. Der RNA-Transfer erfolgt dann über Elektroblothing (Aufbau siehe unten) in einer Semi-dry-blotting Apparatur (Biometra) bei 150 mA für 50 min.

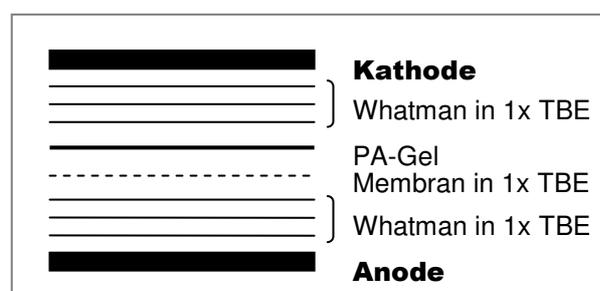


Abb. 38 Aufbau einer Semi-dry Blot-Apparatur für den RNA-Transfer auf eine Nylonmembran.

PA-Gel: Polyacrylamidgel. TBE: Tris-Borat-EDTA Puffer

Nach dem Transfer wird die RNA auf der Membran fixiert, indem sie in Frischhaltefolie eingeschlagen und für ca. 5 min mit UV-Licht bestrahlt wird. Die Membran wird anschließend mit 20 ml Hybridisierungspuffer (50 % Formamid, 0,1 % N-Lauroylsarcosin, 0,2 % SDS, 5x SSC, 2 % Block-Reagenz) ohne Sonde für 60 min bei 50°C vorinkubiert. Währenddessen wird 50 pmol Digoxigenin-markierte DNA-Sonde (mi-122 oder hra-U6) für 5 min bei 80°C erhitzt, 2 min auf Eis gekühlt und mit 20 ml frischem Hybridisierungspuffer gemischt, bevor die Sonde auf die Membran gegeben und über Nacht bei 50°C inkubiert wird. Am darauf folgenden Tag wird die Membran zweimal mit 2x SSC (20x SSC (*saline-sodium citrate*)-Puffer: 3 M NaCl, 0,3 M Tri-Natrium-Zitrat (pH 7,0)) mit 0,1 % SDS und zweimal mit 0,5x SSC mit 0,1 % SDS für jeweils 20 min bei 50°C gewaschen.

Die Membran wird danach in Blocklösung (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 1,5 % Block-Reagenz) für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, da unspezifische Bindungen des späteren Digoxigenin-Antikörpers mit der Nylonmembran verhindert werden soll. Später wird in die Blocklösung 1:10000 verdünnter Digoxigenin-Antikörper gegeben und für mindestens 1 Stunde bei RT weiter inkubiert. Nicht gebundene Antikörper werden dreimal mit Waschpuffer (0,3 % Tween20, 0,1 M Maleinsäure, 0,15 mM NaCl) für je 10 min bei RT von der Membran gewaschen. Zur Detektion wird die Membran zunächst für ca. 2 min in der Detektionslösung (0,1 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl (pH 9,5)) äquilibriert und nachfolgend mit 1 ml 0,5 % NBT/BCIP in Detektionslösung bedeckt. Nach einer Inkubation von 5 min in Dunkelheit wird das entstehende Signal mit Hilfe von Röntgenfilmen nachgewiesen und somit RNA einer spezifischen Sequenz indirekt identifiziert.

4.2.1.6 UV-Crosslink von RNA an Protein

Bei einem UV-Crosslink werden Pyrimidin-Nukleotide durch eine Bestrahlung mit UV-Licht energetisch so angeregt, dass sie dann mit reaktiven Aminosäuren von Proteinen eines Proteingemisches kovalente Bindungen eingehen können. Wird nun eine radioaktiv markierte RNA in einem UV-Crosslink kovalent an ein Protein gebunden, kann durch eine RNase A-Behandlung die RNA soweit abgebaut werden, dass nur noch eine sehr kurze Rest der Nukleinsäure an das Protein gebunden und dieses somit indirekt radioaktiv markiert ist. Durch eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese können nun die Proteine aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

Die Bindungsreaktion von radioaktiv markierter RNA und Proteinen wurde in Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL, engl. Rabbit reticulocyte lysate), HeLa-

oder Huh7-Zellextrakt in Anwesenheit von 130 mM K⁺ durchgeführt, wobei die K⁺-Konzentration der Extrakte berücksichtigt werden müssen. Dazu wird zunächst der Zellextrakt mit ca. 8 pmol ³²P-markierter HCV-RNA mit oder ohne entsprechende Mengen konkurrierender, unmarkierter HCV-RNA gemischt. Um unspezifische Bindungen abzufangen, wird dem Ansatz tRNA in einer Endkonzentration von 0,5 µg/µl zugesetzt. Die Ansätze werden anschließend für 15 min bei 30 °C inkubiert. Danach werden die Reaktionsansätze auf Eis für 45 min mit einer 8 W UV-Handlampe (Wellenlänge: 254 nm) bestrahlt. Die RNA wird nun für ca. 90 min bei 37 °C mit 0,2 µg/µl RNase A verdaut. Die kovalent an Protein gebundene RNA wird dabei durch den RNase-Verdau auf ein kurzes RNA-Oligonukleotid gekürzt, welches am Protein verbleibt und dies dadurch in der Regel radioaktiv markiert. Das Pyrimidin-Nukleotid, das die kovalente Bindung erzeugt, muss dabei in der Nähe eines radioaktiv markierten Nukleotids liegen. Anschließend werden die Proteine auf einem SDS-12 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und zwei Mal für 10 min in Entfärber fixiert. Das Gel wird dann im Geltrockner für 2 Stunden getrocknet und die radioaktiv markierten Proteine danach mittels Autoradiographie über mehrere Stunden oder Tage nachgewiesen.

4.2.2 Autoradiographie

Die Autoradiographie wird eingesetzt, um radioaktiv markierte RNA oder radioaktiv markierte RNA-Protein-Komplexe sichtbar zu machen. Dieses ist der Detektion von Chemilumineszenz, entstehend durch die Umsetzung von Luminol durch HRP (engl. horse radish peroxidase, Meerrettichperoxidase) bei Westernblots oder die Umsetzung von BCIP/NBT (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) durch die Alkalischen Phosphatase bei Northernblots, sehr ähnlich. Getrocknete Gele und Membranen werden für einen gewissen Zeitraum bei Raumtemperatur durch direktes Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak X-omat XAR) exponiert, um ein exaktes Signal mit geringem Hintergrund zu erhalten (direkte Autoradiographie). Um das Signal der UV-Crosslinks zu verstärken, erfolgte die Exposition des Films bei -70 °C unter Verwendung eines „intensifying screens“ (indirekte Autoradiographie). Dabei wird die Strahlung, die durch den Film dringt, vom Screen reflektiert und trifft in einem geringfügig anderen Winkel wieder auf den Film, wodurch die Bande kräftiger jedoch auch etwas unscharf wird. Zur Analyse von radioaktiv markierter RNA wurde das nasse Gel mit Frischhaltefolie bedeckt und für 5 - 15 min exponiert.

4.2.3 Proteinbiochemische Methoden

4.2.3.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Laemmli, 1970) dient zur Auftrennung von Proteinen die danach entweder durch Coomassie Färbung des Gels, Autoradiographie oder Westernblot nachgewiesen werden können.

Standard-Zusammensetzung von SDS-12 % Polyacrylamidgelen:

Sammelgel:		Trenngel:	
Endkonzentration		Endkonzentration	
1x	4x Sammelgelpuffer	1x	4x Trenngelpuffer
6 %	Acrylamid (40 %)	12 %	Acrylamid (40 %)
0,1 % (w/v)	APS	0,1 % (w/v)	APS
0,1 % (w/v)	TEMED	0,1 % (w/v)	TEMED

Die Proben werden mit Probenpuffer (Rotiload, Roth) für 5 min aufgeköcht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel und dauert ca. eine Stunde, bis die blaue Farbe des Markers ausläuft. Je nach dem, welche Proteine man auftrennen möchte, werden auch geringerprozentige Gele gegossen und die Dauer der Elektrophorese verlängert.

4.2.3.2 Westernblot

Der Westernblot dient zum Nachweis spezifischer Proteine über eine Antikörperbindung. Dazu werden die Proteine zunächst über ein SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mittels semi-dry Elektro-Transfer in einer Blotapparatur (Biometra) auf eine PVDF Membran übertragen. Das Gel wird für 10 min in Kathodenpuffer geschwenkt. Währenddessen taucht man die Membran für 15 sec in Methanol und wäscht sie danach 2 min mit ddH₂O und 5 min in Anodenpuffer II. Der Aufbau für den Elektro-Transfer ist unten dargestellt.

Der Transfer erfolgt je nach Größe der Membran. Dabei gilt folgende Formel: Breite x Länge x 2,5 = XX mA. Das entspricht hier 8,8 cm x 6,5 cm x 2,5 = 143 mA und einer Laufzeit von 75 min.

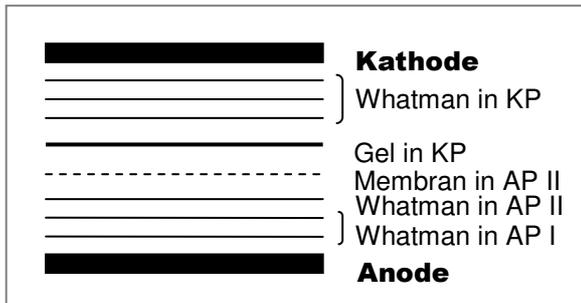


Abb. 39 Aufbau einer Semi-dry Apparatur für den Proteintransfer auf eine PVDF Membran.

Kathodenpuffer (KP):	25 mM Tris (pH 9,4), 40 mM Glycin, 10 % Methanol
Anodenpuffer I (AP I):	0,3 M Tris (pH 10,4), 10 % Methanol
Anodenpuffer II (AP II):	25 mM Tris (pH 10,4), 10 % Methanol

Nach dem Transfer wird die Membran in 5 % Skim Milk in 1x TBST (100 mM Tris (pH 8,0), 500 mM NaCl, 0,1 % Tween20) für 2 h bei Raumtemperatur geblockt und im Anschluss 2x für 10 min mit 1x TBST gewaschen. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Erst-Antikörper über Nacht bei 4°C. Der Antikörper für p27^{Kip1} wird 1:500 in 5 % Skim Milk in 1x TBST, der Antikörper für GAPDH 1:1000 in 5 % Skim Milk in 1x TBST verdünnt. Nach dieser Inkubation wird die Membran 4x für 10 min mit 1x TBST gewaschen. Die Zweit-Antikörper (anti-mousePOD 1:1000, anti-rabbitPOD 1:1000) werden nun für 1 h bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Nachdem die Membran wieder 4x für 10 min mit 1x TBST gewaschen wurde, werden die Proteine mittels HRP und dessen Umsatz von Luminol (Lumi-Light^{PLUS} Kit, Roche) nachgewiesen.

4.2.3.3 Proteinaufreinigung mit Source 15Q und 15S

Eine Trennung und Reinigung von Proteinengemischen kann über verschiedene Chromatographieverfahren erfolgen. In dieser Arbeit wurden die Säulenmaterialien Source 15Q und Source 15S (GE Healthcare, München) getestet, um Proteine des cytoplasmatischen Huh7-Lysats zu trennen und damit das gesuchte Protein (p210) in den UV-Crosslinks besser detektieren zu können. Die hydrophile Matrix des Source 15 besteht aus kleinen (Durchmesser: 15 µm), festen Polystyrol/Divinylbenzol-Kügelchen, welche mit Ammonium-Ionen (Q) oder Methylsulfonat (S) substituiert sind. Diese Gruppen sind Ionenaustauscher (Q: Anionen-, S: Kationenaustauscher), welche es erlauben, in einem weiten pH-Spektrum zu arbeiten.

Der erste Test dient dazu, herauszufinden, welche Matrix geeignet ist. Somit wird zunächst im Batch-Verfahren überprüft, ob radioaktive Nukleotide, welche in einem Crosslink-Ansatz enthalten sind, an der Matrix haften bleiben. Hierfür wird ca. 50 µl Matrix mit 5 µl radioaktiven Nukleotiden 5 min bei RT inkubiert. Danach wird der Überstand nach einer Zentrifugation von 10000 rpm (Biofuge pico, Heraeus) für 30 sec abgenommen und die Matrix in weiteren Schritten mit Puffer steigender Kaliumkonzentrationen (10, 100, 200, 300, 400, 500 mM, 1 M, 3 M) gewaschen. Von den jeweiligen Überständen werden 10 µl auf ein

denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und nach einer Exposition auf einem Röntgenfilm ausgewertet.

Für eine Proteinauftrennung wird die Methode ebenso im Batch-Verfahren gehandhabt. Zuerst wird 500 µl Säulenmatrix äquilibriert, indem sie 5-mal für je 5 min mit 100 mM Phosphatpuffer (pH 6, 7 und 8) inkubiert und bei 10000 rpm für 1 min zentrifugiert wird. Nun werden die Proben in einem Verhältnis von 1:3 mit Phosphatpuffer gemischt und mit der Matrix 20 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt die Elution mit je 100 µl Phosphatpuffer (pH 6, 7 und 8) bei schrittweise erhöhenden Kaliumionenkonzentrationen (0, 10, 100, 200, 300, 400 und 500 mM). Der Erfolg dieser Auftrennung aus einem Proteingemisch wird anhand eines SDS-Gels mit Coomassie-Färbung überprüft.

4.2.4 Zellkulturtechniken

4.2.4.1 Kultivierung adhärenter eukaryotischer Zellen

Die verwendeten Zellen (Huh7 sowie HeLa) werden in kleinen (25 cm²) oder großen (75 cm²) Zellkulturflaschen (Sarstedt) inkubiert. Für Zellzyklusexperimente oder zur Herstellung von Zelllysaten werden jedoch große Schalen (Durchmesser: 15 cm) (Sarstedt, Nümbrecht) benutzt.

Die Kultivierung der Zellen findet in DMEM^{-/-} mit 10 % FBS (Fetal Bovine Serum) und 1 % Antibiotika (Penicillin / Streptomycin (Pen/Strep)) bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank (Binder, Tuttlingen) statt. Die Zellen werden dort inkubiert, bis sie eine adhärente Einzelschicht gebildet haben, die ca. 80 % des Flaschenbodens bedeckt (80 % Konfluenz). Dann werden die Zellen passagiert, ausgesät oder eingefroren.

4.2.4.2 Passagieren und Mediumwechsel bei adhärenenten Zellen

Ein Wechsel des Mediums wird durchgeführt, wenn Zellen aufgetaut werden oder die Bestandteile des Mediums weitestgehend von den Zellen metabolisiert sind. Dies ist dadurch erkennbar, dass die Farbe des Mediums von Pink zu Gelb wechselt, da im Medium der pH-Indikator Phenolrot enthalten ist und dieser bei niedrigem pH die Farbe wechselt. Gelbes, verbrauchtes Medium wird abgesaugt, ohne die Zellschicht zu zerstören. Danach werden die Zellen mit 1x PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gespült. Nach Entfernen des 1x PBS gibt man Trypsin mit 0,5 % EDTA hinzu und

inkubiert die Zellen bei 37°C, bis sie sich vom Boden der Kulturflasche ablösen. Anschließend werden sie in neuem Medium aufgenommen und in entsprechender Verdünnung in eine neue Flasche überführt.

4.2.4.3 Einfrieren von Zellen

Um die Zelllinien zu erhalten werden sie in Stickstoff eingefroren. Bei einer 80 %-igen Konfluenz werden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und trypsinisiert. Nach der Resuspension in DMEM^{-/-} mit 10 % FBS werden die Zellen bei 550 rpm (Heraeus/Thermo Scientific) für 5 min und 4°C pelletiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in 1x PBS aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation wird das entstandene Zellpellet in 2 Volumen Einfrier-Medium (DMEM^{-/-} + 20 % FBS + 20 % DMSO) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen in Cryo-Röhrchen aliquotiert und erst einige Stunden bei -40°C danach über Nacht bei -80°C in einem Isopropanol-Tank (Quallilab, Frankreich) eingefroren. Das Isopropanol gewährleistet eine langsame Abkühlung der Zellen um ca. 1°C pro Stunde. Dadurch überlebt ein Teil der Zellen das Einfrieren unbeschadet. Am darauf folgenden Tag werden die Zellen in einen Stickstoff-Tank überführt, wo sie bis zu drei Jahren gelagert werden.

4.2.4.4 Auftauen von Zellen

Die in Flüssigstickstoff gelagerten Zellen werden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und direkt in eine Kulturflasche mit vorgewärmtem Medium gegeben. Nach ca. 5 Stunden Inkubation (37°C, 5 % CO₂) wird das Medium gewechselt, um nicht adhärenzte, tote Zellen und das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. Die weitere Kultivierung erfolgt wie oben beschrieben.

4.2.4.5 Aussäen adhärenter Zellen

Für alle Transfektionsversuche werden die Zellen in 24-well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht) ausgesät. Wie beim Passagieren werden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in jedes Well 500 µl dieser Zellsuspension gegeben, so dass pro Well eine Konfluenz von 80 % besteht. Dies gewährleistet eine ausreichende Effizienz der Transfektion und dadurch gut messbare Luziferase und WST-1 Werte.

Für die Zellzyklusexperimente werden die Zellen aus einem 75 mm² Flasche mit einer 100 %-igen Konfluenz in 20 ml Medium aufgenommen und je 2 ml pro großer Schale (150 mm x 20 mm) weitere 2 Tage inkubiert, bevor sie mit den entsprechenden Chemikalien behandelt werden.

4.2.4.6 Herstellung von cytoplasmatischem Zellextrakt

4.2.4.6.1 Lysat für UV-Crosslinks

Der Zellextrakt, eingesetzt beim UV-Crosslink, wird nach folgendem Protokoll hergestellt:

Nachdem das Zellkulturmedium entfernt wurde, wäscht man die Zellen zweimal mit kaltem Waschpuffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7,4)). Nach einer Trypsinbehandlung nimmt man die Zellen in Waschpuffer mit 5 % FBS auf, um die Wirkung des Trypsins zu stoppen. Die Zellen werden bei 500 g für 10 min und 4°C pelletiert und anschließend in frischen Waschpuffer ohne FBS aufgenommen. Dieser Schritt der Zentrifugation und des Waschens wird weitere zweimal wiederholt, bevor das Pellet nun mit 1,5 Volumen hypotonen Puffer (10 mM K-Acetat, 1,5 mM Mg-Acetat, 10 mM HEPES (pH 7,4)) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert wird. Die Zellen überführt man nun in einen Glaspotter (Novodirect, Kehl) und bricht mit dem Glaspistill in ca. 50 Stößen die Zellen vorsichtig auf. Die Lyse wird mit einer Trypan Blau-Färbung unter dem Mikroskop verfolgt, da sich mit zunehmender Lyse die Zellen nicht mehr anfärben lassen und der Extrakt einheitlich gefärbt erscheint. Sind 80 - 90 % der Zellen aufgebrochen, zentrifugiert man die membranösen Bestandteile bei 10000 rpm (Kühlzentrifuge 5417R) für 10 min bei 4°C ab und erhält als Überstand den Zellextrakt, der dann für UV-Crosslink-Experimente verwendet wird.

4.2.4.6.2 Lysat für Westernblots

Diese Methode der Zellextraktherstellung ist modifiziert nach Whitfield *et al.* (2000). Die in kleinen Kulturschalen (Corning, Kaiserslautern) gewachsenen Zellen werden hierbei trypsinisiert und in DMEM aufgenommen. Nach der Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min bei 4°C wird das Pellet in 100 µl Lysepuffer (50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5 % NP-40, 1mM DTT) aufgenommen und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren lysiert. Der Überstand nach einer Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 min bei 4°C wird dann

in Westernblots zum Nachweis von zellzyklus-spezifischen Proteinen eingesetzt.

4.2.4.6.3 Lysat für die Luziferase-Messung

Um die Luziferaseaktivität zu messen, benötigt man Lysat, in dem die Enzyme intakt und weiterhin aktiv sind. Dies erfolgt meist nach einer WST-1 Messung, wonach die Zellen mit 1x PBS gewaschen werden und dann mit 150 µl 1x Passive Lysis Buffer (Promega, Mannheim) bedeckt werden. Nach kurzer Zeit kann beobachtet werden, wie sich die Zellen vom Boden ablösen und nun mit einer Pipette lysiert werden können. Den membranösen Anteil zentrifugiert man bei 5000 rpm für 5 min bei 4°C ab und verwendet dann den Überstand für eine Messung im Luminometer (Lumat LB9501, Berthold). Für diese Art der Zellyse kommt der Passive Lysis Buffer zum Einsatz, da dieser eine sehr geringe Hintergrundstrahlung bei der Messung von Coelenterazin entwickelt und somit *Renilla*-Luziferase ebenso wie *Firefly*-Luziferase genauer gemessen werden können.

4.2.4.7 Transfektion von RNA in eukaryotische Zellen

Bei dieser Methode werden verschiedene RNA Konstrukte inklusive einer Sequenz eines Reporterenzym (*Renilla*- oder *Firefly*-Luziferase) zusammen mit den zu untersuchenden miRNAs in Zellen transfiziert. Dabei wird das Reagenz Lipofectamine2000 (Invitrogen) benutzt, bei dem die Nukleinsäuren an positiv geladene Liposomen binden und somit über Endozytose in die Zellen gelangen.

Für die Transfektion werden 2 Mastermixe angefertigt. Einer enthält die zu untersuchende RNA und den Co-Reporter (*Renilla* Luziferase), während der andere Lipofectamine beinhaltet. Die Ansätze sehen wie folgt aus:

Mastermix 1:		Mastermix 2:	
	pro well		pro well
DMEM ^{-/-}	50 µl	DMEM ^{-/-}	50 µl
RNA RLuc + cap + poly(A)	50 ng	Lipofectamine2000	2 µl
RNA HCV-CLX-CMV	400 ng		

Je Transfektionsansatz wird miRNA in die Reaktionsgefäße vorgelegt, in die anschließend die oben aufgelisteten Mastermixe hinzugefügt und gemischt werden. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden die Komplexe auf die Zellen gegeben und für weitere zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Darauf folgen die Zellviabilitätsmessung mit WST-1 und die abschließende Lyse zur Luziferase-Aktivitätsbestimmung.

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

Transfektionen werden anhand einer Luziferase-Messung ausgewertet, da das transfizierte RNA-Konstrukt die Sequenz einer Luziferase (entweder *Renilla* oder *Firefly*) enthält und somit die Aktivität des Enzyms gemessen werden kann. Hier werden je Ansatz zweimal 20 µl des Zellextrakts in je ein PP-Röhrchen (Sarstedt) gegeben und die Lumineszenz für 20 sec im Luminometer (Berthold) nach Injektion von 100 µl der entsprechenden Substratlösung gemessen. Die ermittelten Werte werden ausgewertet und in Diagrammen dargestellt.

4.2.4.9 Messung der metabolischen Aktivität durch WST-1

Um mehrere Parameter einer Transfektion zu berücksichtigen, wird neben der Luziferase-Messung auch die metabolische Aktivität der verwendeten Zellen überprüft. Hierzu wird der WST-1 Assay von Roche verwendet. Das enthaltene Tetrazoliumsalz wird unter Verwendung von NADH in Mitochondrien zu Formazan gespalten. Anhand eines Farbumschlags kann dann die Absorption bei 450 nm gemessen werden und somit die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt werden.

Durchgeführt wird dieser Test nach einer Transfektion, indem die Zellen zunächst mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl WST-1 Reagenz in einer Verdünnung von 1:50 in farblosem DMEM^{-/-} bedeckt werden. Nach einer Inkubation von 30 min im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) werden jeweils 100 µl des Überstandes in eine 96-well-Mikrotiterplatte (Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert und die Absorption bei 450 nm in einem ELISA Reader gemessen.

4.2.4.10 Proteinbestimmung durch UV-Absorption

Zur Proteinbestimmung wurden die Zellextrakte 1:50 verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm und 260 nm gemessen. Da die Zusammensetzung des Gesamtproteingehalts der jeweiligen Lysate nicht bekannt war, errechnete sich die Proteinkonzentration aus der Näherungsformel für Proteingemische nach WARBURG & CHRISTIAN (Holtzhauer, 1997):

$$\text{Proteinkonzentration (in mg/ml)} = (1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})$$

mit $A_{280}/A_{260} > 1,2$

4.2.4.11 Zellsynchronisierung

4.2.4.11.1 G₂/M-Phase: Nocodazol-Block mit "Shake off"

Um die Zellen in der G₂/M-Phase des Zellzyklus zu synchronisieren, werden die Zellen in großen Zellkulturschalen mit DMEM^{-/-} (+ 10 % FBS, + 1 % Pen/Strep) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei einer Zelldichte von ungefähr 60 % wird zu dem Kulturmedium Nocodazol mit einer Endkonzentration von 400 ng/ml bei Huh7-Zellen und 300 ng/ml bei HeLa-Zellen gegeben. Nach 17 h Inkubation werden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit DMEM^{-/-} (+ 10 % FBS, + 1 % Pen/Strep) bedeckt. Danach erfolgt der „Shake off“, indem die mitotischen, abgerundeten Zellen mit einigen Stößen von der Zellkulturschale abgelöst werden. Im Überstand sind nun ca. 80 % aller mitotischen Zellen und können ausgesät oder zur FACS (engl. Fluorescence activated cell sorting) Messung weiter verwendet werden.

4.2.4.11.2 S-Phase: Doppelter Thymidin-Block

Die Zellen werden in kleinen (Durchmesser: 10 cm) Zellkulturschalen ausgesät. Nachdem die Zellen eine Dichte von 40 % erreicht haben, gibt man DMEM^{-/-} (+ 10 % FBS, + 1 % Pen/Strep) mit Thymidin (Endkonzentration von 2 mM) hinzu und inkubiert die Schalen für 19 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂. Nun werden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, frisches Medium hinzugefügt und für 9 Stunden bei 37 °C ruhen gelassen. Nach erneutem Waschen mit 1x PBS erfolgt eine weitere Inkubation der Zellen in DMEM mit Thymidin (Endkonzentration von 2 mM) für 16 Stunden. Dann können die Zellen nach

zwei Waschschritten mit 1x PBS, Trypsinbehandlung und Wiederaufnahme in neuem Medium für eine FACS-Messung verwendet werden.

4.2.4.11.3 S-Phase: Kombination von Nocodazol (mit „Shake off“) und Thymidin-Block

Hierfür werden die Zellen wie oben beschrieben mit Nocodazol und anschließend „Shake off“ behandelt. Für das weitere Vorgehen werden die abgelösten mitotischen Zellen in eine neue Kulturschale überführt und für 8 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wäscht man die Zellen mit 1x PBS und ersetzt das Medium mit 2 mM Thymidin enthaltendem DMEM^{-/-} (+ 10 % FBS, + 1 % Pen/Strep). Nach weiteren 18 h Inkubation werden die Zellen gewaschen, mit Trypsin vom Boden abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Zellen im Übergang von der G₁- zur S-Phase. Wartet man weitere 4 Stunden, haben ca. 90 % die S-Phase erreicht.

4.2.4.11.4 G₀/G₁-Phase: Kontaktinhibition

Für die G₀/G₁-Phase des Zellzyklus inkubiert man die Zellen bis zu einer 100 %-igen Dichte und lässt sie noch weitere 24 h ruhen. Danach werden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, trypsiniert und in frischem DMEM^{-/-} (+ 10 % FBS, + 1 % Pen/Strep) aufgenommen. Alle folgenden G₀-Experimente sollten in einem Zeitfenster von ca. 2 h ablaufen. Danach befinden sich die Zellen in der G₁-Phase.

4.2.4.12 Propidiumiodid-Färbung

Ein Nachweis für die Zellsynchronisierung ist eine FACS-Messung mit Propidiumiodid (PI) gefärbten Zellen. PI wird durch eine Permeabilisierung der Zellmembranen in den Kern transportiert, interkaliert dort in die DNA und kann nachfolgend mit einem FACS-Gerät detektiert werden. Somit können die jeweiligen Zellzyklusphasen nachgewiesen werden.

Um die Zellen zu färben, werden sie nach der Trypsinbehandlung bei 2000 rpm für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wird dann in 1x PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die gewaschenen Zellen werden nun in 200 µl 1x PBS per 1 x 10⁶ Zellen resuspendiert und unter schwachem Vortexen

mit 800 µl 100 % Ethanol versetzt. Durch diesen Schritt werden die Zellen permeabilisiert und bis zur finalen Färbung bei 4°C aufbewahrt. Diese erfolgt, indem die Zellen bei 2200 rpm für 5 min bei 4°C vorsichtig pelletiert und danach in 500 µl PI Färbelösung (50 µg/ml Propidiumiodid, 10 mM Tris (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 10 µg/ml RNase (DNase frei)) aufgenommen werden. Nach 30 min Inkubation der Ansätze bei 37°C müssen die Proben dann auf Eis gehalten werden, bis sie mit einem FACS-Gerät gemessen werden. Dabei ist zu beachten, dass die Proben abgedunkelt aufbewahrt werden, da Propidiumiodid sehr lichtempfindlich ist.

4.2.4.13 Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Bei der FACS-Analyse handelt es sich um eine Art der Durchflusszytometrie. Mit Hilfe von Lasern werden die durch Kapillaren gesogenen Zellen bestrahlt. Je nach Größe und Granularität erhält man ein Streuungsprofil, welches von Detektoren erfasst werden kann. Das so genannte Vorwärtsstreulicht (FSC: *Forward Scatter*) ist ein Maß für die Lichtbeugung, das das Volumen der Zelle und somit deren Größe widerspiegelt. Das Seitwärtsstreulicht (SSC: *Sidewards Scatter*) dagegen entspricht der Granularität der Zelle. Wenn man nun den Farbstoff Propidiumiodid einsetzt, welcher in die DNA der Zellen interkaliert, kann anhand der Leuchtintensität die Menge an DNA gemessen werden.

Für diese Arbeit wurde das FACScalibur der Firma BD in der Arbeitsgruppe von Prof. Schmitz (Biochemisches Institut, Gießen) benutzt, um die unterschiedlichen Zellzyklusphasen anhand dieser PI-Färbung von synchronisierten Zellen nachzuweisen. Die Bedienung erfolgte nach Handbuch des Gerätes.

4.2.5 Mikrobiologische Methoden

4.2.5.1 Kultivierung von *E. coli* XL-1 blue

Die Kultivierung von *E. coli* XL1-Blue erfolgt entweder auf Agar-Platten oder als Flüssigkultur mit LB-Medium. Der Selektionsmarker des *E.coli*-Stammes XL1-Blue ist eine Tetracyclin-Resistenz, während alle verwendeten Plasmide eine Ampicillin-Resistenz tragen. Die Agar-Platten werden eine Stunde vor dem Ausplattieren der Bakterien mit den entsprechenden Antibiotika vorinkubiert.

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	150 µg/ml
Tetracyclin	5 µg/ml

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

Eine Übernacht-Kultur (10 ml) von *E. coli* XL1-Blue wird mit LB-Medium und den entsprechenden Antibiotika 1:10 verdünnt. Die Kultur wird bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von ca. 0,6 auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation bei ca. 5000 rpm (Kühlzentrifuge J2-21, Beckmann Instruments) für 5 min bei 4°C pelletiert. Danach wird das Zellpellet in 50 ml eiskaltem ddH₂O durch Schütteln resuspendiert und wieder für 3 min bei ca. 5000 rpm abzentrifugiert. Nach drei Wiederholungen des Waschschrittes wird das Pellet in ca. 2 ml ddH₂O gelöst. Die elektrokompetenten Zellen können direkt für eine Transformation verwendet oder in Form von Glycerol-Stocks bei -70°C aufbewahrt werden.

4.2.5.3 Transformation elektrokompetenter Bakterienzellen

Durch eine Elektroporation wird das gewünschte Plasmid auf schnelle und effiziente Weise in Bakterienzellen transformiert. Die Zellmembran wird durch ein elektrisches Feld permeabilisiert und kann somit die Plasmid DNA besser aufnehmen.

Für die Elektroporation werden ca. 0,01 pmol Plasmid-DNA mit 100 µl kompetenten Zellen gemischt und in eine Elektroporationsküvette überführt, in der 50 µl ddH₂O vorgelegt ist. Danach erfolgt der elektrische Impuls, welcher abhängig vom Zelltyp ist. Für *E. coli* XL1-Blue sind diese Werte: 25 µF, 200 - 400 Ohm, 2,5 kV. Dann werden die Zellen in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden pelletiert und der Überstand größtenteils abgenommen. Im restlichen Überstand werden die Zellen dann resuspendiert und auf Antibiotika-haltige Agarplatten ausplattiert.

4.2.5.4 Herstellung von Glycerol-Stocks

Die so genannten Glycerol-Stocks werden für eine langfristige Lagerung von kompetenten Bakterienzellen und Transformanten benutzt. Dazu wird ein Volumen einer Übernacht-Kultur mit 1/4 Volumen 80 %-igem Glycerol gemischt und danach aliquotiert. Eine erneute Kultivierung von Transformanten erfolgt durch direktes Ausplattieren auf Agar-Platten. Glycerol-Stocks kompetenter Bakterienzellen können direkt nach dem Auftauen für eine Transformation verwendet werden.

Literaturverzeichnis

- Alberts B, Johnson A, *et al.* (2008) *Molecular Biology of the Cell*: Garland Science, NY.
- Ali N, Pruijn GJ, *et al.* (2000) Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* 275: 27531-27540.
- 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: 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: 2249-2254.
- André P, Komurian-Pradel F, *et al.* (2002) Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 76: 6919-6928.
- Appel N, Schaller T, *et al.* (2006) From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J Biol Chem* 281: 9833-9836.
- Appel N, Zayas M, *et al.* (2008) Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* 4: e1000035.
- Arellano M, Moreno S (1997) Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 559-573.
- Baek KH, Park HY, *et al.* (2006) Overexpression of hepatitis C virus NS5A protein induces chromosome instability via mitotic cell cycle dysregulation. *J Mol Biol* 359: 22-34.
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233.
- Bartenschlager R, Cosset FL, *et al.* (2010) Hepatitis C virus replication cycle. *J Hepatol* 53: 583-585.
- Bartenschlager R, Frese M, *et al.* (2004) Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63: 71-180.
- Bartenschlager R, Lohmann V (2000) Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 81: 1631-1648.
- Bartenschlager R, Penin F, *et al.* (2011) Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 19: 95-103.
- Barth H, Schafer C, *et al.* (2003) Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 278: 41003-41012.
- Blackham S, Baillie A, *et al.* (2010) Gene expression profiling indicates the roles of host oxidative stress, apoptosis, lipid metabolism, and intracellular transport genes in the replication of hepatitis C virus. *J Virol* 84: 5404-5414.
- Blanchard E, Belouzard S, *et al.* (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80: 6964-6972.
- Bonneau AM, Sonenberg N (1987) Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J Biol Chem* 262: 11134-11139.
- Boonstra J (2003) Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle. *J Cell Biochem* 90: 244-252.

- Bostock CJ, Prescott DM, *et al.* (1971) An evaluation of the double thymidine block for synchronizing mammalian cells at the G1-S border. *Exp Cell Res* 68: 163-168.
- Boutz DR, Collins P, *et al.* (2011) A two-tiered approach identifies a network of cancer and liver diseases related genes regulated by miR-122. *J Biol Chem.*
- Bradrick SS, Walters RW, *et al.* (2006) The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase. *Nucleic Acids Res* 34: 1293-1303.
- Brass V, Moradpour D, *et al.* (2006) Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *Int J Med Sci* 3: 29-34.
- Breitfeld PP, McKinnon WC, *et al.* (1990) Effect of nocodazole on vesicular traffic to the apical and basolateral surfaces of polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 111: 2365-2373.
- Brow DA, Guthrie C (1988) Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals. *Nature* 334: 213-218.
- Brown EA, Zajac AJ, *et al.* (1994) In vitro characterization of an internal ribosomal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus. *J Virol* 68: 1066-1074.
- Buchan JR, Parker R (2007) Molecular biology. The two faces of miRNA. *Science* 318: 1877-1878.
- Bueno MJ, Malumbres M (2011) MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim Biophys Acta* 1812: 592-601.
- Burchard J, Zhang C, *et al.* (2010) microRNA-122 as a regulator of mitochondrial metabolic gene network in hepatocellular carcinoma. *Mol Syst Biol* 6: 402.
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642-655.
- Chang J, Guo JT, *et al.* (2008) Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *J Virol* 82: 8215-8223.
- Chang J, Nicolas E, *et al.* (2004) miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* 1: 106-113.
- Chen Y, Zhou H, *et al.* (2010) Hepatic differentiation of liver-derived progenitor cells and their characterization by microRNA analysis. *Liver Transpl* 16: 1086-1097.
- Chevaliez S, Pawlotsky JM (2006) HCV Genome and Life Cycle. In: Tan SL, editor. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Horizon Bioscience, Norfolk (UK). pp. 5-47.
- Cho J, Baek W, *et al.* (2001) HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F-1 up-regulation. *Biochim Biophys Acta* 1538: 59-66.
- Cho JW, Baek WK, *et al.* (2001) Hepatitis C virus core protein promotes cell proliferation through the upregulation of cyclin E expression levels. *Liver* 21: 137-142.
- Choo QL, Kuo G, *et al.* (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362.
- Coats S, Flanagan WM, *et al.* (1996) Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 272: 877-880.
- Craig AW, Haghghat A, *et al.* (1998) Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologous PAIP enhances translation. *Nature* 392: 520-523.

- Dancygier H (2003) Zellzyklus und Zellproliferation. Klinische Hepatologie. Springer Verlag, Berlin.
- Darzynkiewicz Z, Evenson DP, *et al.* (1979) Correlation between cell cycle duration and RNA content. *J Cell Physiol* 100: 425-438.
- Datta B, Datta R, *et al.* (1999) Increased phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2alpha at the G2/M boundary in human osteosarcoma cells correlates with deglycosylation of p67 and a decreased rate of protein synthesis. *Exp Cell Res* 250: 223-230.
- De Brabander M, Geuens G, *et al.* (1981) Nucleated assembly of mitotic microtubules in living PTK2 cells after release from nocodazole treatment. *Cell Motil* 1: 469-483.
- Doudna JA, Sarnow P (2007) Translation Initiation by Viral Internal Ribosome Entry Sites. *Translational Control in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY: Mathews M.B., Sonenberg N., Hershey J.W.B. pp. 129-153.
- Dunn LL, Buckle AM, *et al.* (2010) The emerging role of the thioredoxin system in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 2089-2098.
- Egger D, Wolk B, *et al.* (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76: 5974-5984.
- Erhardt A, Hassan M, *et al.* (2002) Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology* 292: 272-284.
- Esau C, Davis S, *et al.* (2006) miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 3: 87-98.
- Eulalio A, Behm-Ansmant I, *et al.* (2007) P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 9-22.
- Evans MJ, von Hahn T, *et al.* (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446: 801-805.
- Evans T, Rosenthal ET, *et al.* (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389-396.
- Eystathioy T, Chan EK, *et al.* (2002) A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell* 13: 1338-1351.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, *et al.* (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9: 102-114.
- Fontanes V, Raychaudhuri S, *et al.* (2009) A cell-permeable peptide inhibits hepatitis C virus replication by sequestering IRES transacting factors. *Virology* 394: 82-90.
- Franck N, Le Seyec J, *et al.* (2005) Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome. *J Virol* 79: 2700-2708.
- Fraser CS, Doudna JA (2007) Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol* 5: 29-38.
- 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: 5326-5338.

- Fu H, Tie Y, *et al.* (2005) Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method. *FEBS Lett* 579: 3849-3854.
- Fukasawa M (2010) Cellular lipid droplets and hepatitis C virus life cycle. *Biol Pharm Bull* 33: 355-359.
- Gale M, Jr., Tan SL, *et al.* (2000) Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 239-280.
- Gardner JP, Durso RJ, *et al.* (2003) L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4498-4503.
- Garry 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: 255-265.
- Goergen D (2010) Molekulare Mechanismen der Wirkung der leberspezifischen microRNA-122 auf die Translation der Hepatitis C Virus-RNA. Gießen: Justus-Liebig-Universität.
- Gontarek RR, Gutshall LL, *et al.* (1999) hnRNP C and polypyrimidine tract-binding protein specifically interact with the pyrimidine-rich region within the 3'NTR of the HCV RNA genome. *Nucleic Acids Res* 27: 1457-1463.
- Gosert R, Chang KH, *et al.* (2000) Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap-independent translation directed by both picornaviral and flaviviral internal ribosome entry sites *In vivo*. *Mol Cell Biol* 20: 1583-1595.
- Gramantieri L, Ferracin M, *et al.* (2007) Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 67: 6092-6099.
- Griffin SD, Beales LP, *et al.* (2003) The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 535: 34-38.
- Guan KL, Jenkins CW, *et al.* (1994) Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 8: 2939-2952.
- Hahm B, Kim YK, *et al.* (1998) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol* 72: 8782-8788.
- Han J, Lee Y, *et al.* (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18: 3016-3027.
- Han J, Pedersen JS, *et al.* (2009) Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* 136: 75-84.
- Hartwell LH, Culotti J, *et al.* (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183: 46-51.
- Hartwell LH, Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634.
- Hassan M, Ghozlan H, *et al.* (2005) Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) signaling pathway is essential for the stimulation of hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3)-mediated cell growth. *Virology* 333: 324-336.
- Hengst L, Reed SI (1996) Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271: 1861-1864.

- Hengst L, Reed SI (1998) Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol* 227: 25-41.
- Henke JI, Goergen D, *et al.* (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *Embo J* 27: 3300-3310.
- Hirai H, Roussel MF, *et al.* (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 15: 2672-2681.
- Höck J, Weinmann L, *et al.* (2007) Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep* 8: 1052-1060.
- Holtzhauer M (1997) Protein-Konzentrationsbestimmung durch UV-Absorptionsmessung (Photometrie). *Biochemische Labormethoden*. Springer Verlag, Berlin.
- Honda M, Kaneko S, *et al.* (2000) Cell cycle regulation of hepatitis C virus internal ribosomal entry site-directed translation. *Gastroenterology* 118: 152-162.
- Honda M, Ping LH, *et al.* (1996) Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* 222: 31-42.
- Hu P, Samudre K, *et al.* (2004) CK2 phosphorylation of Bdp1 executes cell cycle-specific RNA polymerase III transcription repression. *Mol Cell* 16: 81-92.
- Hughes TA, Cook PR (1996) Mimosine arrests the cell cycle after cells enter S-phase. *Exp Cell Res* 222: 275-280.
- Hulleman E, Bijvelt JJ, *et al.* (1999) Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase p42MAPK during the ongoing cell cycle. *J Cell Physiol* 180: 325-333.
- Hwang B, Lim JH, *et al.* (2009) hnRNP L is required for the translation mediated by HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun* 378: 584-588.
- Ikegami S, Taguchi T, *et al.* (1978) Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase-alpha. *Nature* 275: 458-460.
- Inui M, Martello G, *et al.* (2010) MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 252-263.
- Ito T, Lai MM (1999) An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence. *Virology* 254: 288-296.
- Ito T, Tahara SM, *et al.* (1998) The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J Virol* 72: 8789-8796.
- Jackman J, O'Connor PM (2001) Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 8: Unit 8 3.
- Jackson RJ, Hellen CU, *et al.* (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 113-127.
- Jacobson A (1996) Poly(A) metabolism and translation: the closed-loop model. *Translational Control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.: Hershey J. W. B., Mathews M. B., Sonenberg N. pp. 451-480.
- Jang SK (2006) Internal initiation: IRES elements of picornaviruses and hepatitis c virus. *Virus Res* 119: 2-15.
- Jang SK, Krausslich HG, *et al.* (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62: 2636-2643.

- Jangra RK, Yi M, *et al.* (2010) Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol* 84: 6615-6625.
- Johnson DG, Walker CL (1999) Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 295-312.
- Jopling CL, Yi M, *et al.* (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309: 1577-1581.
- Kato J, Matsushime H, *et al.* (1993) Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* 7: 331-342.
- Kato JY, Matsuoka M, *et al.* (1994) Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 79: 487-496.
- Kieft JS, Zhou K, *et al.* (2001) Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *Rna* 7: 194-206.
- Kim JH, Paek KY, *et al.* (2004) A cellular RNA-binding protein enhances internal ribosomal entry site-dependent translation through an interaction downstream of the hepatitis C virus polyprotein initiation codon. *Mol Cell Biol* 24: 7878-7890.
- Kim YK, Lee SH, *et al.* (2003) Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *Rna* 9: 599-606.
- Kozak M (2005) A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res* 33: 6593-6602.
- Kunkel M, Lorinczi M, *et al.* (2001) Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J Virol* 75: 2119-2129.
- Kwun HJ, Jung EY, *et al.* (2001) p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol* 82: 2235-2241.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Landgraf P, Rusu M, *et al.* (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129: 1401-1414.
- Lavillette D, Pecheur EI, *et al.* (2007) Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J Virol* 81: 8752-8765.
- Lee MN, Jung EY, *et al.* (2002) Hepatitis C virus core protein represses the p21 promoter through inhibition of a TGF-beta pathway. *J Gen Virol* 83: 2145-2151.
- Lee Y, Ahn C, *et al.* (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415-419.
- Lee Y, Jeon K, *et al.* (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J* 21: 4663-4670.
- Li R, Waga S, *et al.* (1994) Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371: 534-537.
- Lian S, Jakymiw A, *et al.* (2006) GW bodies, microRNAs and the cell cycle. *Cell Cycle* 5: 242-245.
- Liang Y, Ridzon D, *et al.* (2007) Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 8: 166.
- Liu J, Valencia-Sanchez MA, *et al.* (2005) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7: 719-723.

- Liu S, Yang W, *et al.* (2009) Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83: 2011-2014.
- Lloyd RV, Erickson LA, *et al.* (1999) p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 154: 313-323.
- Lohmann V, Roos A, *et al.* (2000) Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 7: 167-174.
- Loyer P, Trembley JH, *et al.* (2005) Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cell Signal* 17: 1033-1051.
- Lund E, Guttinger S, *et al.* (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303: 95-98.
- Lundin M, Monne M, *et al.* (2003) Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol* 77: 5428-5438.
- Luo G (1999) Cellular proteins bind to the poly(U) tract of the 3' untranslated region of hepatitis C virus RNA genome. *Virology* 256: 105-118.
- Lytle JR, Wu L, *et al.* (2002) Domains on the hepatitis C virus internal ribosome entry site for 40s subunit binding. *Rna* 8: 1045-1055.
- Ma JB, Ye K, *et al.* (2004) Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429: 318-322.
- Ma L, Liu J, *et al.* (2010) Expression of miR-122 mediated by adenoviral vector induces apoptosis and cell cycle arrest of cancer cells. *Cancer Biol Ther* 9: 554-561.
- Machlin ES, Sarnow P, *et al.* (2011) Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 3193-3198.
- MacRae IJ, Ma E, *et al.* (2008) In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 512-517.
- Maitra U, Stringer EA, *et al.* (1982) Initiation factors in protein biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 51: 869-900.
- Martineau Y, Derry MC, *et al.* (2008) Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Mol Cell Biol* 28: 6658-6667.
- McGivern DR, Lemon SM (2011) Virus-specific mechanisms of carcinogenesis in hepatitis C virus associated liver cancer. *Oncogene*.
- McLauchlan J (2000) Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 7: 2-14.
- Meister G, Landthaler M, *et al.* (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15: 185-197.
- Meister G, Landthaler M, *et al.* (2005) Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol* 15: 2149-2155.
- Merrick WC (1992) Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev* 56: 291-315.
- Mikkelsen NE, Johansson K, *et al.* (2003) Structural basis for feedback inhibition of the deoxyribonucleoside salvage pathway: studies of the *Drosophila* deoxyribonucleoside kinase. *Biochemistry* 42: 5706-5712.

- Montagnoli A, Fiore F, *et al.* (1999) Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 13: 1181-1189.
- Munakata T, Nakamura M, *et al.* (2005) Down-regulation of the retinoblastoma tumor suppressor by the hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18159-18164.
- Murakami Y, Aly HH, *et al.* (2009) Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J Hepatol* 50: 453-460.
- Naka K, Dansako H, *et al.* (2006) Hepatitis C virus NS5B delays cell cycle progression by inducing interferon-beta via Toll-like receptor 3 signaling pathway without replicating viral genomes. *Virology* 346: 348-362.
- Nasmyth K (2001) Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* 35: 673-745.
- Nguyen H, Mudryj M, *et al.* (2003) Hepatitis C virus core protein expression leads to biphasic regulation of the p21 cdk inhibitor and modulation of hepatocyte cell cycle. *Virology* 312: 245-253.
- Niepmann M (2009) Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochim Biophys Acta* 1789: 529-541.
- Niepmann M (2009) Activation of hepatitis C virus translation by a liver-specific microRNA. *Cell Cycle* 8: 1473-1477.
- Nishimura-Sakurai Y, Sakamoto N, *et al.* (2010) Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells. *J Gastroenterol* 45: 523-536.
- Nurse P (1975) Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* 256: 547-551.
- Ohkawa K, Ishida H, *et al.* (2004) Hepatitis C virus core functions as a suppressor of cyclin-dependent kinase-activating kinase and impairs cell cycle progression. *J Biol Chem* 279: 11719-11726.
- Orom UA, Lund AH (2010) Experimental identification of microRNA targets. *Gene* 451: 1-5.
- Orom UA, Nielsen FC, *et al.* (2008) MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 30: 460-471.
- Pagano M, Tam SW, *et al.* (1995) Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269: 682-685.
- Pardee AB (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 1286-1290.
- Parker JS, Roe SM, *et al.* (2005) Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 434: 663-666.
- Pelham HR, Jackson RJ (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* 67: 247-256.
- Pelletier J, Sonenberg N (1985) Photochemical cross-linking of cap binding proteins to eucaryotic mRNAs: effect of mRNA 5' secondary structure. *Mol Cell Biol* 5: 3222-3230.
- Pelletier J, Sonenberg N (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334: 320-325.

- Pestova TV, Hellen CU (1999) Ribosome recruitment and scanning: what's new? *Trends Biochem Sci* 24: 85-87.
- Pestova TV, Hellen CU, *et al.* (1996) Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol Cell Biol* 16: 6859-6869.
- Pestova TV, Shatsky IN, *et al.* (1998) A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 12: 67-83.
- Petrik J, Parker H, *et al.* (1999) Human hepatic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase binds to the poly(U) tract of the 3' non-coding region of hepatitis C virus genomic RNA. *J Gen Virol* 80 (Pt 12): 3109-3113.
- Pileri P, Uematsu Y, *et al.* (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282: 938-941.
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, *et al.* (2007) Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol* 17: 118-126.
- Ploss A, Rice CM (2009) Towards a small animal model for hepatitis C. *EMBO Rep* 10: 1220-1227.
- Pollard TD, Satterwhite L, *et al.* (1990) Actin and myosin biochemistry in relation to cytokinesis. *Ann N Y Acad Sci* 582: 120-130.
- Polyak K, Lee MH, *et al.* (1994) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78: 59-66.
- Poulin F, Gingras AC, *et al.* (1998) 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J Biol Chem* 273: 14002-14007.
- Pyronnet S, Dostie J, *et al.* (2001) Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev* 15: 2083-2093.
- Qin X, Sarnow P (2004) Preferential translation of internal ribosome entry site-containing mRNAs during the mitotic cycle in mammalian cells. *J Biol Chem* 279: 13721-13728.
- Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267-271.
- Reinhart BJ, Slack FJ, *et al.* (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901-906.
- Reynolds JE, Kaminski A, *et al.* (1995) Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *Embo J* 14: 6010-6020.
- Rickert P, Seghezzi W, *et al.* (1996) Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II. *Oncogene* 12: 2631-2640.
- Roy R, Adamczewski JP, *et al.* (1994) The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell* 79: 1093-1101.
- Rüdel S, Flatley A, *et al.* (2008) A multifunctional human Argonaute2-specific monoclonal antibody. *Rna* 14: 1244-1253.
- Schafer KA (1998) The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 35: 461-478.
- Schorl C, Sedivy JM (2007) Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells. *Methods* 41: 143-150.
- Schwarz DS, Hutvagner G, *et al.* (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 199-208.
- Seeff LB (2002) Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36: S35-46.

- Shi ST, Lai MMC (2006) HCV 5' and 3'UTR: When Translation Meets Replication. In: Tan SL, editor. Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. Horizon Bioscience, Norfolk (UK): . pp. 49-87.
- Shimoike T, Mimori S, *et al.* (1999) Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol* 73: 9718-9725.
- Shiozaki K (2009) Nutrition-minded cell cycle. *Sci Signal* 2: pe74.
- Simmonds P, Bukh J, *et al.* (2005) Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42: 962-973.
- Simons JN, Desai SM, *et al.* (1996) Translation initiation in GB viruses A and C: evidence for internal ribosome entry and implications for genome organization. *J Virol* 70: 6126-6135.
- Sizova DV, Kolupaeva VG, *et al.* (1998) Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J Virol* 72: 4775-4782.
- Song JJ, Smith SK, *et al.* (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305: 1434-1437.
- Song Y (2006) Regulation of Hepatitis C Virus translation by the viral internal ribosome entry site and the 3'-untranslated region. Gießen: Justus-Liebig-Universität.
- Song Y, Friebe P, *et al.* (2006) The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol* 80: 11579-11588.
- Song Y, Tzima E, *et al.* (2005) Evidence for an RNA chaperone function of polypyrimidine tract-binding protein in picornavirus translation. *Rna* 11: 1809-1824.
- Spangberg K, Schwartz S (1999) Poly(C)-binding protein interacts with the hepatitis C virus 5' untranslated region. *J Gen Virol* 80 (Pt 6): 1371-1376.
- Spangberg K, Wiklund L, *et al.* (2000) HuR, a protein implicated in oncogene and growth factor mRNA decay, binds to the 3' ends of hepatitis C virus RNA of both polarities. *Virology* 274: 378-390.
- Spangberg K, Wiklund L, *et al.* (2001) Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro. *J Gen Virol* 82: 113-120.
- Spriggs KA, Stoneley M, *et al.* (2008) Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell* 100: 27-38.
- Takimoto K, Wakiyama M, *et al.* (2009) Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *Rna* 15: 1078-1089.
- Terenin IM, Dmitriev SE, *et al.* (2008) Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat Struct Mol Biol* 15: 836-841.
- Tinton SA, Schepens B, *et al.* (2005) Regulation of the cell-cycle-dependent internal ribosome entry site of the PITSLRE protein kinase: roles of Unr (upstream of N-ras) protein and phosphorylated translation initiation factor eIF-2alpha. *Biochem J* 385: 155-163.
- Tischendorf JJ, Beger C, *et al.* (2004) Polypyrimidine tract-binding protein (PTB) inhibits Hepatitis C virus internal ribosome entry site (HCV IRES)-mediated translation, but does not affect HCV replication. *Arch Virol* 149: 1955-1970.

- Unbehaun A, Borukhov SI, *et al.* (2004) Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev* 18: 3078-3093.
- Urbani L, Sherwood SW, *et al.* (1995) Dissociation of nuclear and cytoplasmic cell cycle progression by drugs employed in cell synchronization. *Exp Cell Res* 219: 159-168.
- Vannucchi S, Percario ZA, *et al.* (2000) Interferon-beta induces S phase slowing via up-regulated expression of PML in squamous carcinoma cells. *Oncogene* 19: 5041-5053.
- Vasudevan S, Steitz JA (2007) AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 128: 1105-1118.
- Vasudevan S, Tong Y, *et al.* (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318: 1931-1934.
- Vasudevan S, Tong Y, *et al.* (2008) Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* 7: 1545-1549.
- Venkatesan A, Sharma R, *et al.* (2003) Cell cycle regulation of hepatitis C and encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site-mediated translation in human embryonic kidney 293 cells. *Virus Res* 94: 85-95.
- Villanueva RA, Jangra RK, *et al.* (2010) miR-122 does not modulate the elongation phase of hepatitis C virus RNA synthesis in isolated replicase complexes. *Antiviral Res* 88: 119-123.
- Voorhoeve PM, le Sage C, *et al.* (2006) A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 124: 1169-1181.
- Wang C, Sarnow P, *et al.* (1993) Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* 67: 3338-3344.
- White RJ, Gottlieb TM, *et al.* (1995) Cell cycle regulation of RNA polymerase III transcription. *Mol Cell Biol* 15: 6653-6662.
- Whitfield ML, Zheng LX, *et al.* (2000) Stem-loop binding protein, the protein that binds the 3' end of histone mRNA, is cell cycle regulated by both translational and posttranslational mechanisms. *Mol Cell Biol* 20: 4188-4198.
- Wilson JA, Zhang C, *et al.* (2011) Human Ago2 is required for efficient microRNA 122 regulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation. *J Virol* 85: 2342-2350.
- Winter J, Jung S, *et al.* (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11: 228-234.
- Wünschmann S, Medh JD, *et al.* (2000) Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol* 74: 10055-10062.
- Yamaga AK, Ou JH (2002) Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. *J Biol Chem* 277: 33228-33234.
- Yamaguchi F, Takata M, *et al.* (2008) Rare sugar D-allose induces specific up-regulation of TXNIP and subsequent G1 cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells by stabilization of p27kip1. *Int J Oncol* 32: 377-385.

- Yang XJ, Liu J, *et al.* (2006) HCV NS2 protein inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in the S-phase in mammalian cells through down-regulation of cyclin A expression. *Virus Res* 121: 134-143.
- Yang Z, Jakymiw A, *et al.* (2004) GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J Cell Sci* 117: 5567-5578.
- Yao ZQ, Eisen-Vandervelde A, *et al.* (2003) HCV core/gC1qR interaction arrests T cell cycle progression through stabilization of the cell cycle inhibitor p27Kip1. *Virology* 314: 271-282.
- Zhang H, Kolb FA, *et al.* (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118: 57-68.
- Zieve GW, Turnbull D, *et al.* (1980) Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. Nocodazole accumulated mitotic cells. *Exp Cell Res* 126: 397-405.

Abkürzungen und Glossar

2c	2-Chromatid-Chromosomen
2n	diploid
³² P	radioaktives Phosphorisotop
4c	4-Chromatid-Chromosomen
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ago	Protein der Argonaute-Familie
Amp ^r	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	Adenin und Uracil-reiche Sequenz einer RNA
ATP	Adenosintriphosphat
bp(s)	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Cap	m7-Gppp (am 5'-Ende der mRNA über eine 5'-5'-Bindung angefügtes 7-Methylguanosin)
Cdc	„cell division cycle“ (Cyclin-abhängige Phosphatase)
CDK	<i>cyclin dependant kinase</i> (Cyclin-abhängige Kinase)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ci	Curie, 1 Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Bq (Bequerel)
CKI	CDK-Inhibitor
cpm	<i>counts per minute</i> (registrierte Zerfälle pro Minute)
CTP	Cytidintriphosphat
d-	Deletion
ddH ₂ 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
ds	doppelsträngig
dT	Thymidin
DTT	Dithiothreitol
E2F	ein Transkriptionsfaktor in höheren Eukaryoten
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid

FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FBS	Fötales Rinderserum
FLuc	<i>Firefly-Luziferase</i> (Luziferase aus dem Leuchtkäfer <i>Photinus pyralis</i>)
g	Gravitationskonstante (z.B. 10.000 x g)
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i> (Leberzellkarzinom)
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i> (heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein)
IRES	<i>internal ribosome entry site</i> (interne Ribosomen-Eintrittsstelle)
ITAF	<i>IRES trans-acting factor</i> (IRES bindender Faktor)
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LD	<i>lipid droplet</i> (Lipidvesikel)
LDL	<i>low density lipoprotein</i> (Lipoprotein niederer Dichte)
μ	micro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
M	mol/l (molar)
mA	Milliampère (elektrische Stromstärke)
mat	<i>mature</i> (reif)
Met	Met-tRNA ^{Met} (Methionyl-beladene Initiator-tRNA)
mol	Stoffmenge
miR	microRNA
miR*	zur microRNA komplementärer Gegenstrang in microRNA-Duplexen
miRNA	microRNA
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
NBT/BCIP	Nitroblautetrazoliumchlorid/ 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-p-Toluidinsalz
NLS	<i>nuclear localisation signal</i> (Signalsequenz zur Lokalisierung im Zellkern)
NS	Nicht-Struktur-Protein
n.s.	nicht synchronisiert
nt(s)	Nukleotid(e)
NTP	Nukleosidtriphosphat
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
p	pico (10 ⁻¹²)
P	Phosphat
PABP	Poly(A)-Bindeprotein

PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Paip-1	PABP-bindendes Protein
PEST	Prolin (P), Glutamin (E), Serin (S), Threonin (T) (Signalsequenz für den Proteinabbau)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCBP	Poly(rC)-bindendes Protein
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
Peak	Hochpunkt, Spitze
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration)
PI	Propidiumiodid
PLB	<i>passive lysis buffer</i> (Lysepuffer)
Primer	Einzelsträngiges DNA-Oligonukleotid mit einer freien 3'-OH-Gruppe, die als Startstelle zur DNA-Kettenverlängerung genutzt werden kann.
PTB	Polypyrimidin-Trakt-bindendes Protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r-	Ribo-
Rb	Retinoblastom Protein
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> (RNA induzierter Komplex der die mRNA Translation inhibiert)
RLuc	<i>Renilla-Luziferase</i> (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-Retikulozytenlysate)
RT	Raumtemperatur (ca. 20-25 °C)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sin	short and in-frame (kurz und im Leserahmen)
s.	siehe
ss(+)	<i>single stranded with positive orientation</i> (einzelsträngig mit positiver Orientierung)
snRNA	<i>small nuclear ribonucleic acid</i> (kleine nukleäre Ribonukleinsäure)
SSC	<i>saline-sodium citrate</i> (Natriumcitrat)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-Essigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylethyldiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i> (transformierender Wachstumsfaktor)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i> (Transfer-Ribonukleinsäure)

TXNIP	Thioredoxin-interagierendes Protein
U	<i>Unit</i> (Enzym-Einheit)
U	Uracil
U/C o. UC	Uridin/Cytosin-reiche Region in der 3'-UTR der HCV RNA
UCX	Poly(U/C)-Trakt inklusive der drei Stem-loops der 3'-UTR von HCV
Ubi	Ubiquitin-Sequenz
UE	Untereinheit
UTP	Uridintriphosphat
UTR	<i>untranslated region</i> (untranslatierter Bereich einer RNA-Sequenz)
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
VR	Variable Region (ein Bereich der 3'-UTR von HCV)
VUC	Variable Region inklusive des Poly(U/C)-Trakts
VRX	Variable Region inklusive der drei Stem-loops der 3'-UTR von HCV
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumen/Volumen)
W	Watt
WHO	<i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)
WST-1	<i>water soluble tetrazolium (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate)</i>
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i> (Gewicht/Volumen)

Abbildungsverzeichnis

- 1 Vermehrungszyklus von HCV
- 2 Schema des HCV-Genoms
- 3 Ablauf der eukaryotischen Translationsinitiation
- 4 Zirkularisierung der mRNA
- 5 Darstellung der verschiedenen IRES-Typen
- 6 Darstellung der IRES-abhängigen Translation bei HCV
- 7 Bindung zellulärer Proteine an die HCV-RNA
- 8 Prozessierung von microRNAs
- 9 microRNA Bindestellen am HCV-Genom
- 10 Darstellung der Zellzyklusphasen
- 11 Zellzyklus-abhängige Expression von Cyclinen
- 12 Effekt von p27^{Kip1} auf den Zellzyklus
- 13 HCV-RNA-Konstrukte zur Proteinbindungsanalyse
- 14 Übersicht verschiedener HCV-bindender Proteine in einem UV-Crosslink
- 15 Darstellung großer HCV-bindender Proteine in einem UV-Crosslink
- 16 Vergleich verschiedener Lysate durch UV-Crosslinks
- 17 Ergebnisse von UV-Crosslinks mit HeLa-Extrakt und Retikulozytenlysat
- 18 Analyse der Bindung von ³²P-UTP an Source 15Q und 15S Matrices
- 19 Proteinauftrennung des Huh7-Lysats mit Source 15S bei unterschiedlichen pH-Werten
- 20 Kompetitions-Crosslinks mit Huh7-Extrakt
- 21 Interaktion von p210 mit der HCV-RNA
- 22 Darstellung eines Ergebnisses einer FACS-Analyse
- 23 Synchronisierung der Zellen durch Nocodazol-Behandlung
- 24 Zell-Synchronisierung durch Nocodazol-Behandlung und anschließendem „Shake off“
- 25 Zell-Synchronisierung durch Kontaktinhibition
- 26 Zell-Synchronisierung durch doppelten Thymidin-Block
- 27 Zell-Synchronisierung durch die Kombination von Nocodazol, Shake off und Thymidin-Behandlung
- 28 Reporterkonstrukte für Transfektionsexperimente in Huh7- und HeLa-Zellen
- 29 Effizienz der Translation der RLuc- und HCV-FLuc-RNA in Huh7-Zellen
- 30 Effizienz der Translation der RLuc- und HCV-FLuc-RNA in HeLa-Zellen
- 31 Effekt der miR-122 auf die Translation von HCV in verschiedenen Zellzyklusphasen in Huh7-Zellen
- 32 Effekt der miR-122 auf die Translation von HCV in verschiedenen Zellzyklusphasen in HeLa-Zellen
- 33 Expression der miR-122 in verschiedenen Phasen des Zellzyklus in Huh7-Zellen
- 34 Expression des Argonaute-2 Proteins in verschiedenen Zellzyklusphasen
- 35 Expression von GW182 in verschiedenen Phasen des Zellzyklus

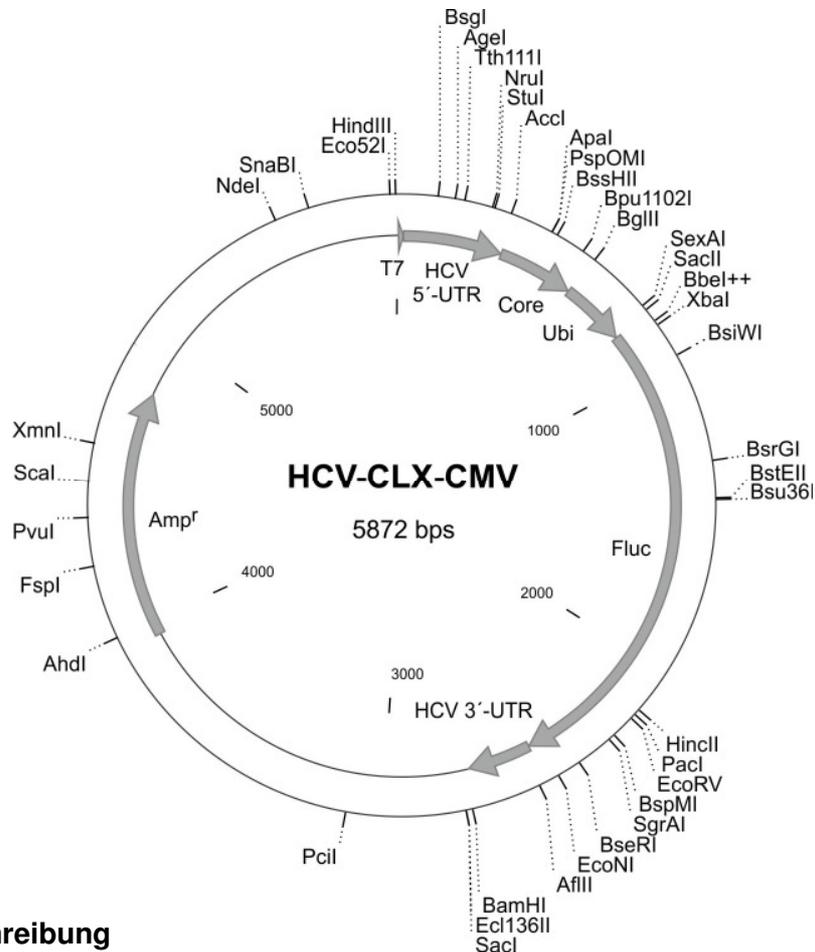
- 36 Expression von U6 während unterschiedlichen Zellzyklusphasen
- 37 Auswirkung von miRNP-Komponenten auf die Translationsstimulation der HCV-RNA
- 38 Aufbau einer Semi-dry Blot-Apparatur für den RNA-Transfer auf eine Nylonmembran
- 39 Aufbau einer Semi-dry Apparatur für den Proteintransfer auf eine PVDF Membran

Tabellenverzeichnis

- 1 Liste der wichtigsten Cycline bei der Regulation des Zellzyklus
- 2 Auswirkungen der HCV-Proteine auf den Zellzyklus

Anhang

Organisation des Plasmids pHCV-CLX-CMV



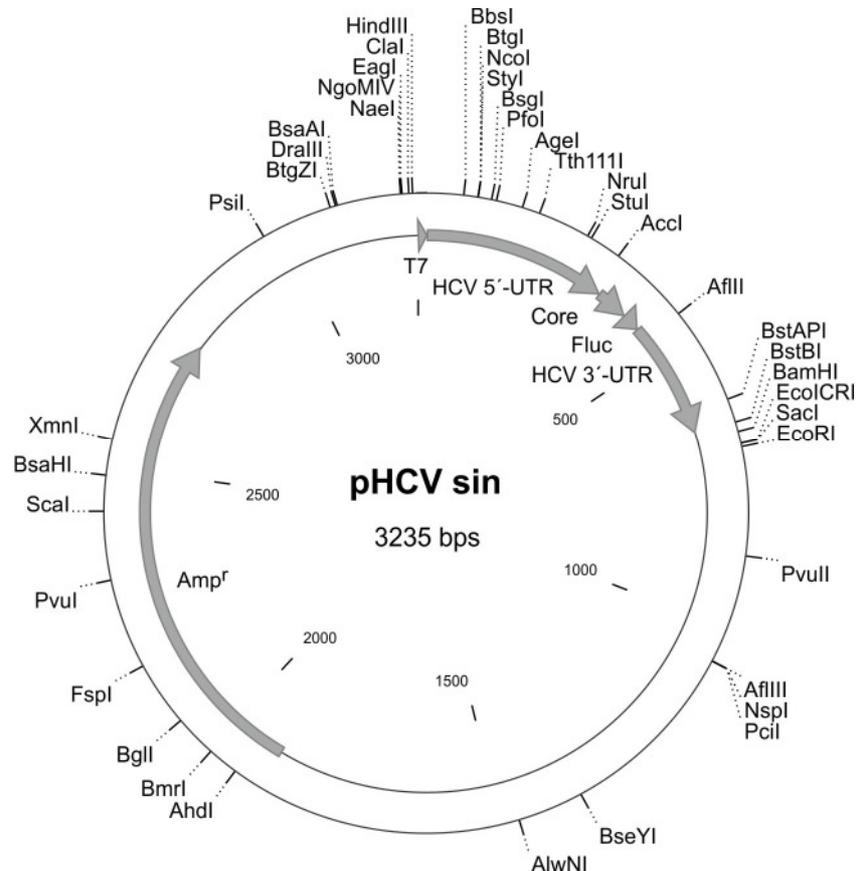
Plasmidbeschreibung

Region	Start [nt]	Ende [nt]
T7	1	18
HCV 5'-UTR	19	359
Core	360	640
Ubi	625	854
FLuc	855	2507
HCV 3'-UTR	2508	2728
Amp ^r	3947	4807
CMV	5249	5829

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der HCV-Expressionskassette. Diese beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die 5'-untranslatierte Region des HCV (HCV-5'-UTR), ein Teil des Core-kodierenden Sequenzbereiches (Core), eine Ubiquitin-Sequenz (Ubi), die kodierende Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (Fluc) und die 3'-untranslatierte Region des HCV (HCV-3'-NTR). Zudem besitzt dieses Plasmid eine Promotorsequenz des Cytomegalievirus (CMV).

Dieses Plasmid diente zur Herstellung der „IRES only“-Matrize. Hierfür wurden die Primer „HCVM 4986 for“ und „5'-UTR rev“ verwendet. Ebenso wurde von diesem Plasmid die HCV-CLX-CMV-Matrize generiert, die als RNA-Transkript für alle Transfektionsversuche verwendet wurde. Dafür wurden die Primer „HCVM 4986 for“ und „HCV 3X rev“ eingesetzt.

Organisation des Plasmids pHCV sin



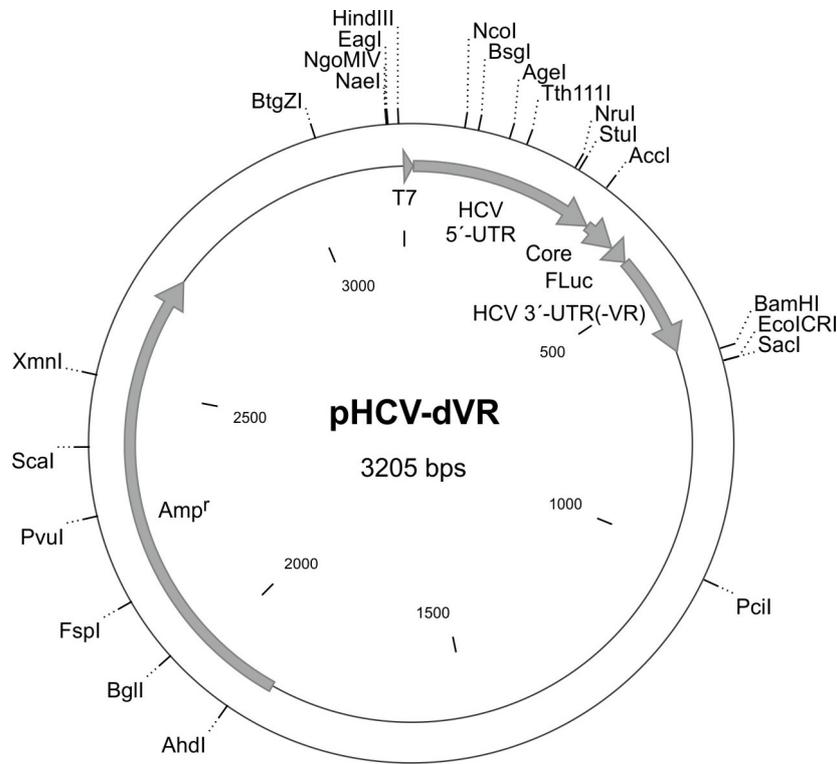
Plasmidbeschreibung

Region	Start [nt]	Ende [nt]
T7	1	18
HCV 5'-UTR	19	359
Core	360	420
FLuc	421	455
HCV 3'-UTR	456	676
Amp ^r	1895	2755

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der HCV-Expressionskassette. Diese beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die 5'-untranslatierte Region des HCV (HCV-5'-UTR), ein Teil des Core-kodierenden Sequenzbereiches (Core), ein Teil der kodierenden Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (Fluc) und die 3'-untranslatierte Region des HCV (HCV 3'-UTR).

Dieses Plasmid diente zur Herstellung der „HCV sin“-Matrize. Hierfür wurden die Primer „WT for“ und „HCV 3X rev“ verwendet. Ebenso wurde von diesem Plasmid die „d3'X“-Matrize mit den Primern „WT for“ und „3XA rev“, sowie die „dUCX“-Matrize mit den Primern „WT for“ und „dUCX rev“ generiert. Dadurch fehlten bei „d3'X“ die letzten drei Stem-loops und bei „dUCX“ der Poly(U/C)-Trakt und die Stem-loops.

Organisation des Plasmids pHCV-dVR



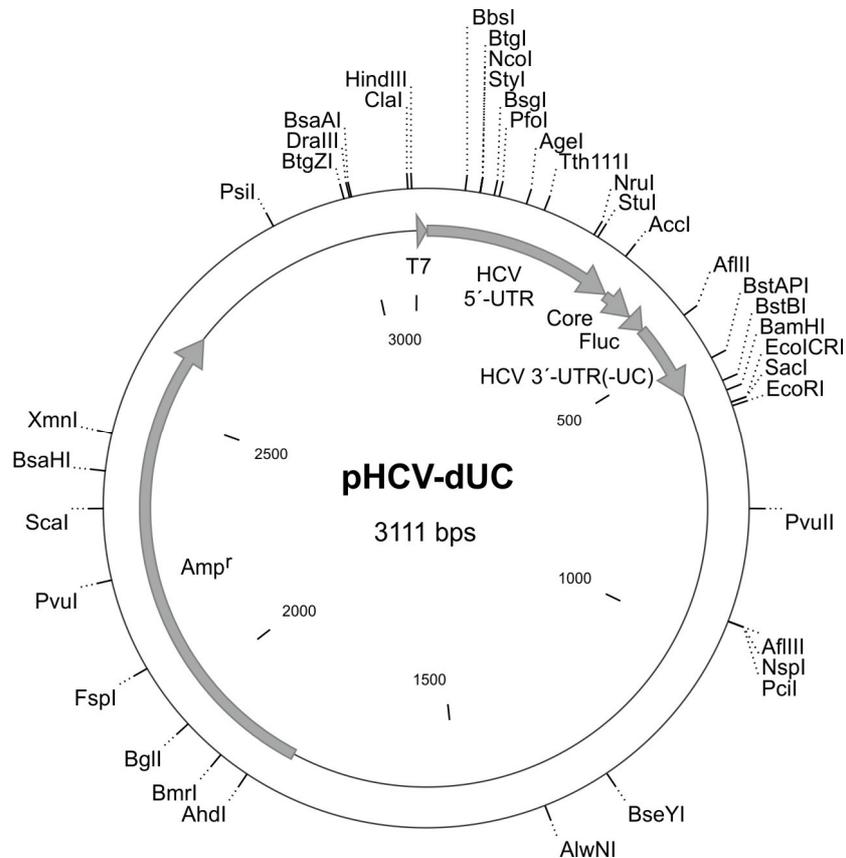
Plasmidbeschreibung

Region	Start [nt]	Ende [nt]
T7	1	18
HCV 5'-UTR	19	359
Core	360	420
FLuc	421	455
HCV 3'-UTR(-VR)	456	646
Amp ^r	1865	2725

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der HCV-Expressionskassette. Diese beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die 5'-untranslatierte Region des HCV (HCV-5'-UTR), ein Teil des Core-kodierenden Sequenzbereiches (Core), ein Teil der kodierenden Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (FLuc) und die 3'-untranslatierte Region des HCV ohne der Sequenz der Variablen Region (HCV 3'-UTR(-VR)).

Dieses Plasmid diente zur Herstellung der „dVR“-Matrize. Hierfür wurden die Primer „WT for“ und „HCV 3X rev“ verwendet. Des Weiteren wurde von diesem Plasmid die „dVRX“-Matrize generiert, bei der die Variablen Region und die drei Stem-loops fehlen. Dafür wurden die Primer „WT for“ und „3XA rev“ eingesetzt.

Organisation des Plasmids pHCV-dUC



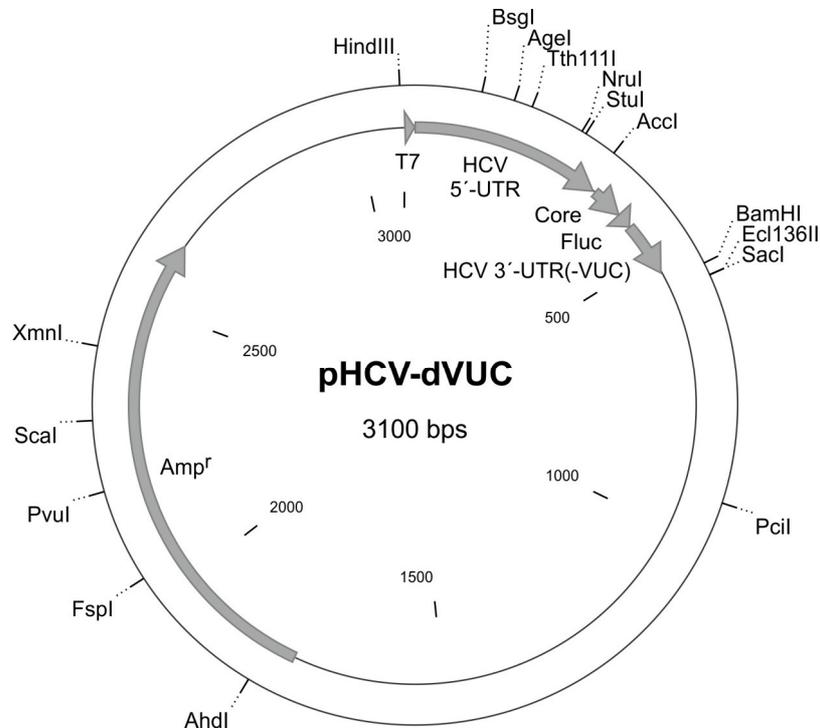
Plasmidbeschreibung

Region	Start [nt]	Ende [nt]
T7	1	18
HCV 5'-UTR	19	359
Core	360	420
FLuc	421	455
HCV 3'-UTR(-UC)	456	595
Amp ^r	1800	2660

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der HCV-Expressionskassette. Diese beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die 5'-untranslatierte Region des HCV (HCV-5'-UTR), ein Teil des Core-kodierenden Sequenzbereiches (Core), ein Teil der kodierenden Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (FLuc) und die 3'-untranslatierte Region des HCV ohne Poly(U/C)-Trakt (HCV 3'-UTR(-UC)).

Dieses Plasmid diente zur Herstellung der „dUC“-Matrize. Hierfür wurden die Primer „WT for“ und „HCV 3X rev“ verwendet.

Organisation des Plasmids pHCV-dVUC



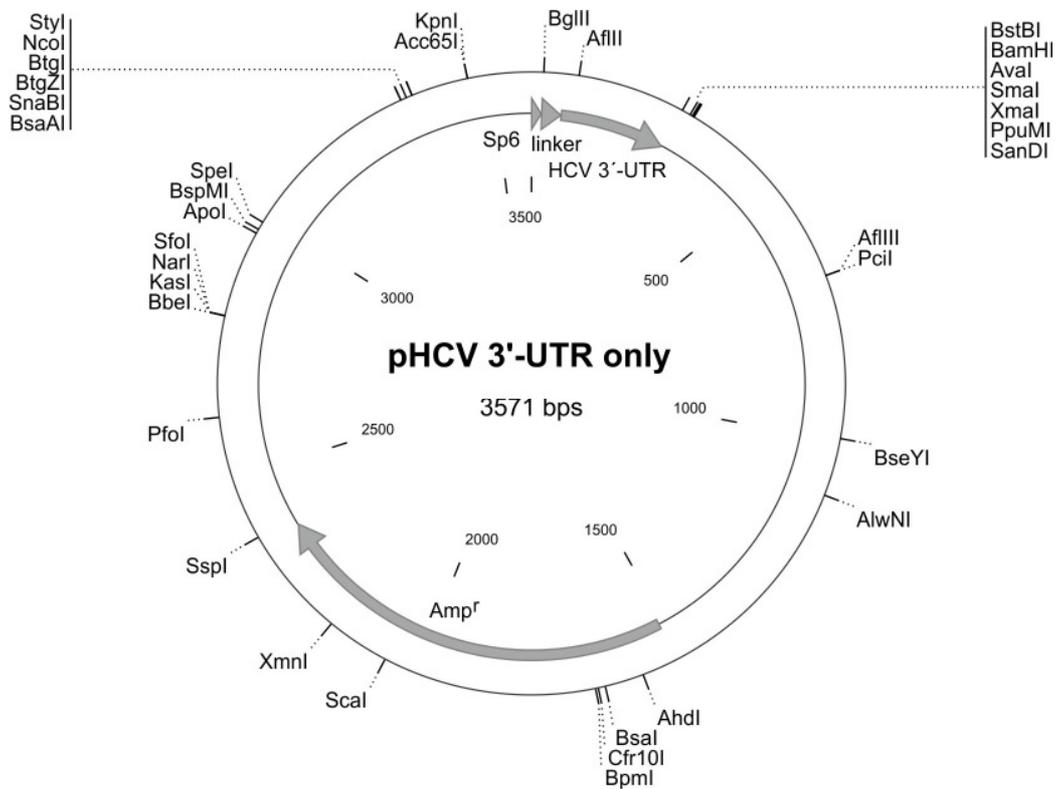
Plasmidbeschreibung

Region	Start [nt]	Ende [nt]
T7	1	18
HCV 5'-UTR	19	359
Core	360	420
FLuc	421	449
HCV 3'-UTR(-VUC)	450	548
Amp ^r	1767	2627

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der HCV-Expressionskassette. Diese beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die 5'-untranslatierte Region des HCV (HCV-5'-UTR), ein Teil des Core-kodierenden Sequenzbereiches (Core), ein Teil der kodierenden Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (Fluc) und die 3'-untranslatierte Region des HCV ohne die Sequenz der Variablen Region sowie des Poly(U/C)-Trakts (HCV 3'-UTR(-VUC)).

Dieses Plasmid diente zum einen zur Herstellung der „dVUC“-Matrize. Hierfür wurden die Primer „WT for“ und „HCV 3X rev“ verwendet.

Organisation des Plasmids pHCV 3'-UTR only



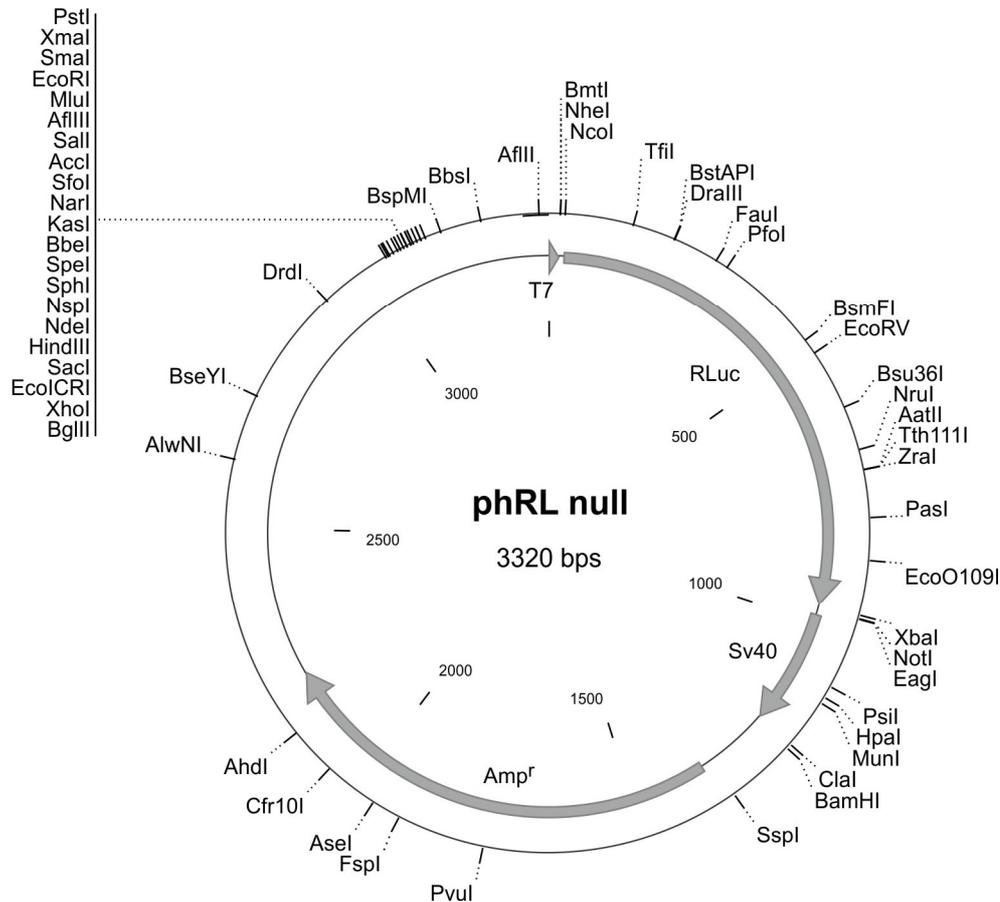
Plasmidbeschreibung

Region	Start [nt]	Ende [nt]
Sp6	1	21
Linker	22	62
HCV 3'-UTR	63	283
Amp ^r	1510	2370

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis stellen die Pfeile die Bestandteile des Reporter-Konstrukts dar. Dieses Reporter-Konstrukt beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen Sp6 (Sp6). Danach folgt ein kurzer Linker einer unspezifischen Sequenz gefolgt von der 3'-UTR-Region des HCV (HCV-3'-UTR).

Dieses Plasmid diente zur Herstellung der „3'-UTR only“-Matrize. Hierfür wurden die Primer „3'-UTR only for“ und „HCV 3X rev“ verwendet.

Organisation des Plasmids phRL null



Plasmidbeschreibung

Region	Start [nt]	Ende [nt]
T7	1	18
RLuc	29	964
SV40	986	1207
Amp ^r	3141	3277

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfachen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der HCV-Expressionskassette. Diese beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die Sequenz für das *Renilla*-Luziferase-Protein (RLuc). Daran schließen die SV40-Polyadenylierungssignale (SV40) an, die eine effiziente Expression in der Zellkultur gewährleisten sollen, wenn direkt das Plasmid transfiziert wird.

Dieses Plasmid diente zur Herstellung der „phRL null“-Matrize, die als RNA-Transkript für alle Transfektionsversuche als Co-Reporter eingesetzt wurde. Dafür wurde das Plasmid mit XbaI hinter der RLuc-Sequenz geschnitten und mittels Poly(A)-Polymerase polyadenyliert.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikationen:

Fehr C, Conrad KD, Niepmann M. Hepatitis C Virus RNA translation stimulation correlates with expression of microRNA-122 and Argonaute protein during cell cycle. *Eingereicht zur Veröffentlichung.*

Bung C¹, Fehr C¹, Goergen D, Hirnet J, Niepmann M. Normalization of translation readouts after transfection of cells: the urgent need for an independent method monitoring transfection efficiency.

(¹ gleichberechtigte Erstautorenschaft)

Eingereicht zur Veröffentlichung.

Henke JI¹, Goergen D¹, 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

(¹ gleichberechtigte Erstautorenschaft)

Kongressbeiträge:

Henke JI , 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, 19th Annual Meeting of the Society for Virology, Leipzig, März 2009*

Goergen D, Henke JI, 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, 19th Annual Meeting of the Society for Virology, Leipzig, März 2009

Fehr C, Mauter P, Bravo I, Nicklas W. Molecular Comparison of mouse parvovirus strains from different outbreaks and serological cross-reactivity between virus strains. *Poster, 10th FELASA Symposium, Villa Erba (Italien), Juni 2007*

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben und mich während dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Albrecht Bindereif für die Übernahme der Betreuung im Fachbereich Biologie und Chemie der JLU Gießen und seine freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Michael Niepmann möchte ich besonders für die Betreuung meiner Arbeit, die anregenden Diskussionen über meine Projekte, seine stetige Ansprechbarkeit und die Begleitung bei der Entstehung dieser Arbeit danken.

Natürlich auch ein herzliches Dankeschön an meine (Ex-)Kolleginnen Dres. Christiane Jünemann, Dagmar Goergen, Juliane Hirnet und Jura Henke für die vielen Gespräche, die stetige Hilfsbereitschaft und die tolle Arbeitsatmosphäre. Mein ganz besonderer Dank gilt Christiane Bung, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und auf die ich stets zählen konnte. Auch möchte ich mich bei Dominik Conrad bedanken, der oft mit mir über die Arbeit diskutiert hat und mich durch kleine ergänzende Versuche zum Ende meiner Arbeit hin unterstützt hat.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei den ehemaligen Mitgliedern der AG Beck (Prof. Ewald Beck, Ralf Füllkrug und Barbara Preiss) bedanken.

Aber am meisten danke ich meinen Eltern, die mich bei Allem unterstützen und immerzu an mich geglaubt haben. Ihr wart und seid immer für mich da. Dafür danke ich Euch!

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, Mai 2011

Carmen Fehr