



**Analyse der Interaktion von  
microRNA-122-Protein-Komplexen mit der  
NS5B-kodierenden Region und der  
3'-untranslatierten Region der  
Hepatitis C Virus-RNA**

**Inauguraldissertation**

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

vorgelegt von

**Nadia Dünnes**

Diplom-Biologin

**Giessen, Juli 2016**

---

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2013 bis April 2016 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Niepmann im Biochemischen Institut des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen angefertigt.

Die Promotion wurde durch die DFG-International Research Training Group 1384 "Enzymes and Multienzyme Complexes acting on Nucleic Acids" gefördert.

Erstgutachter: **Prof. Dr. Peter Friedhoff**  
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

Das Hepatitis C Virus besitzt ein einzelsträngiges, positiv orientiertes RNA-Genom und ist der Familie der *Flaviviridae* zugeordnet. Aufgrund der positiven Orientierung kann das Genom nach der Infektion von Hepatozyten direkt dem Translationsapparat der Zelle zur Verfügung gestellt werden. Das 9600 Nukleotide umfassende Genom besitzt einen offenen Leserahmen (ORF), welcher für ein einziges Polyprotein kodiert. Nach erfolgter co- und posttranslationaler Prozessierung entstehen die reifen Genprodukte. Flankiert wird der ORF von zwei untranslatierten Regionen (UTRs), der 5'- und der 3'-UTR, welche die *cis*-Signale für die Translation und Replikation der viralen RNA beinhalten. Die 5'-UTR bildet eine hochkonservierte Sekundärstruktur aus, die sogenannte interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES), welche eine cap-unabhängige Translation ermöglicht. Weiterhin besitzt die HCV-RNA verschiedene Erkennungssequenzen für die leberspezifische microRNA-122 (miR-122). Zwei dieser hochkonservierten Sequenzen befinden sich in der 5'-UTR, welche durch eine Adressierung der miR-122, gebunden an das Argonaute2-Protein (Ago2), zu einer Verstärkung der RNA-Replikation und Translation so wie zu einer Stabilisierung der RNA führt. Eine weitere miR-122-Bindungsstelle befindet sich in der variablen Region der 3'-UTR, von der berichtet wird, dass eine miR-122-Bindung keinen Einfluss auf die Translation hat. Außerdem befinden sich noch zwei hochkonservierte Erkennungssequenzen in der Nicht-Struktur-Protein 5B (NS5B)-kodierenden Region des HCV-Genoms.

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Interaktion von miR-122/Ago2-Komplexen mit der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR der Hepatitis C Virus-RNA. Es konnte durch co-Immunopräzipitationen gezeigt werden, dass der miR-122/Ago2-Komplex an die drei Erkennungssequenzen in der NS5B-Region und der 3'-UTR hybridisiert. Die Stärke der Bindung hängt jedoch sowohl vom verwendeten Genotypen ab, als auch davon, wie zugänglich die jeweilige Erkennungssequenz für den Komplex vorliegt. Zusätzlich konnte noch die in der Arbeitsgruppe Niepmann aufgestellte Theorie, dass eine Bindung der miR-122 an ihre *seed-target*-Sequenz in der 3'-UTR der HCV-RNA nur in Kombination mit einer zusätzlichen 4 Nukleotide langen Sequenz (*supplemental*-Region) möglich ist, widerlegt werden. Für eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die 3'-UTR genügt die *seed-target* Sequenz. Außerdem konnte die Bindung durch das Einbringen von Mutationen in allen drei Erkennungssequenzen unterbunden werden. Des Weiteren konnte durch die Verwendung von HCV-Reporter-Konstrukten gezeigt werden, dass die Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die 3'-UTR zu einer Reduktion der Translation führt, dies jedoch nur in Kombination mit einer miR-122-Bindung an die 5'-UTR. Diese Ergebnisse sind Voraussetzung für die weitergehende Untersuchung der Rolle dieser miR-122-Bindungsstellen im HCV-Replikationszyklus.

## Summary

The Hepatitis C Virus has a positive-sense single-stranded RNA genome and belongs to the family of *Flaviviridae*. Due to the positive orientation of its genome, the virus RNA can be translated directly after infecting hepatocytes. The 9600 nucleotides long HCV genome contains a single open reading frame (ORF) encoding one polyprotein that is processed to yield the mature proteins. The ORF is flanked by two untranslated regions (UTRs), the 5'- and 3'-UTR, containing *cis*-signals for translation and replication of the viral RNA. At the 5'-end a highly structured region forms an internal ribosome entry site (IRES) for cap-independent translation initiation. Moreover, the HCV RNA has various target sequences for the liver-specific microRNA-122 (miR-122). Two highly conserved sequences are located in the 5'-UTR. Binding of miR-122 and its associated argonaute2 protein (Ago2) to these regions leads to an increase in RNA replication, translation and stabilisation. Another miR-122 binding site is located in the variable region of the 3'-UTR, which had been proposed to have no influence on HCV translation. Furthermore, two highly conserved binding sites are found in the nonstructural protein 5B (NS5B) coding region of the HCV genome.

The aim of this study was the analysis of the interaction of the miR-122/Ago2 complex with the NS5B coding region as well as with the 3'-UTR of the HCV RNA. According to co-immunoprecipitation experiments, the miR-122/Ago2 complex binds to all three sites with different strength, depending on genotype and structural accessibility. Moreover, the theory by the Niepmann group that four additional nucleotides (supplemental region) are required for a correct binding of miR-122 to its seed-target sequence in the 3'-UTR is disproved. In contrast, the seed-target sequence is sufficient for the hybridisation of the miR-122/Ago2 complex to the 3'-UTR. Mutations in all three miR-122 sites resulted in the inhibition of any miR-122 binding to these regions. Furthermore, experiments with HCV reporter constructs show decreased translation efficiency caused by the hybridisation of the miR-122/Ago2 complex to the 3'-UTR only when miR-122 was additionally binding to the 5'-UTR. These results are the requirement for further experiments to examine the HCV replication cycle in full length HCV RNA experiments.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>I</b>
<b>Summary</b>	<b>II</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Hepatitis C Virus</b>	<b>1</b>
1.1.1 Struktur und Genom von HCV	2
1.1.1.1 Die HCV-5'-UTR	4
1.1.1.2 Die HCV-3'-UTR	6
1.1.2 Vermehrungszyklus des HCV	6
<b>1.2 Molekulare Mechanismen der Translation</b>	<b>8</b>
1.2.1 Cap-abhängige Initiation der Translation	8
1.2.2 IRES-abhängige Initiation der Translation	10
1.2.3 IRES- <i>trans</i> -aktivierende Faktoren	12
<b>1.3 microRNAs</b>	<b>14</b>
1.3.1 Biogenese der miRNA	14
1.3.2 miRNA-122	16
1.3.3 Effekt von miR-122 auf HCV	17
<b>1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>2 Ergebnisse</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Hoch konservierte miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR von HCV</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Untersuchung der Bindung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA</b>	<b>25</b>
2.2.1 Nachweis einer miR-122/Ago2-Hybridisierung an die Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR	25
2.2.1.1 Primäre Bindungsstudien mittels co-IP	26
2.2.1.2 Generierung neuer Primerpaare	30
2.2.1.3 co-IPs auf Basis der mit ViennaRNAfold vorhergesagten RNA-Strukturen	32
2.2.1.4 Optimierte Primer für die Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region	34
2.2.2 Zugänglichkeit der Bindungsstellen des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA	36
2.2.2.1 Bindungsstärke der miR-122 an die HCV-RNA	37
2.2.2.2 Korrelation der Zugänglichkeit der Kern-Sequenz der miR-122 mit der Bindungsstärke	39
2.2.2.3 Zugänglichkeit eines Adenosins korreliert mit der Bindungsstärke	40
2.2.2.4 Abhängigkeit der Bindung vom verwendeten HCV-Isolat	41
<b>2.3 Einfluss einer Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA</b>	<b>42</b>
2.3.1 Generieren von Mutationen in den miR-122-Bindungsstellen	43
2.3.2 Überprüfung der Mutationen mittels co-IP	45
2.3.3 Bindung verschieden mutierter miR-122 an die mutierte HCV-RNA	47
2.3.4 Bindung verschieden mutierter miR-122 an die Wildtyp-miR-122-Bindungsstellen der HCV-RNA	51

2.3.5	Einfluss der miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR auf die Translation der HCV-Proteine	52
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
<b>3.1</b>	<b>Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR des HCV-Genoms</b>	<b>59</b>
3.1.1	Die Stärke der Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA ist abhängig von der Zugänglichkeit der Bindungsstellen und ihrer flankierenden Sequenzen	60
3.1.2	Die Kern-Sequenz spielt keine spezielle Rolle bei der initialen Phase einer miR-122-Bindung an die Bindungsstelle in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR	62
3.1.3	Die Zugänglichkeit eines Adenosins verstärkt die Bindung des miR-122/Ago2-Komplexes an schwer zugängliche miR-122-Bindungsstellen	63
3.1.4	Die Auswirkung der Zugänglichkeit der miR-122-Bindungsstelle auf die Bindungsstärke hängt vom HCV-Isolat ab	65
<b>3.2</b>	<b>Einfluss einer miR-122/Ago2-Bindung auf HCV</b>	<b>66</b>
3.2.1	Die <i>supplemental</i> -Region hat keinen bedeutenden Einfluss auf die Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA	66
3.2.2	Die Nutzung der verschieden mutierten miR-122 in einem Konstrukt ist nur bedingt möglich	68
3.2.3	Die Bindung der miR-122 an die Bindungsstelle in der 3'-UTR hat einen inhibierenden Effekt auf die Translation	70
3.2.4	Weiterführende Versuche	72
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>73</b>
<b>4.1</b>	<b>Material</b>	<b>73</b>
4.1.1	Zelllinien	73
4.1.2	Bakterien	73
4.1.3	Puffer	73
4.1.3.1	Kulturmedien und Puffer	73
4.1.3.2	Gel Puffer	75
4.1.3.3	Nukleinsäure Probenpuffer	75
4.1.3.4	co-IP-Puffer	76
4.1.3.5	SDS-PAGE Puffer	76
4.1.3.6	Western Blot Puffer	77
4.1.3.7	Elektroporationspuffer	78
4.1.4	Kits	79
4.1.5	Größenmarker	79
4.1.6	Antikörper und Magnetpartikel	79
4.1.7	Nukleotide	80
4.1.8	Plasmide	80
4.1.9	Oligonukleotide	82
4.1.9.1	DNA-Oligonukleotide	82
4.1.9.2	RNA-Oligonukleotide	84
4.1.10	Enzyme	84

---

4.1.11 Verbrauchsmaterialien _____	85
4.1.12 Chemikalien _____	85
4.1.13 Geräte _____	87
<b>4.2 Methoden _____</b>	<b>89</b>
4.2.1 Mikrobiologische Methoden _____	89
4.2.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien _____	89
4.2.1.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ und Top 10F' _____	89
4.2.1.3 Übernachtskultur im kleinen Maßstab _____	89
4.2.1.4 Übernachtskultur im großen Maßstab _____	89
4.2.1.5 Transformation von Plasmiden in chemisch-kompetente Bakterien _____	90
4.2.2 Zellkultur _____	90
4.2.2.1 Auftauen eukaryotischer Zellen _____	90
4.2.2.2 Einfrieren eukaryotischer Zellen _____	90
4.2.2.3 Kultivierung adhärenter eukaryotischer Zellen _____	91
4.2.2.4 Passagieren und Aussäen adhärenter eukaryotischer Zellen _____	91
4.2.2.5 Zählen eukaryotischer Zellen _____	91
4.2.2.6 Transfektion eukaryotischer Zellen _____	92
4.2.2.6.1 Lipofectamine 2000 _____	92
4.2.2.6.2 Elektroporation _____	92
4.2.3 Molekularbiologische Methoden _____	92
4.2.3.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> Zellen (Mini-bzw. Maxipräparationen) _____	92
4.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) _____	93
4.2.3.2.1 Standard-PCR _____	93
4.2.3.2.2 <i>In vitro</i> -Mutagenese-PCR _____	94
4.2.3.3 Gelelektrophorese _____	95
4.2.3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese _____	95
4.2.3.3.2 Reinigung von DNA bzw. RNA über präparative Agarosegele _____	95
4.2.3.3.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese _____	95
4.2.3.4 Konzentrationsbestimmung mittels Qubit® _____	96
4.2.3.5 Sequenzierung von Plasmid-DNA _____	97
4.2.3.6 Proteinase K-Verdau _____	97
4.2.3.7 Phenol-Chloroform-Extraktion _____	97
4.2.3.8 Ethanol-Präzipitation _____	97
4.2.3.9 DNase I-Verdau _____	98
4.2.3.10 Restriktionsverdau _____	98
4.2.3.11 Ligation von DNA-Molekülen _____	98
4.2.3.12 Dephosphorylierung von Plasmiden _____	98
4.2.3.13 <i>In vitro</i> -Transkription _____	99
4.2.3.14 <i>In vitro</i> -Transkription radioaktiv-markierter RNA _____	99
4.2.3.15 RNA-Reinigung _____	100
4.2.3.16 Synthese von RNA mit 5'-Cap-Nukleotide _____	100
4.2.3.17 Präparation von duplex-microRNAs _____	100
4.2.4 Proteinbiochemische Methode _____	100
4.2.4.1 Argonaute-Protein spezifische RNA co-Immunopräzipitation (co-IP) _____	100
4.2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) _____	102
4.2.4.3 Western Blot _____	103

---

---

4.2.4.4	Nachweis der Translationseffizienz (Luciferase-Assay)	103
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>118</b>
<b>6.1</b>	<b>Alignments</b>	<b>118</b>
6.1.1	Sequenz- <i>Alignment</i> miR-122-Bindungsstelle 5B.2	118
6.1.2	Sequenz- <i>Alignment</i> miR-122-Bindungsstelle 5B.3	120
6.1.3	Aminosäure- <i>Alignment</i> miR-122-Bindungsstelle 5B.2	122
6.1.4	Aminosäure- <i>Alignment</i> miR-122-Bindungsstelle 5B.3	124
6.1.5	Sequenz- <i>Alignment</i> miR-122- Bindungsstelle S3	126
<b>6.2</b>	<b>HCV-RNA-Sequenzen der Bindungsexperiment</b>	<b>128</b>
6.2.1	HCV-RNA-Sequenzen miR-122-Bindungsstelle 5B.2	128
6.2.2	HCV-RNA-Sequenzen miR-122-Bindungsstelle 5B.3	129
6.2.3	HCV-RNA-Sequenzen miR-122-Bindungsstelle S3	130
<b>6.3</b>	<b>HCV-RNA-Strukturen der Bindungsexperimente</b>	<b>132</b>
6.3.1	HCV-RNA-Strukturen miR-122-Bindungsstelle 5B.2	133
6.3.2	HCV-RNA-Strukturen miR-122-Bindungsstelle 5B.3	139
6.3.3	HCV-RNA-Strukturen miR-122-Bindungsstellen S3	143
<b>6.4</b>	<b>Plasmidkarten</b>	<b>147</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>153</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>156</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>158</b>
	<b>Wissenschaftliche Veröffentlichungen</b>	<b>159</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>162</b>
	<b>Eidesstaatliche Erklärung</b>	<b>163</b>

---

# 1 Einleitung

Als Begründer der modernen Virologie gilt Dimitri I. Iwanowski (1864–1920), welcher 1892 durch die Erkenntnis der Ultrafiltrierbarkeit des Tabakmosaikvirus erstmals zwischen Bakterien und Viren unterschied und so den Begriff des Virus prägte.

Viren (*virus*, lateinisch: Gift) sind infektiöse Partikel, welche ihre Erbinformation in Form von DNA oder RNA in einer Proteinhülle, dem sogenannten Kapsid, verpacken. Bei einigen Viren wird diese Proteinhülle zusätzlich von einer äußeren Lipidmembran umhüllt, die sowohl virale als auch zelluläre Glykoproteine beinhalten kann. Da sie keinen eigenen Stoffwechsel besitzen, sind sie für ihre Vermehrung auf eine lebende Wirtszelle angewiesen. Ist das Virus in die Wirtszelle eingedrungen, beeinflusst es den Zellstoffwechsel dahingehend, neue viruseigene Komponenten zu synthetisieren. Diese werden anschließend zusammengebaut und als reife, infektiöse Viruspartikel (Virionen) freigesetzt.

Viren infizieren Menschen, Tiere, Pflanzen und Bakterien (Bakteriophagen). Die Virusbindung an die jeweilige Wirtszelle ist dabei sehr stark von spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche abhängig. Viren werden zunächst nach dem sogenannten Baltimore-Schema in einzel- oder doppelsträngige DNA- bzw. RNA-Viren unterteilt, wobei einzelsträngige RNA-Viren zusätzlich nach der Orientierung ihres Genoms in positiv oder negativ untergliedert werden. Als weiteres Unterscheidungsmerkmal dienen auch morphologische Merkmale, wie das Vorhandensein oder Fehlen einer Hülle.

Bis vor einigen Jahren konnte allgemein festgehalten werden, dass Viren mit einem Durchmesser von 20–400 nm um ein vielfaches kleiner als Bakterien und im Lichtmikroskop nicht zu erkennen sind. Im Jahr 2013 wurden jedoch von einem internationalen Forscherteam [1] sogenannte Pandoraviren entdeckt. Mit einem Durchmesser von knapp 1 µm und einer Genomgröße von mehreren Megabasen sind sie größer als einige Bakterien. Ebenfalls überraschend war, dass etwa 93 % der Gene völlig fremdartig sind und sich auf keinen derzeit bekannten Zellstammbaum zurückführen lassen.

## 1.1 Das Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus (HCV) wurde zunächst als Auslöser der non-A, non-B Hepatitis betrachtet, da es zwar die Leber befällt, jedoch nicht mit den bis dahin üblichen Nachweismethoden für Hepatitis identifiziert werden konnte. Erst 1989 [2] gelang durch molekulare Untersuchungen die Zuordnung in die Familie der *Flaviviridae*. Dabei handelt es sich um Viren mit einem Positivstrang-RNA-Genom, welche von einer zellulären Membran umhüllt sind. Die Familie der *Flaviviridae* unterteilt sich in vier Genera: *Flavivirus* mit dem der Familie namensgebendem Gelbfiebervirus (*flavus*, lateinisch: gelb), *Pestivirus*, *Pegivirus* [3] und als vierte Gattung die *Hepaciviren*, welcher das HCV und das kürzlich

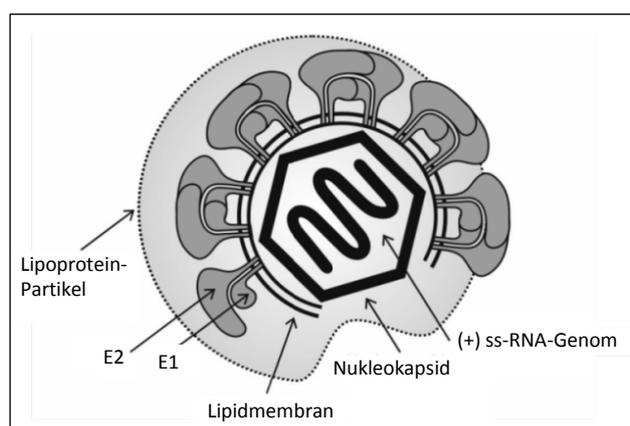
entdeckte GBV-B [4] zugeordnet sind [5]. Aufgrund der hohen Variabilität der Viren konnten in den vergangenen Jahren 7 Genotypen identifiziert werden, welche sich weiter in 67 Subtypen unterteilen lassen [6]. Die am häufigsten vorkommenden Genotypen sind 1–3, die Genotypen 4–6 kommen geographisch nur sehr begrenzt vor [7; 8; 9].

Trotz seiner hohen Variabilität infiziert HCV ausschließlich Menschen und Schimpansen, wobei der Mensch den einzigen natürlichen Wirt darstellt. Der häufigste Übertragungsweg erfolgt über den Gebrauch von kontaminierten Injektionsnadeln, aber auch über Bluttransfusion oder sexuelle Infektion. Laut Weltgesundheitsorganisation (engl.: *World Health Organisation*; WHO) sind 3 % [10] der Weltbevölkerung infiziert. Trotz des meist asymptomatischen Verlaufs einer akuten Infektion kommt es bei rund 80 % der Infizierten zur Ausbildung einer chronischen Erkrankung. Im Laufe der Jahre entwickeln sich bei 25 % dieser Patienten eine Leberzirrhose oder es kommt zur Bildung eines Karzinoms [11], weshalb diese Krankheit etwa 500.000 Tote pro Jahr fordert.

Es ist zwar derzeit keine Impfung möglich, jedoch gibt es inzwischen gute Therapieformen. Je nach Genotyp kann jeder Patient individuell mit einer Kombinationstherapie der existierenden Medikamente eingestellt werden. Die momentan zugelassenen Medikamente lassen sich in verschiedene Wirkgruppen einteilen: konventionelle Substanzen, wozu die zur Ersttherapie bekannten Medikamente Interferon und Ribavirin gehören, Proteaseinhibitoren, NS5A-Inhibitoren, nicht-nukleosidische Polymerase (NS5B)-Inhibitoren und nukleo(s/t)idische Polymerase (NS5B)-Inhibitoren [12].

### 1.1.1 Struktur und Genom von HCV

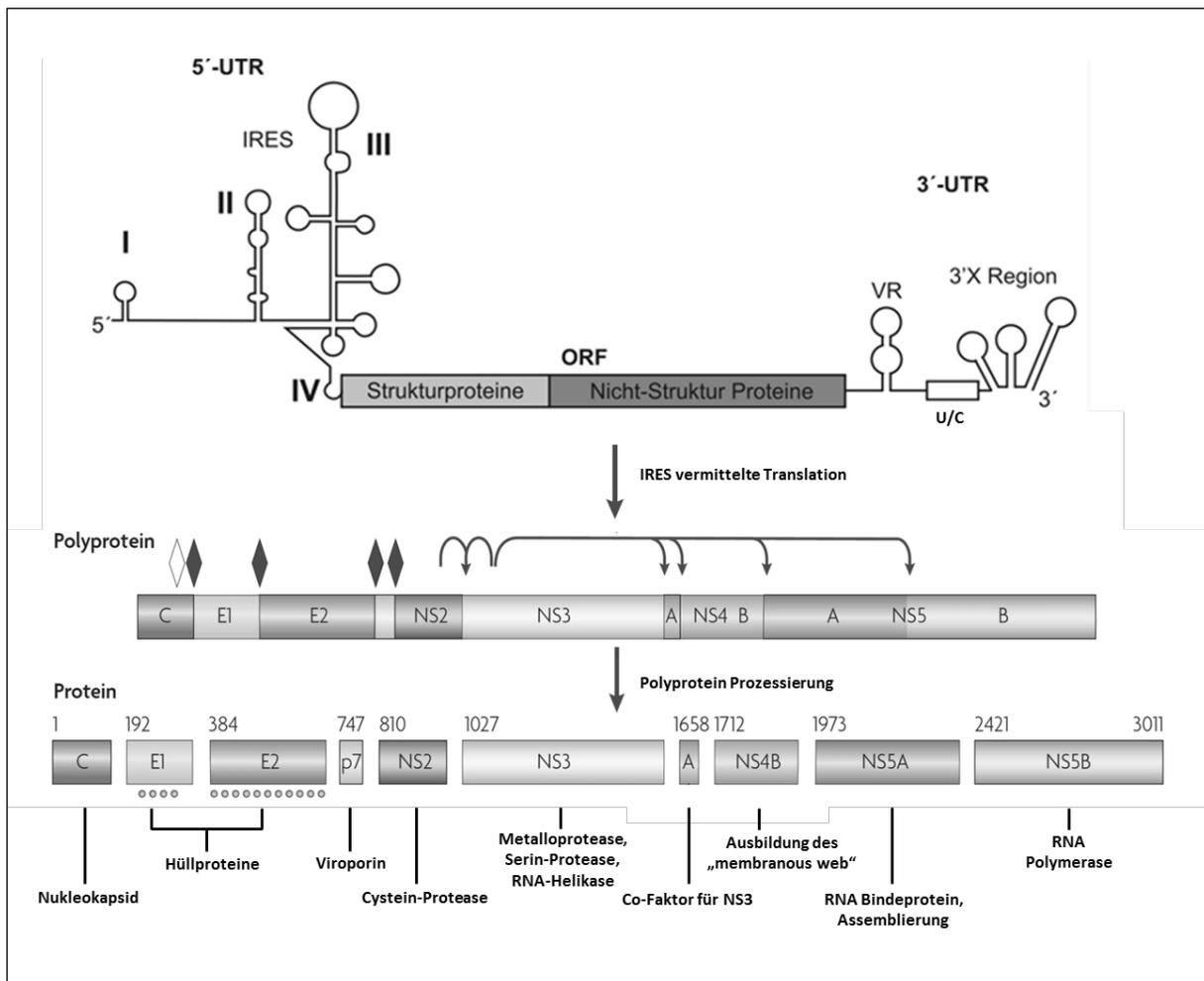
HCV hat einen Durchmesser von ca. 80 nm [13]. Es besitzt ein einzelsträngiges, positiv orientiertes, 9600 Nukleotide großes RNA-Genom, welches von einem Nukleokapsid aus viruskodierten Core-Proteinen umgeben ist [14]. Das Nukleokapsid wird von einer der Wirtszelle stammenden Lipidmembran umhüllt, in die die viralen Oberflächenproteine E1 und E2 (E = *Envelope*; dt.: Hülle) verankert sind. Die nativen, infektiösen Virenpartikel sind häufig mit Lipoproteinen assoziiert [15; 16; 17], welche das Anheften an die Wirtszelle erleichtern [18] (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Modell des Hepatitis C Viruspartikels**

Das einzelsträngige (engl.: *single strand*; ss) RNA-Genom wird von einem Nukleokapsid aus Core-Proteinen umgeben. Das Nukleokapsid wird umhüllt von einer Lipidmembran in welcher die Glykoproteine, E1 und E2 verankert sind. Die viralen Partikel werden von Lipoproteinpartikeln umgeben (modifiziert nach [19]).

Aufgrund der positiven Orientierung des HCV-Genoms kann es, wie eine zelluläre mRNA, direkt dem Translationsapparat der Zelle zur Verfügung gestellt werden. Das 9600 Nukleotide lange Genom hat einen offenen Leserahmen (engl.: *open reading frame*, ORF), welcher für ein einziges Polyprotein kodiert. Durch dessen co- und posttranslationale Prozessierung entstehen die jeweiligen Struktur- und Nicht-Struktur (NS)-Proteine. Flankiert wird das Genom von zwei nicht-kodierenden Regionen (engl.: *untranslated region*, UTR), der 5'-UTR und 3'-UTR, welche die *cis*-Signale für die Translation und Replikation der viralen RNA beinhalten [19; 20; 21; 22]. Abbildung 1.2 zeigt die schematische Darstellung des HCV-Genoms mit seinem prozessierten Polyprotein.



**Abbildung 1.2: Schema des HCV-Genoms**

Das HCV-Genom besteht aus 9600 Nukleotiden, welche einen offenen Leserahmen (ORF) bilden, durch den ein einziges Polyprotein kodiert wird. Flankiert wird es von zwei nicht-kodierenden Regionen (UTR), der 5'-und 3'-UTR. Die 5'-UTR beinhaltet die IRES, welche eine cap-unabhängige Translation ermöglicht. Die 3'-UTR besteht aus einer variablen Region (VR), einem Poly(U/C)-Trakt und der 3'X-Region. Durch die co- und posttranslationale Prozessierung des Polyproteins werden die jeweiligen Strukturproteine Core, E1 und E2 und die Nicht-Struktur-Proteine (p7, NS2–5) gebildet. Aminosäure-Nummern sind oberhalb der Proteine angegeben. Die Pfeile indizieren die Spaltung durch die HCV NS2–3 und NS3–4 Proteasen; schwarze Rauten stellen Spaltungsstellen für Signalpeptidasen des Endoplasmatischen Retikulum dar und die weiße Raute zeigt die C-terminale Prozessierung des Core-Proteins durch eine Signal-Peptid-Peptidase. Die Kreise unterhalb von E1 und E2 weisen auf die Glykosilierung der *Envelope*-Proteine hin. Die Funktionen der einzelnen Proteine sind aufgelistet (modifiziert nach [21]).

Wie bereits oben erwähnt kodiert der ORF für ein einziges Polyprotein, welches im Ganzen translatiert und anschließend am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) proteolytisch in 10 virale Proteine gespalten wird. Die Proteine lassen sich in Struktur- und NS-Proteine unterteilen. Die Strukturproteine werden durch Signalpeptidasen des ER in das Core-Protein und die beiden Oberflächenproteine E1 und E2 gegliedert. Das Core-Protein hat eine molare Masse von 21 kDa und bildet durch die Interaktion mit der viralen RNA das Nukleokapsid [23]. Außerdem scheint es durch die Assoziation mit sogenannten *lipid droplets* eine Rolle bei der Replikation der HCV-RNA und der Morphogenese infektiöser Viruspartikel zu spielen [24]. Die Hüllproteine E1 und E2 sind stark glykosylierte Transmembranproteine, welche Heterodimere bilden und Bestandteile der HCV-Hülle darstellen [25]. Trotz der Ähnlichkeit der Proteine übernehmen sie bei der Virusentstehung doch sehr unterschiedliche Aufgaben. Während E2 für die Anheftung des Virus an die Wirtszelle verantwortlich ist, spielt E1 eine Rolle bei der Absorption und Freisetzung der viralen RNA [26; 27].

Zu den NS-Proteinen gehören: p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Das integrale Membranprotein p7 wird der Familie der Viroporine zugeordnet und scheint die Funktion eines Kalzium-Ionenkanals zu erfüllen [28; 29; 30]. Die weiteren NS-Proteine werden durch zwei virale Proteasen gespalten, die NS2-NS3 Autoprotease und die Serinprotease NS3. Erstere ist eine Zink-abhängige Metalloprotease, welche nur für die Spaltung zwischen NS2 und NS3 verantwortlich ist. Anschließend verliert sie ihre Aktivität und wird im Proteasom degradiert [31]. Die Serinprotease NS3 dahingegen ist zusammen mit ihrem Co-Faktor NS4A für alle weiteren Spaltungen des Polyproteins verantwortlich [32]. Zusätzlich besitzt sie an ihrem C-terminalen Ende eine Helikase- und NTPase-Aktivität, welche bei dem Entwinden der RNA während der Replikation wichtig ist [33]. NS4B ist ein integrales Membranprotein und wird für die Ausbildung des *membranous web* bei der Replikation benötigt [34; 35]. Das Phosphoprotein NS5A ist involviert in den Zusammenbau von Virionen und in die Bildung eines funktionellen Replikationskomplexes [36; 37]. NS5B ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase [38].

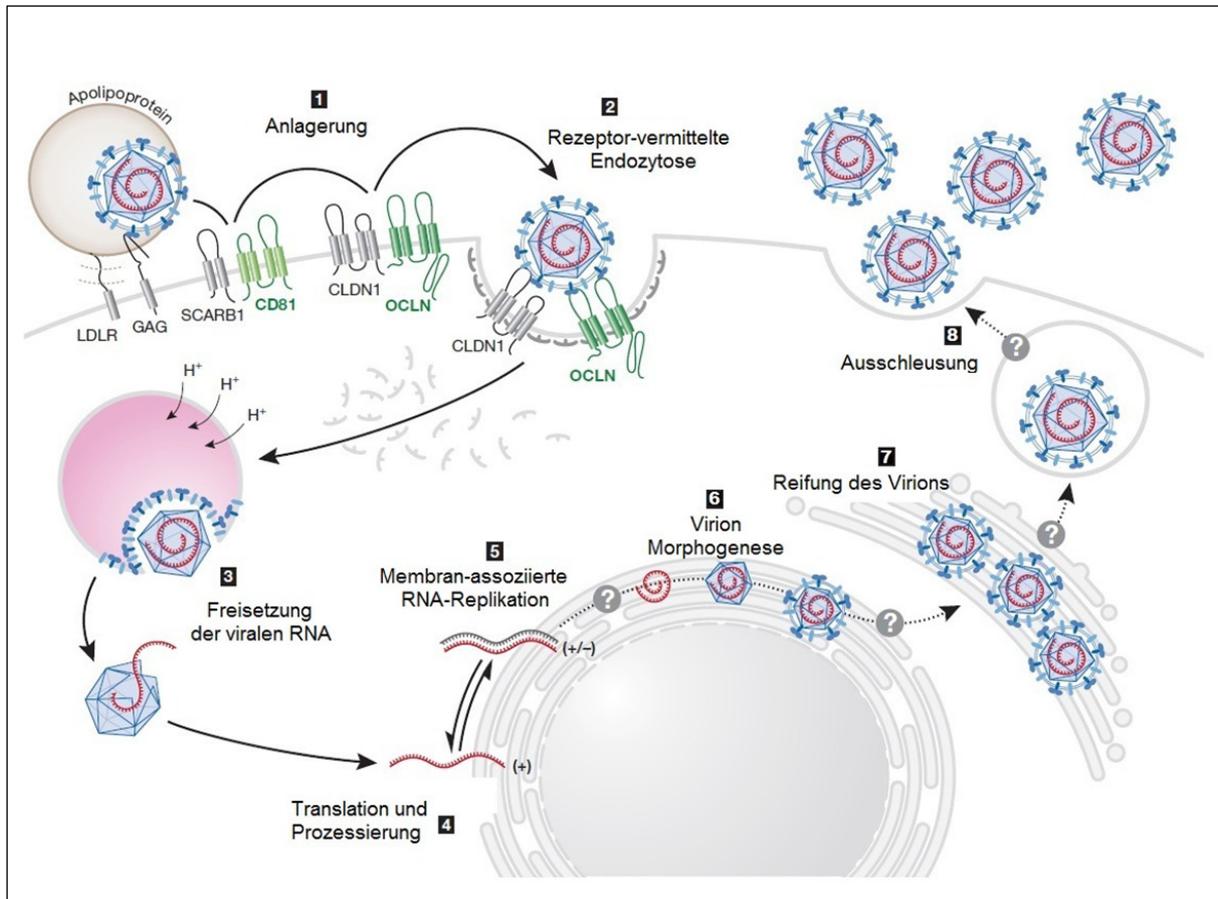
### 1.1.1.1 Die HCV-5'-UTR

Die 5'-UTR des HCV stellt eine hochkonservierte sekundäre Struktur dar, welche von vier Haarnadelstrukturen gebildet wird und in den meisten Isolaten eine Länge von 341 Nukleotiden aufweist [39]. Die Haarnadelstrukturen I und II spielen eine große Rolle bei der Replikation [40]. Die Bereiche II–IV, zusammen mit einem Teil der Core-kodierenden Region, bilden die sogenannte interne Ribosomeneintrittsstelle (engl.: *internal ribosome entry site*; IRES), welche eine Cap-unabhängige Translation des viralen Genoms ermöglicht [39; 41; 42; 43]. Ohne das Mitwirken eukaryotischer Initiationsfaktoren (eIF) kommt es zu einer direkten Bindung der 40S-Ribosomen-Untereinheit, wodurch sich ein stabiler Prä-Initiationskomplex ausbilden





hervorrufft. Dadurch kommt es zu einem Verschmelzen der HCV-Hüllmembran mit der zellulären Membran und das Virus wird aufgenommen [59; 60]. Dabei spielt die spezifische Wechselwirkung zwischen den viralen Hüllproteinen E1 und E2 und dem CD81-Rezeptor (Tetraspanin-Rezeptor) ebenfalls eine Rolle [61]. Der Vermehrungszyklus des HCV ist in Abbildung 1.6 dargestellt.



**Abbildung 1.6: Vermehrungszyklus von HCV**

Das mit Lipoproteinen assoziierte HCV erkennt spezifisch verschiedene Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle und lagert sich an diese an (1). Durch eine Rezeptor-vermittelte Endozytose (2) wird das Viruspartikel aufgenommen und die virale RNA in das Zytoplasma freigesetzt (3). Am rauen ER erfolgt die IRES-vermittelte Translation und Prozessierung des Polyproteins (4). Danach bilden sich am *membranous web* Replikationskomplexe aus und es kommt zur Amplifikation von negativ und positiv orientierten RNA-Strängen (5). Ebenfalls werden neue Virusbestandteile synthetisiert (6). Anschließend wird ein neues infektiöses Virus-Partikel zusammengesetzt (7) und über einen sekretorischen Weg aus der Wirtszelle ausgeschleust (8). CD: *cluster of differentiation* (dt.: Unterscheidungsgruppe); CLDN1: Claudin 1; GAG: Glycosaminoglycan; LDLR: *low-density lipoprotein-receptor*; OCLN: Occludin; SCARB1: Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1 (modifiziert nach [54]).

Das freigesetzte RNA-Genom kann aufgrund seiner positiven Orientierung direkt zur IRES-vermittelten Translation am zellulären rauen ER verwendet werden. Dabei nutzt es zur Synthese den zellulären Translationsapparat. Das synthetisierte Polyprotein wird co- und postranslational in die Struktur- und NS-Proteine prozessiert (Kapitel 1.1.1, Abbildung 1.2). Nach der Prozessierung kommt es zwischen den HCV-NS-Proteinen und Membranvesikeln des ER zur Ausbildung eines *membranous web*, welches den Bereich der Replikation darstellt [62]. Induziert wird die Bildung dieses Geflechts durch das Protein NS4B [34; 35; 63]. Bei der Replikation wird zunächst der

positiv-orientierte RNA-Einzelstrang als Matrize für die Synthese eines Einzelstrangs mit negativer Orientierung verwendet. Dieser wird anschließend wiederum als Vorlage für die Replikation von positiv-orientierten RNA-Einzelsträngen genutzt, welche neu translatiert, repliziert oder in Viren verpackt werden können. Das Schlüsselenzym für die Replikation neuer RNA-Genome ist die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (NS5B) [19; 64].

Auch heute ist der Prozess des Zusammenbaus und der Freisetzung infektiöser Viruspartikel nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl *lipid droplets* [65; 66] als auch der *endosomal-sorting complex required for transport* (ESCRT)-Weg [67; 68] eine entscheidende Rolle bei der Bildung von infektiösen Viruspartikeln darstellen. Die neu entstandenen Virionen werden nun in die Membran des ER über den sogenannten *budding*-Prozess aufgenommen und auf sekretorischem Weg freigesetzt [69].

## 1.2 Molekulare Mechanismen der Translation

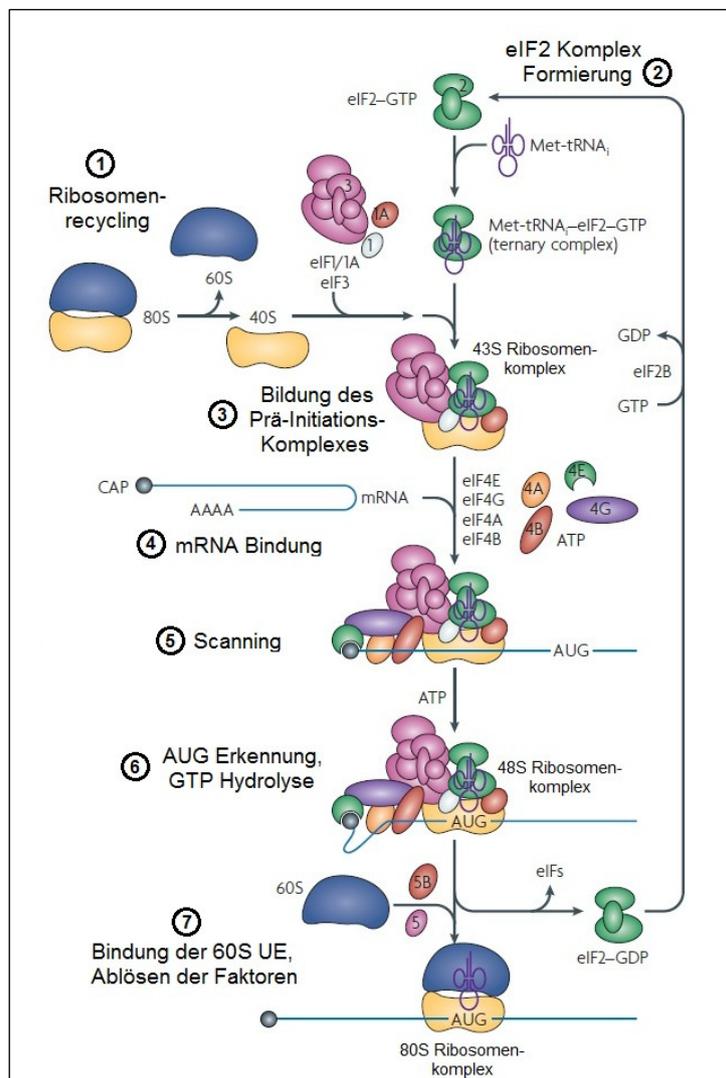
Die Translation von HCV wird nicht wie bei der eukaryotischen Translation über eine Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA initiiert, sondern wie bei vielen anderen Positivstrang-Viren durch eine hoch konservierte sekundäre Struktur, die IRES. Dadurch kommt es im Vergleich zu einer Cap-abhängigen Translation zur Ausbildung eines vollkommen anderen Initiationskomplexes, welcher im Detail in den nachfolgenden Kapiteln näher beschrieben wird.

### 1.2.1 Cap-abhängige Initiation der Translation

Die Cap-Struktur der eukaryotischen mRNAs befindet sich an deren 5'-Ende und wird durch eine 5'-5'-Triphosphatbindung des Cap-Nukleotides (7-methyl Guanosin;  $m^7GpppN$ ) mit dem ersten Nukleotide der RNA gebildet. Sie dient dem Schutz der RNA vor dem Degradieren durch Exonukleasen, spielt eine wichtig Rolle bei dem Transport der RNA aus dem Kern ins Zytoplasma und dient der Translationsinitiation.

Die Translationsinitiation ist ein komplexer Prozess, welcher durch mehrere eIFs gesteuert wird. Als erster Schritt bildet sich ein Komplex bestehend aus eIF1, eIF1A und eIF3 welcher sich an die kleine 40S-Untereinheit (UE) des Ribosoms anlagert. Dadurch kommt es zu einer Dissoziation des Ribosoms in seine beiden UE und ein erneutes Zusammenlagern wird blockiert [70]. Nun wird der 43S-Prä-Initiationskomplex gebildet, indem sich ein ternärer Komplex, bestehend aus der Methionin-beladenen Initiator-tRNA ( $tRNA_i^{Met}$ ) und dem eIF2, gekoppelt an GTP, an die 40S-UE anlagert [71]. Unterstützt wird diese Komplexbildung durch eIF5, welcher an die  $\beta$ -UE des eIF2 bindet und als Co-Faktor fungiert [72]. Über die Bindung von eIF4E an die Cap-Struktur formiert sich ein weiterer Komplex, der eIF4F-Komplex, direkt an der mRNA. Weitere Faktoren sind eIF4A, eIF4B,

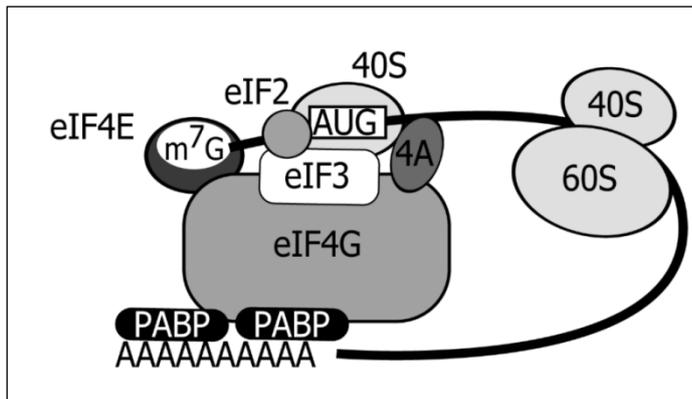
eIF4G und eIF4H. Die beiden Komplexe werden durch die Interaktion zwischen eIF3 und eIF4G miteinander verbunden [73; 74]. Der eIF4A besitzt eine Helikase-Aktivität und kann, zusammen mit den Co-Faktoren eIF4B und eIF4H, Sekundärstrukturen in der zu translatierenden RNA auflösen [75]. Ist dieser Initiationskomplex entstanden, erfolgt das Ablesen der RNA bis zu einem initialen AUG-Start-Codon [76]. Wurde ein solches erkannt, löst sich eIF1 aus dem Komplex und eIF5 induziert die Hydrolyse des an eIF2 gebundenen GTP, so dass beide den ternären Komplex verlassen [77]. Nachdem die restlichen eIFs den Komplex verlassen haben kann die 60S-Ribosomen-UE, unter Ausbildung eines 80S-Ribosoms an die kleine 40S-UE binden, wodurch die Elongationsphase der Proteinsynthese beginnt [78]. Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 1.7 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der eukaryotischen Translationsinitiation**

Durch die Bildung eines Komplexes aus eIF1, eIF1A und eIF3 und der Anlagerung an die 40S-UE des Ribosoms kommt es zu einer Dissoziation der beiden Ribosomen-UE (1). Ein ternärer Komplex, bestehend aus tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> gebunden an eIF2-GTP, bildet sich (2) und bindet ebenfalls an die 40S-UE unter Ausbildung des 43S-Prä-Initiationskomplexes (3). Dieser Komplex bindet zusammen mit dem eIF4-Komplex die mRNA (4) und das Ablesen der RNA beginnt (5). Wird ein AUG-Start-Codon erkannt, kommt es zur Hydrolyse des GTP (6), die die eIFs fallen ab und die 60S-Ribosomen-UE lagert sich mit der 40S-UE zu einem 80S-Ribosomenkomplex zusammen (7). Die Elongation der RNA beginnt (modifiziert nach [47]).

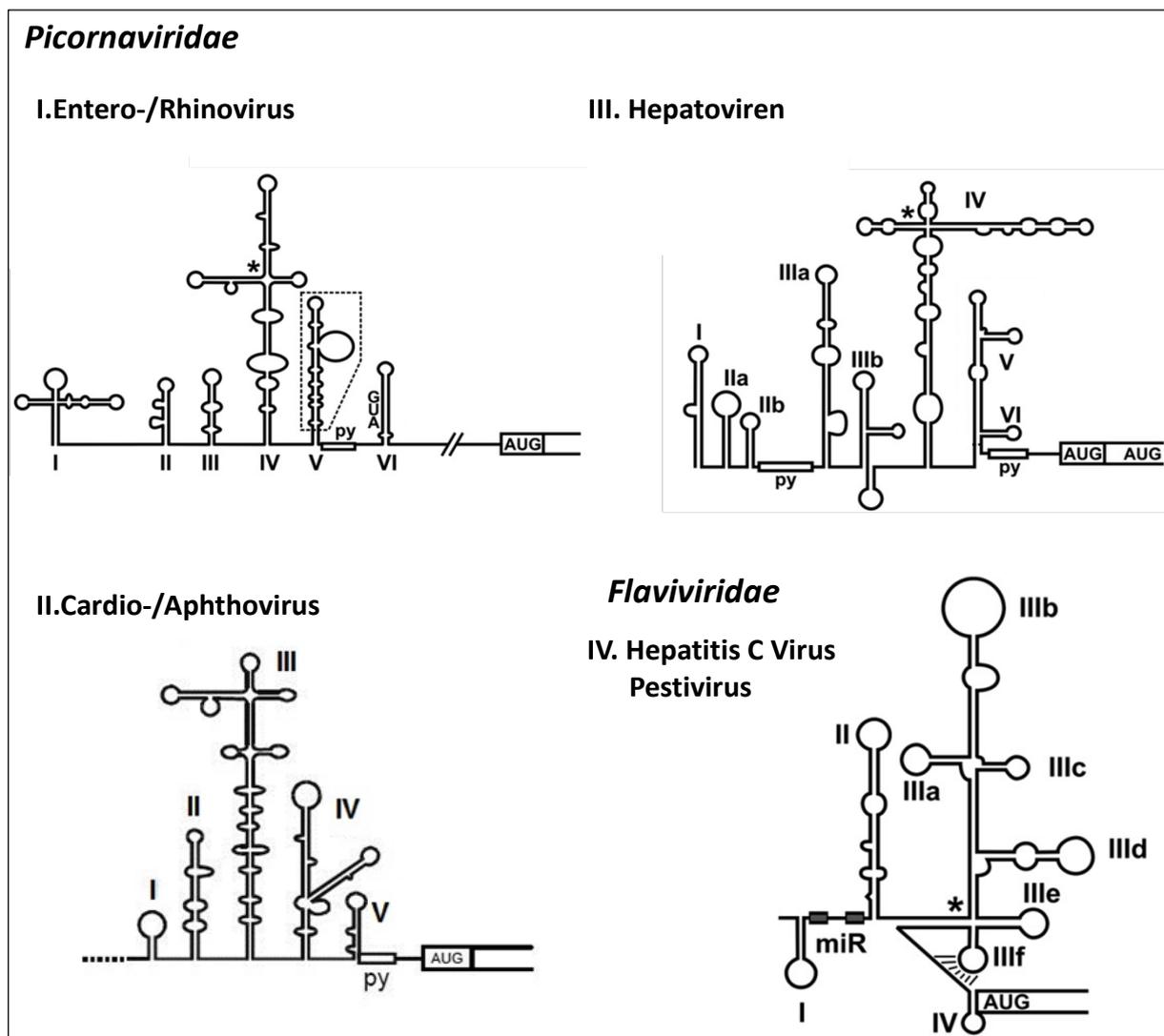
Die Translationsinitiation kann durch eine Zirkularisierung des Initiationskomplexes mit dem Poly(A)-Schwanz der zu translatierenden mRNA stimuliert werden [79]. Dabei kommt es zu einer Interaktion von eIF4G mit einem Poly(A)-Bindepotein (engl.: *Poly(A) binding protein*, PABP), welches sich an der angehängten Poly(A)-Kette der mRNA befindet (Abbildung 1.8). Diese Strukturbildung führt zu einer stabileren Bindung des eIF4F-Komplexes an die mRNA und verstärkt dadurch die Effizienz der Initiation der Translation und möglicherweise auch die Geschwindigkeit einer Re-Initiation.



**Abbildung 1.8: Zirkularisierung der mRNA**  
Schematische Darstellung der Interaktion des Translations-Initiationskomplexes mit dem Poly(A)-Schwanz der mRNA [80].

### 1.2.2 IRES-abhängige Initiation der Translation

Die IRES-Strukturen sind hoch komplexe sekundäre Strukturen an den 5'-Enden von RNA-Viren, welche es den Viren ermöglichen eine Cap-unabhängige Translationsinitiation einzuleiten. Erstmals entdeckt wurden diese Strukturelemente durch Studien an Polioviren (PV) und Encephalomyokarditis-Viren (EMCV) [81; 82]. Seitdem konnten 4 verschiedene Typen von IRES-Strukturen klassifiziert werden (Abbildung 1.9), wobei die Unterscheidung aufgrund ihrer Sequenz, der Sekundärstruktur und der Art und Weise, wie die Ribosomen an den Startpunkt rekrutiert werden, erfolgt. In die Familie der *Picornaviridae* gehören Typ I mit den *Entero-* und *Rhinoviren*, Typ II mit den *Cardio-* und *Aphthoviren* und Typ III mit den *Hepatoviren*. Typ IV der IRES-Strukturelemente gehört jedoch zu der Familie der *Flaviviridae* und umfasst die *Pestiviren* und HCV [83; 84].



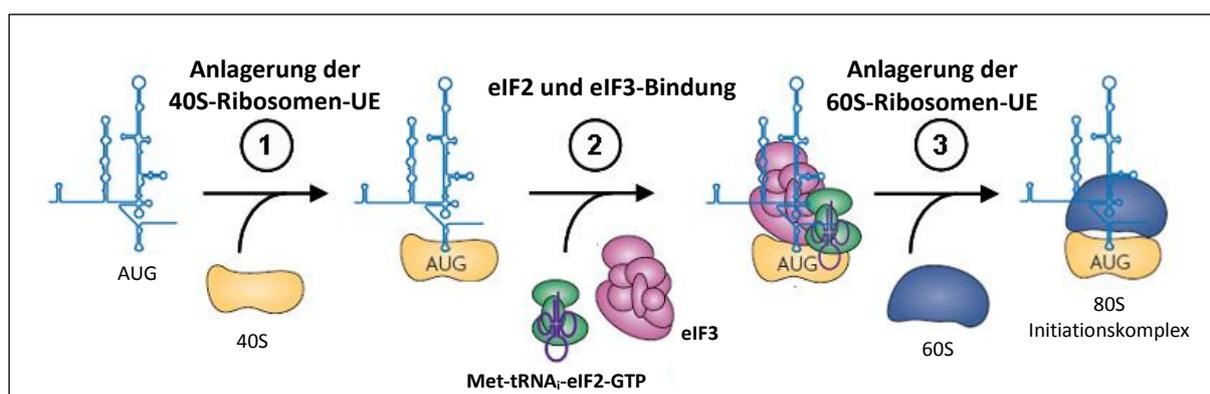
**Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der verschiedenen IRES-Typen**

Die mit I–IV bezeichneten Abbildungen zeigen die schematischen Darstellungen der Typ I–IV IRES-Strukturelemente. In die Familie der *Picornaviridae* gehören Typ I–III mit; *Entero-* und *Rhinoviren* (I), *Cardio-* und *Aphthoviren* (II) und *Hepatoviren* (III). Typ IV mit *Pestiviren* und HCV gehört zu der Familie der *Flaviviridae* (IV). Haarnadelstrukturen sind mit römischen Zahlen beschriftet, miR: Bindungsstellen für die microRNA-122, py: Oligopyrimidin-Trakt; \*: tRNA ähnliche Struktur. (modifiziert nach [84]).

Die IRES von HCV ist in allen HCV-Subtypen hoch konserviert und setzt sich aus den Haarnadelstrukturen II–IV und einem Teil der Core-kodierenden Region zusammen (Abbildung 1.3). Im Gegensatz zu der Cap-abhängigen Translationsinitiation benötigt die IRES-abhängige Initiation lediglich 3 eukaryotische Initiationsfaktoren, eIF3, eIF2 und eIF5, was bedeutet, dass sie vollkommen unabhängig von dem eIF4F-Komplex auskommt.

Die IRES enthält eine tRNA-ähnliche Struktur in der Haarnadelstruktur IV, den sogenannten Pseudoknoten (Abbildung 1.4 PK). Dieser enthält das AUG-Start-Codon und bindet die kleine 40S-Ribosomen-UE ohne irgendwelche eIFs direkt an die IRES [45; 85]. Nach der Bindung der 40S-UE kommt es zu einer Strukturveränderung der Haarnadelstruktur IV, um das AUG-Start-Codon direkt in

der P-Stelle des Ribosoms zu platzieren [86]. Anschließend bindet eIF3 in der apikalen Region von Haarnadelstruktur III [87] und assoziiert direkt mit der 40S-ribosomalen UE [74; 88]. eIF3 ist für diesen Schritt der Initiation nicht unbedingt notwendig, jedoch für die Bildung und Stabilisierung des 80S-Ribosomenkomplexes [47]. Es folgt die Bindung des ternären Komplexes, bestehend aus eIF2 assoziiert mit der  $tRNA_i^{Met}$ -Initiator-tRNA und GTP, an die 40S-UE. Für die Erkennung des AUG-Start-Condons durch den ternären Komplex dient eIF5, welcher zusätzlich noch als GTPase-Aktivator-Protein für eIF2 fungiert [44]. Nach der Hydrolyse des GTP durch eIF5 kommt es zur Bindung der 60S-Ribosomen-UE und dem Lösen der eIFs, wobei eIF3 mit dem Ribosom assoziiert bleibt [89]. Es bildet sich der 80S-Initiationskomplex. Abbildung 1.10 zeigt eine schematische Darstellung der oben beschriebenen Vorgänge. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein der 3'-UTR die Translationseffizienz verstärken kann [52]. Es wird vermutet, dass es ebenfalls zu einer Zirkularisierung der 3'-UTR mit der 5'-UTR kommt. Jedoch konnte der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt werden.



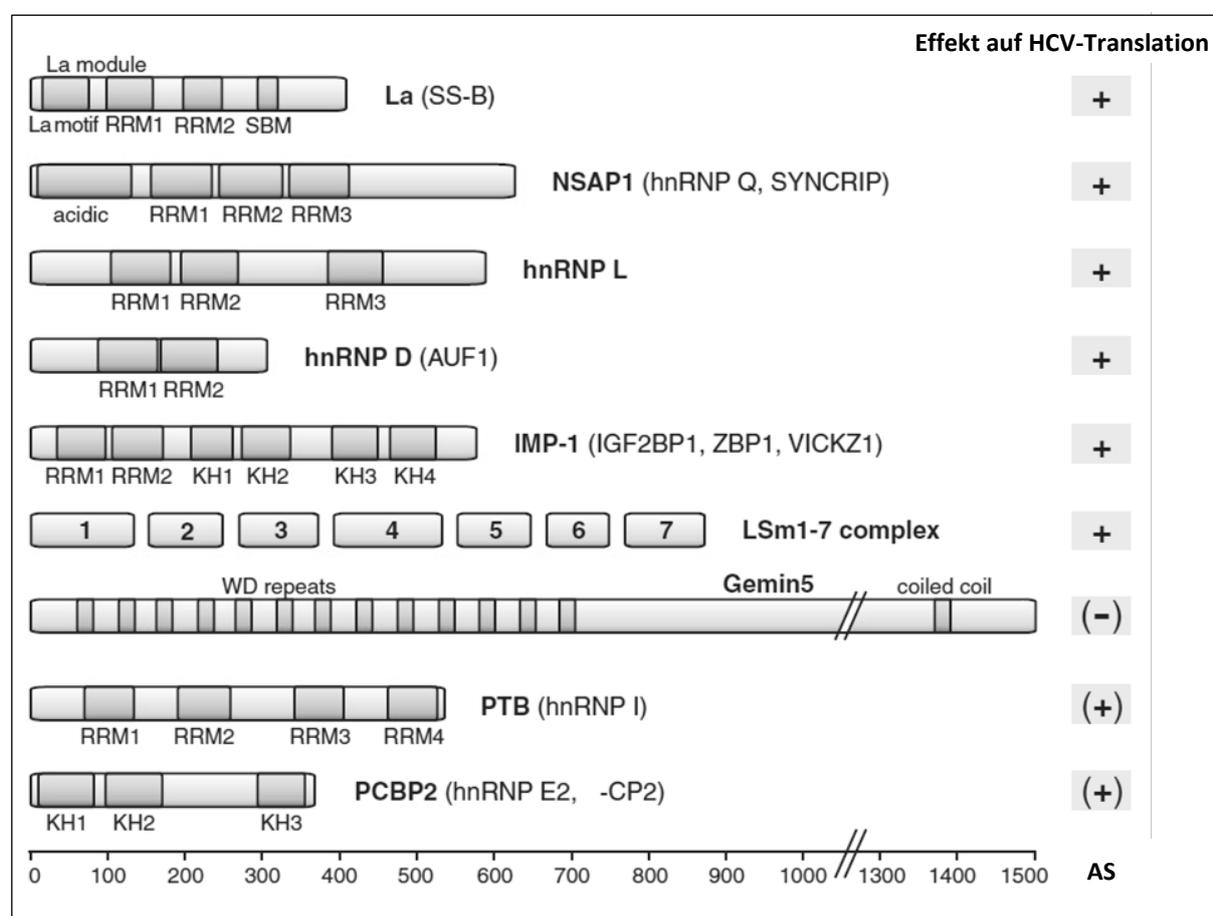
**Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der IRES-abhängigen Translationsinitiation bei HCV**

Die Initiation beginnt mit der direkten Bindung der 40S-Ribosomen-UE an die IRES, in Abwesenheit irgendwelcher eIFs (1). Anschließend bindet der eIF2-GTP- $tRNA_i^{Met}$ -Komplex und eIF3 an die Oberfläche der 40S-ribosomalen UE (2). Es kommt zur GTP-Hydrolyse, gefolgt von der Anlagerung der 60S-Ribosomen-UE an die 40S-Ribosomen-UE unter Ausbildung eines 80S-Ribosomenkomplexes (3). Die Elongation der RNA beginnt (modifiziert nach [47]).

### 1.2.3 IRES-*trans*-aktivierende Faktoren

Die IRES-abhängige Translation benötigt neben den eIFs noch weitere zelluläre RNA-bindende Proteine, um die Translationseffizienz zu steigern, die sogenannten IRES-*trans*-aktivierenden Faktoren (ITAFs). Diese Proteine sind normalerweise in verschiedene Bereiche des zellulären RNA-Metabolismus involviert, spielen jedoch bei der Cap-abhängigen Translation selten eine Rolle. Erst durch die Bindung an bestimmte Bereiche der HCV-IRES nehmen sie einen stimulierenden oder inhibierenden Einfluss auf die Translation ein. Die für HCV identifizierten ITAFs sind das La-Protein, NSAP1 (engl.: *mice minute virus NS1-associated protein 1*), hnRNP D und L (engl.: *heterogeneous*

nuclear ribonucleoprotein), IMP-1 (engl.: *inner membrane protease*), LSm1-7 (engl.: *Like Sm protein*), Gemin5 (engl.: *Gem-associated protein 5*), PTB (engl.: *polypyrimidine tract-binding protein*) und PCBP2 (engl.: *poly(rC)-binding protein 2*). Die meisten ITAFs besitzen mehrere RNA-Bindedomänen, wie das RNA-Erkennungs-Motiv (engl.: *RNA recognition motif*, RRM) [90], die KH(K homolog)-Domäne [91] oder die La-Protein Domäne [92]. Über diese Domänen können die Proteine mit der HCV-RNA interagieren. Außerdem können einige dieser RNA-Bindeproteine ebenfalls miteinander interagieren, so zum Beispiel La mit LSm1–7 [93], hnRNP D mit hnRNP L [94] und NSAP1 mit dem SMN-Komplex (engl.: *survival of motor neurons*), welcher Gemin5 enthält [95]. Zusätzlich kann NSAP1 mit der 40S-ribosomalen UE interagieren [96]. Die genaue Funktionsweise der ITAFs ist in Niepmann 2013 [97] zusammengefasst. Eine Übersicht der ITAFs ist in Abbildung 1.11 dargestellt.



**Abbildung 1.11: IRES-trans-aktivierende Faktoren von HCV**

Dargestellt sind die verschiedenen IRES-trans-aktivierenden Faktoren von HCV. Dunkelgrau: für eine RNA-Interaktion wichtige Domänen, wie das RNA-Erkennungs-Motiv (engl.: *RNA recognition motif*, RRM), die KH-Domäne oder die La-Protein Domäne. Rechts ist der Einfluss auf die HCV-Translation gezeigt; +: stimulierend; -: inhibierend; (+): schwacher Einfluss (modifiziert nach [97]).

Außer den ITAFs gibt es noch weitere Faktoren, welche die HCV-Translation stimulieren. Dazu gehören die microRNAs und die Argonaute(Ago)-Proteine [98; 99; 100]. Auf beide wird in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen.

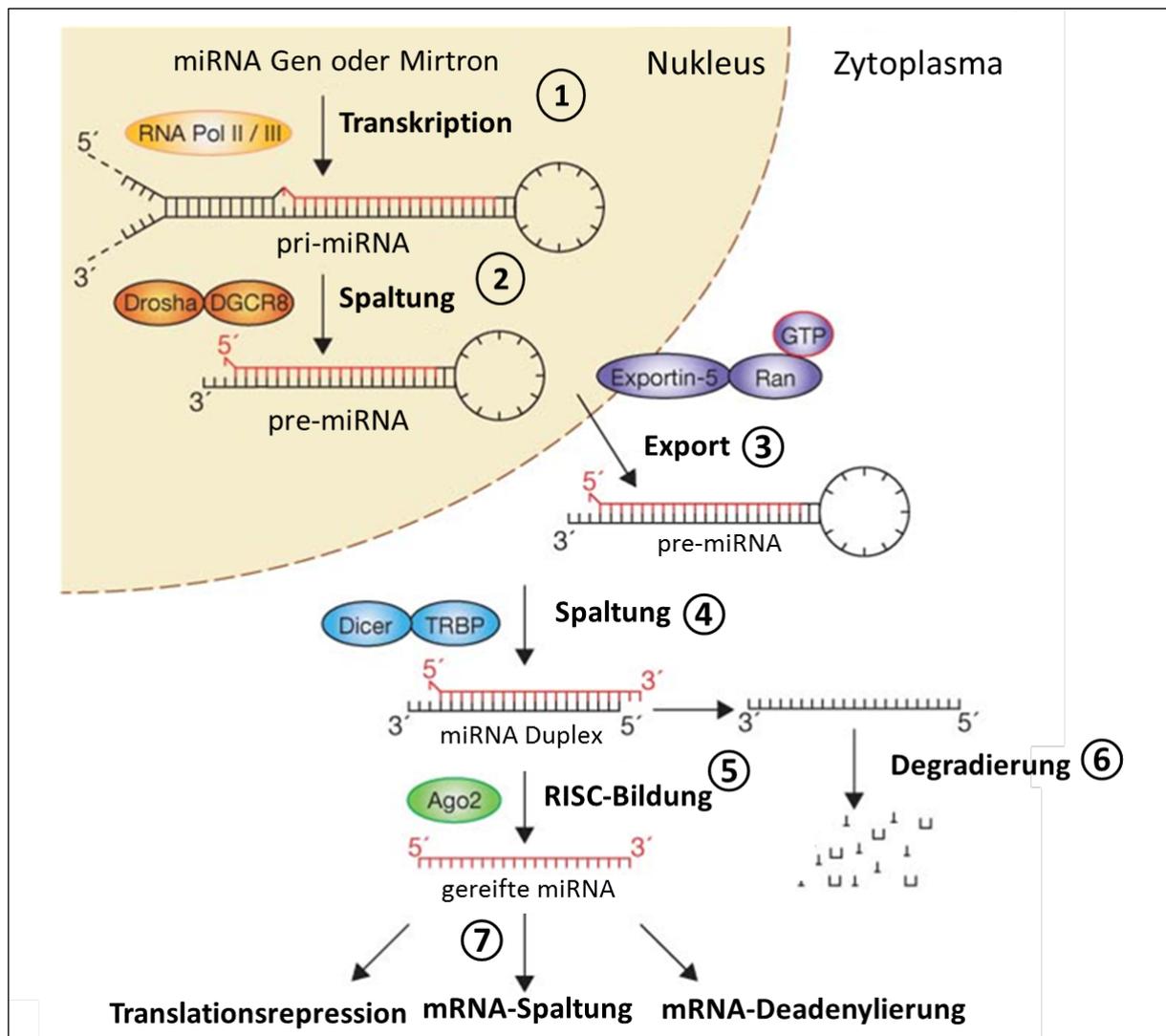
## 1.3 microRNAs

Die microRNAs (miRNA) sind etwa 22 Nukleotide lange, nicht-kodierende, einzelsträngige RNA-Moleküle, welche eine wichtige Rolle bei der eukaryotischen Genregulation spielen. Ihre Funktionsweise beruht auf einer posttranslationalen Regulation der mRNAs Protein-kodierender Gene durch eine sequenzspezifische Basenpaarung in der 3'-UTR [101; 102]. Für diese Interaktion lagern sich die miRNAs mit ihrer *seed*-Sequenz, den Nukleotiden 2–8 ihres 5'-Endes, an die 3'-UTR der mRNA an, wobei nicht alle Nukleotide paaren müssen [103]. Diese Paarungsweise führt zu einer größeren Anzahl an mRNAs, welche von einer einzigen miRNA erkannt werden [104]. Die miRNAs führen zu einer Repression der Ziel-mRNA durch die Bildung eines Ribonukleoprotein-Komplexes, dem *miRNA-induced silencing complex* (miRISC) und der dadurch initiierten Translationsrepression, Degradierung oder Deadenylierung der mRNA [105; 106]. Die dabei wichtigen Proteine gehören zu der Familie der Argonaute-Proteine. In Menschen sind vier Ago-Proteine bekannt (1–4), wobei Ago2 am häufigsten vorkommt [107].

### 1.3.1 Biogenese der miRNA

Die miRNAs entstehen entweder durch die Transkription von mono- oder polycistronischen miRNA-Genen [108; 109] oder sind in sogenannten Mirtrons kodiert [110; 111]. Handelt es sich um miRNA-Gene, werden diese durch die RNA-Polymerase II zu langen Primären-Molekülen, pri-miRNAs (engl.: *primary*), transkribiert. Diese lagern sich zu einer nicht perfekt paarenden *Hairpin*-Struktur zusammen und werden durch die Rnase III Endonuklease Drosha und das doppelsträngige RNA-bindende Protein DGCR8 (engl.: *DiGeorge syndrome chromosomal region 8*) in 70 Nukleotide lange Vorläufer-Moleküle, pre-miRNAs (engl.: *precursor*) gespalten [112; 113; 114]. Die entstandenen pre-miRNAs haben ein 5'-Phosphat-Ende und ein 3'-Ende mit einem Überhang von zwei Nukleotiden [115]. Liegen die miRNA kodiert in Mirtrons vor, werden sie durch einen Splice-Prozess direkt zu pre-miRNAs prozessiert.

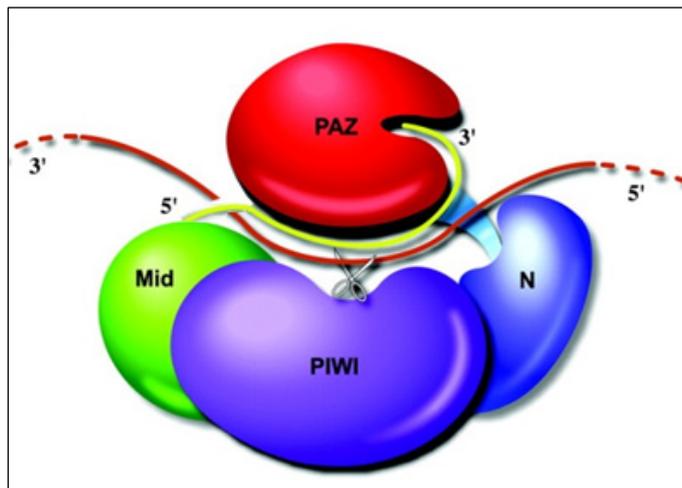
Die pre-miRNAs werden anschließend durch den Exportin5/Ran-GTP-Komplex, welcher spezifisch das charakteristische Ende der pre-miRNA erkennt, aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert [116; 117]. Hier werden sie durch Dicer, assoziiert mit TRBP (engl.: *human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein*), zu miRNA-Duplexen mit einer Länge von ca. 22 Basenpaaren und zwei Nukleotide-Überhängen an ihren 3'-Enden gespalten [118]. TRBP interagiert mit Ago-Proteinen und bindet die miRNA-Duplexe an diese [119]. Zusammen mit weiteren Proteinen bilden Dicer, TRBP und Ago den sogenannten RISC-Komplex (engl.: *RNA-induced silencing complex*) (Abbildung 1.12).



**Abbildung 1.12: Prozessierung von miRNAs**

Die Biogenese der miRNA beginnt entweder mit der Transkription mono- oder polycistronischer miRNA-Gene oder mit dem Splicen von Mirtrons (1). Die durch Transkription entstandene pri-miRNA wird durch Drosha und DGCR8 zur pre-miRNA gespalten (2). Anschließend werden die pre-miRNAs via Exportin5 und Ran-GTP aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert (3). Dort werden sie durch Dicer und TRBP in doppelsträngige RNAs, mit einem 5'-Phosphat-Ende und einem 2 Nukleotide überhängenden 3'-Ende gespalten (4). Durch das Zusammenführen von Dicer, TRBP, Ago2 und weiteren Proteinen formiert sich der RISC-Komplex (5). In diesem wird die doppelsträngige RNA entwunden, der Führungsstrang bleibt gebunden während der Folgestrang degradiert wird (6). Nach der Bindung der Ziel-mRNA wird deren Translation oder Stabilität reguliert, entweder durch Translationsrepression, mRNA-Deadenylierung oder mRNA-Spaltung (7) (modifiziert nach [110; 111]).

Nach der Entwindung der miRNA-Duplexe bleibt der Führungsstrang an Ago im RISC-Komplex gebunden, während der Folgestrang den Komplex verlässt und degradiert wird. Welcher Strang gebunden und welcher abgebaut wird, hängt von der thermodynamischen Stabilität an den Duplex-Enden ab, wobei der am 5'-Ende weniger stabile Strang zum Führungsstrang wird [120; 121]. Der von Ago gebundene Führungsstrang interagiert mit den Domänen des Proteins (Abbildung 1.13).



**Abbildung 1.13: Schematische Darstellung des Ago2-Proteins**

Das Ago2-Protein besteht aus 4 Domänen: Mid-Domäne: bindet das 5'-Ende der miRNA, PIWI-Domäne: interagiert mit dem miRNA-mRNA-Duplex und hat eine Rnase-ähnliche Struktur, PAZ-Domäne: bindet das 3'-Ende der miRNA und die N-Domäne, deren Funktion noch nicht bekannt ist. Rot: mRNA; gelb: miRNA (modifiziert nach [122]).

Die Mid- und PIWI- (engl.: *P-element induced wimpy testis*) Domänen interagieren mit dem 5'-Ende der miRNA. Die PAZ-Domäne (benannt nach den Proteinen der Familien: Piwi, Argonaute und Zwillie) erkennt das 3'-Ende der miRNA und positioniert diese mit ihrer *seed*-Sequenz auf die komplementäre Stelle in der Ziel-mRNA [103; 122; 123; 124]. Dadurch kommt es zu einer Paarung der RNA-Strukturen, wobei die Art der Paarung die Art der Translationsrepression bestimmt. Bei einer perfekten Paarung wird die mRNA gespalten und degradiert, was auf die *slicer*-Aktivität, aufgrund der Rnase-ähnlichen Struktur der PIWI-Domäne zurückzuführen ist [107; 125], allerdings besitzt nur Ago2 der Ago-Familie diese Aktivität. Bildet sich jedoch eine *bulge*-Struktur aus, kommt es zu einer Einlagerung der mRNA in sogenannte *processing-bodies* (*P-bodies*) [126]. *P-bodies* sind spezielle Strukturen im Zytoplasma von Zellen, welche nicht benötigte mRNAs speichern, bis sie entweder benötigt oder abgebaut werden. Die miRNAs können die Translation, wie oben beschrieben aber nicht nur reprimieren, sondern auch zu einer Stimulation führen [99]. Zudem hängt ihre Wirkungsweise wohl auch von ihrem Bindungsort ab. Bindet sie in der 3'-UTR führt dies zu einer Stabilisierung der mRNA, bindet sie jedoch in der kodierenden Region reguliert sie die mRNA Translation [127].

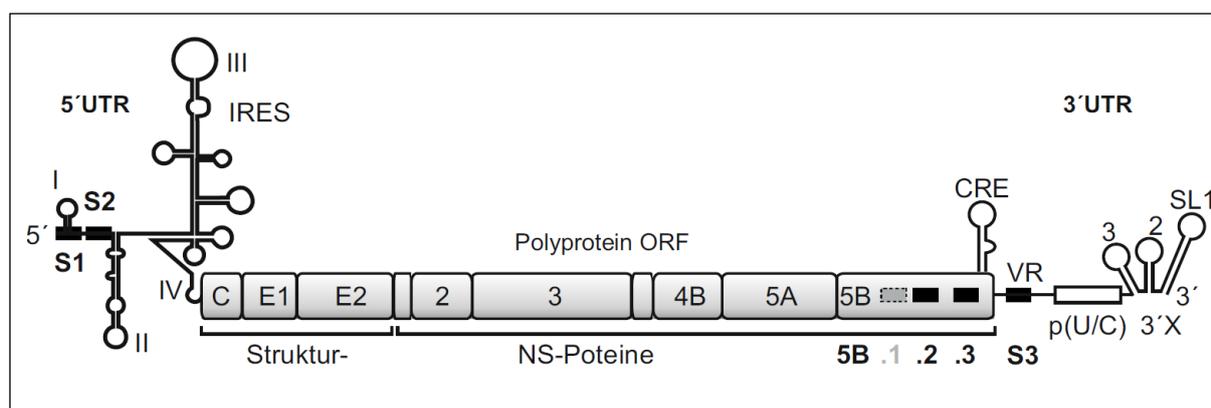
### 1.3.2 miRNA-122

Die miRNA-122 (miR-122) ist eine leberspezifische miRNA und stellt in den Hepatozyten 70 %, ca. 135.000 Kopien/Zelle, aller miRNAs der gesamten miRNA-Population dar. Die Kodierung für miR-122 liegt auf Chromosom 18 und ist Teil des Exons der nicht-kodierenden RNA [128]. Es konnte gezeigt werden, dass miR-122 eine große Rolle bei der Cholesteroll-Biosynthese spielt [129], ebenso bei der Eisenhomeostase [130] und als Regulator in Leberzellkarzinomen [131]. Außerdem hat sie einen starken Einfluss auf die Replikation [98] und Translation von HCV [99]. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Unterdrückung der miR-122-Synthese die von HCV-typischen Erkrankungen wie Hepatitis und die Ausbildung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) begünstigt [132; 133].

### 1.3.3 Effekt von miR-122 auf HCV

Das HCV-Genom besitzt verschiedene zu der miR-122 komplementäre Sequenzen (*seed-target*-Sequenz) (Abbildung 1.14), wobei bis auf eine, alle zwischen den Isolaten absolut konserviert vorliegen (Anhang 6.1). Dies legt eine funktionelle Bedeutung nahe.

Zwei dieser Bindungsstellen befinden sich zwischen Haarnadelstruktur I und II der hoch konservierten 5'-UTR von HCV. Dabei handelt es sich um die Sequenz S1 mit einer 7 Nukleotide langen Sequenz (ACACUCC) und S2 mit einer Sequenz von 6 Nukleotiden (CACUCC). Es konnte gezeigt werden, dass eine Bindung der miR-122 an diese Stellen eine Verstärkung der RNA-Replikation bewirkt [98; 134], eine durch Ago-Protein vermittelte miR-122-Bindung [135] die HCV-RNA vor Exonuklease-Abbau schützt und die Produktion von infektiösen Viruspartikel erleichtert [136; 137; 138]. Außerdem konnte eine Verstärkung der RNA-Stabilität [139] und eine Stimulation der Translation nachgewiesen werden [99; 140; 141; 142; 143].



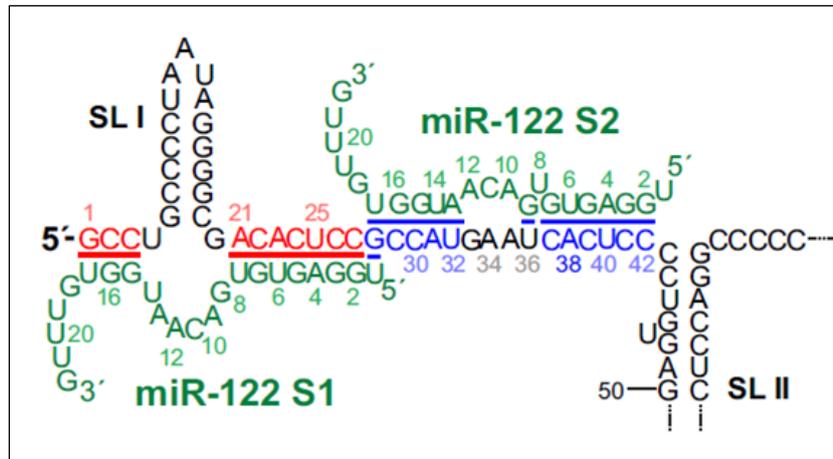
**Abbildung 1.14: miR-122-Bindungsstellen im HCV-Genom**

Dargestellt ist das HCV-Genom mit seiner 5'-UTR, dem Polyprotein, der 3'-UTR und den miR-122-Bindungsstellen. Graues Kästchen: erste Bindungsstelle in der NS5B-kodierenden Region, welche in den verschiedenen Isolaten nicht konserviert vorliegt; schwarze Kästchen: in allen Isolaten hoch konservierte miR-122-Bindungsstellen. UTR: *untranslated region* IRES: *internale ribosomal entry side*, NS-Proteine: Nicht-Struktur-Proteine, CRE: *cis-acting replication element*, ORF: *open reading frame*, VR: *variable Region*, p(U/C): *poly U-Trakt*, SL: *stem-loop*, S1, S2, 5B.1, 5B.2, 5B.3 und S3: miR-122-Bindungsstellen

Eine weitere, hoch konservierte miR-122-Bindungsstelle befindet sich in der VR der 3'-UTR des HCV-Genoms. Von Henke, Goergen *et al.* konnte jedoch nachgewiesen werden, dass diese Stelle keinen Einfluss auf die Translation hat [99].

Des Weiteren wurden drei potentielle miR-122 *seed-target*-Sequenzen in der NS5B-kodierenden Region gefunden, wobei die erste Sequenz (5B.1) innerhalb der Isolate nicht konserviert vorliegt, die zweite (5B.2) und dritte (5B.3) dagegen jedoch hoch konserviert sind (Anhang 6.1). Welche Rolle diese Stellen in der HCV-Regulation spielen, ist bisher allerdings noch nicht bekannt.

In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die miR-122 nicht nur mit ihrer *seed*-Sequenz (Nukleotide 2–8) an die zwei Bindungsstellen in der 5′-UTR hybridisiert, sondern mit 3–4 ergänzenden Nukleotiden (*supplemental*-Region) ihrer 3′-Sequenz. Diese Art der Hybridisierung führt zur Ausbildung einer *bulge*-Region und einer „Schwanz“-Region der miR-122 (Abbildung 1.15) [137; 144]. Durch verschiedene Mutationsversuche konnte gezeigt werden, dass diese zusätzliche Bindung für die Ago2-Rekrutierung an die HCV-RNA, in Zusammenhang mit der miR-122, benötigt wird. Ebenso spielt sie eine Rolle bei der Stabilisierung der HCV-RNA und der Bildung von infektiösen Viren.



**Abbildung 1.15: miR-122-Bindung an die HCV-RNA**

Dargestellt ist die miR-122-Bindung an die HCV-RNA in der 5′-UTR. Die miR-122 (grün) bindet nicht nur mit ihrer *seed*-Sequenz, sondern auch mit einer ergänzenden 3–4 Nukleotide langen Sequenz (*supplemental*-Region) in 3′-Richtung. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer *bulge*- und „Schwanz“-Region. Rot: miR-122-Bindungsstelle S1; Blau: miR-122-Bindungsstelle S2; Schwarz: HCV-RNA; SL: *stem-loop* (Dissertation Anika Nieder-Röhrmann).

In unserer Arbeitsgruppe konnte im Laufe der Dissertation von Dominik Conrad (Dissertation Conrad 2013), eine solche zusätzliche Bindungsstelle für die miR-122 in der 3′-UTR ermittelt werden. Bestätigt werden konnte dies durch Sequenz-Alignments, welche für diese Arbeit vorgenommen wurden (Anhang 6.1.5). Das Besondere an dieser zusätzlichen Sequenz besteht darin, dass sie in einer hoch konservierten Haarnadelstruktur präsentiert wird und einen Teil des Stopp-Codons einschließt (Abbildung 1.5). Dies deutet auf eine biologische Funktion hin.

## 1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Bindung von miR-122/Ago2-Protein-Komplexen an die konservierten miR-122-Bindungsstellen in der HCV-kodierenden Region NS5B und der 3'-UTR zu untersuchen [135]. Für diese Untersuchungen wurde die Methode der co-Immunopräzipitations- (co-IP) angewendet. Dazu wurden Zellen mit radioaktiven RNA-Molekülen definierter Länge, welche die jeweiligen miR-122 *seed-target*-Sequenzen enthalten, transfiziert. Anschließend wurde eine co-IP durchgeführt, in der mit Hilfe eines Ago2-Antikörpers die radioaktiv-markierte RNA isoliert werden konnte, wenn Ago2 durch miR-122 an die HCV-RNA rekrutiert worden war.

Nachdem von Dominik Conrad (Dissertation 2013) erstmals in der HCV-3'-UTR eine zusätzliche Bindungsstelle (neben der *seed-target*-Sequenz) für die miR-122 entdeckt wurde, welche anscheinend notwendig für eine Anlagerung des miR-122-Ago2-Komplexes an die HCV-RNA ist, sollte in dieser Arbeit eine genauere Untersuchung der miR-122-Bindungsstelle der 3'-UTR (S3) vorgenommen werden. Dafür wurden Mutationen in die verschiedenen miR-122-Hybridisierungssequenzen der HCV-RNA eingefügt. Es entstanden 3 verschiedene Konstrukte: S3<sub>sur</sub>, S3<sub>se</sub> und S3<sub>co</sub>.

Goergen *et al.* 2012 [142] konnten einen positiven Einfluss der miR-122-Bindung in der 5'-UTR auf die Translation nachweisen. Im Laufe dieser Untersuchung wurde ebenfalls gezeigt, dass dabei die Bindungsstelle in der 3'-UTR keine, jedoch eventuell ihre komplexe Sekundärstruktur eine Rolle spielt. Da es in der Arbeitsgruppe allerdings gelungen war ein Konstrukt zu generieren, welches die miR-122-Bindung sowohl in der 5'-UTR als auch der 3'-UTR verhindert, konnte eine separate Betrachtung der 3'-UTR durchgeführt werden. Deshalb sollte in dieser Arbeit eine detailliertere Untersuchung des Einflusses der miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR auf die Translation vorgenommen werden. Hierfür wurden Luciferase-Assays durchgeführt.

Zuletzt sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Hybridisierung des miR-122/Ago2-Protein-Komplexes an die miR-122-Bindungsstellen auf die Replikation ausübt. Dafür wurden Mutationen in die miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region und die 3'-UTR eingefügt, wobei es sich bei den Mutationen in der 3'-UTR um die gleichen handelt, welche für die Translationsstudien verwendet wurden. Für die Mutationen in der NS5B-kodierenden Region galt es zum einen darauf zu achten die Protein-kodierende Sequenz zu erhalten und zum anderen für jede Stelle unterschiedliche Nukleotidaustausche zu finden, um später eine separate Adressierung durchzuführen.

## 2 Ergebnisse

In den vergangenen Jahren konnten mehrere miR-122-Bindungsstellen im HCV-Genom nachgewiesen werden. Zwei hoch konservierte Sequenzen befinden sich zwischen Haarnadelstruktur I und II der 5'-UTR, welche die Replikation [98] und die Translation [99; 140; 141; 142; 143] stimulieren. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine durch Ago-Protein vermittelte miR-122-Bindung an die miR-122-Erkennungssequenz in der 5'-UTR [135] die HCV-RNA vor Exonuklease-Abbau schützt, die RNA stabilisiert und die Produktion von infektiösen Viruspartikel erleichtert [136; 137; 138; 139]. Zusätzlich zu der *seed-target*-Sequenz bindet die miR-122 noch mit 3–4 Nukleotiden (*supplemental*-Region) in 5'-Richtung an die HCV-RNA, wodurch sich dazwischen eine *bulge*- und dahinter eine „Schwanz“-Region ausbildet (Abbildung 1.15) [137; 144]. Durch verschiedene Mutationsversuche in der 5'-UTR konnte gezeigt werden, dass diese *supplemental*-Bindung für die Ago2-Rekrutierung an die HCV-RNA in Zusammenhang mit der miR-122 benötigt wird.

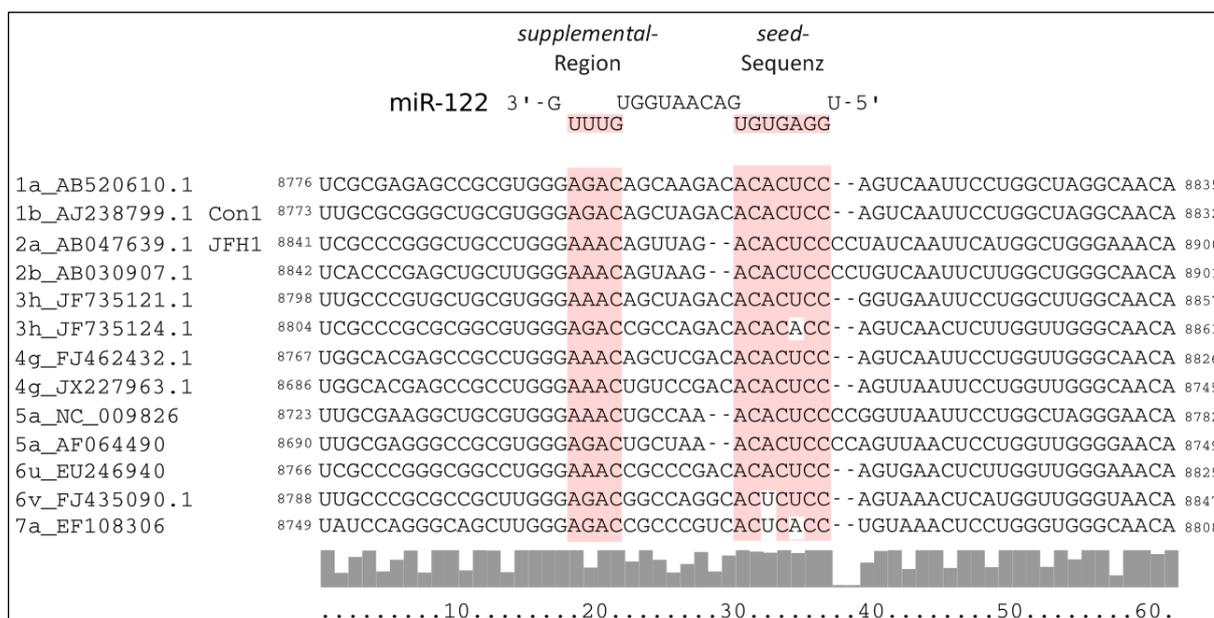
Weitere Bindungsstellen konnten in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR nachgewiesen werden [145; 146] (Abbildung 1.14). Da der Einfluss dieser miR-122-Bindungsstellen auf einzelne Schritte des HCV-Replikationszyklus noch nicht ausreichend bekannt ist, sollten sie genauer untersucht werden.

### 2.1 Hoch konservierte miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR von HCV

Zu Beginn dieser Arbeit wurde das Internet von Hand mit Hilfe der NCBI-Website nach vollständigen HCV-Sequenzen durchsucht. Die Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) verglichen. Zunächst wurden die Subtypen der jeweiligen Genotypen untereinander und danach die Genotypen miteinander verglichen. Diese erste Überprüfung des HCV-Genoms zeigte deutlich, dass die miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR hoch konserviert vorliegt und ebenso eine *supplemental*-Region aufweist (Abbildung 2.4, Anhang 6.1.5). Außerdem konnten zwei weitere hoch konservierte miR-122-Erkennungssequenzen innerhalb der NS5B-kodierenden Region bestätigt werden, ebenfalls mit einer möglichen *supplemental*-Region (Abbildung 2.1, Abbildung 2.2; Anhang 6.1.1 und Anhang 6.1.2).

Da diese Art der Vorgehensweise die maximale Rechenleistung der frei zugänglichen Programme erreichte, wurde die Hilfe von Markus Fricke aus der Arbeitsgruppe von Prof. Manja Marz (Jena) in Anspruch genommen, welcher eine größere Sequenzanalyse vornahm. Für die Sequenzanalyse in der NS5B-kodierenden Region des HCV-Genoms wurden von 950 heruntergeladenen HCV-Isolaten aus allen Genotypen und Subtypen 106 Isolate ausgewählt, welche das komplette bzw. das annähernd komplette Genom enthielten und aus jedem Subtyp mindestens zwei Isolate repräsentieren [48].

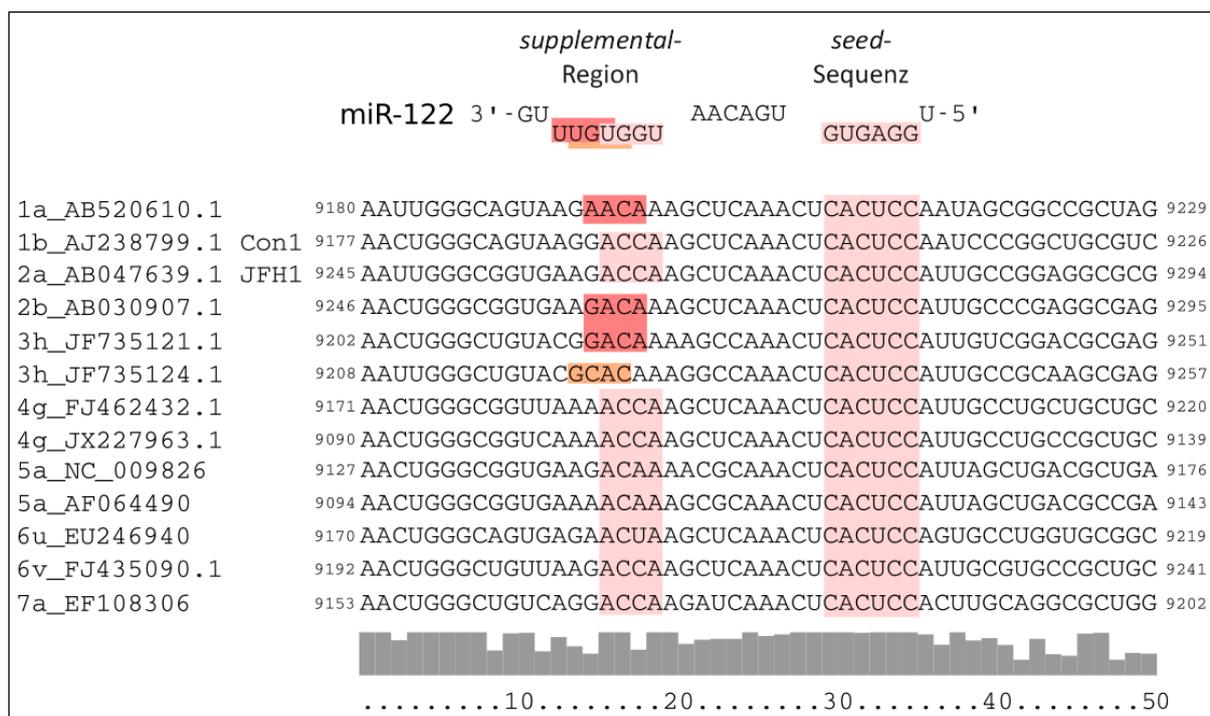
Die erste hoch konservierte miR-122-Bindungsstelle, mit der Sequenz ACACUCC (5B.2) befindet sich 570 Nukleotide strangaufwärts des Stopp-Codons. Diese *seed-target*-Sequenz ist in 99 der 106 Isolate konserviert. Eine mögliche *supplemental*-Region liegt 6–8 Nukleotide strangaufwärts der *seed-target*-Sequenz und ist in allen 106 Isolaten zu finden. In der Abbildung 2.1 ist dies exemplarisch für die verschiedenen HCV-Genotypen dargestellt, wobei die Bindungsstellen in rot markiert sind und das Maß der Konservierung als Histogramm (komplette Analyse Anhang 6.1.1).



**Abbildung 2.1: Ausschnitt des Sequenzvergleichs für NS5B.2**

Dargestellt ist ein Ausschnitt des Sequenzvergleichs für die miR-122-Bindungsstelle 5B.2. Die komplette Übersicht befindet sich im Anhang 6.1.1. Links ist der Genotyp und Subtyp sowie die Referenznummer der HCV-Sequenz aus der NCBI Nukleotide-Datenbank angegeben. Con1 und JFH1 (J6-JFH1) definieren die in dieser Arbeit untersuchten Isolate. Oberhalb des Sequenzvergleichs befindet sich die miR-122-Sequenz. Die paarenden Sequenzen sind rot markiert. Unterhalb: Histogramm der Konservierung jeder einzelnen Base. Die Zahlen geben die Position im HCV-Genom an. (-) markiert die eingefügten Lücken, um eine optimale Übereinstimmung der Sequenzen zu erhalten.

Eine weitere hoch konservierte miR-122-Bindungsstelle, CACUCC (5B.3), welche in allen 106 Isolaten vorkommt, befindet sich 165 Nukleotide strangaufwärts des Stopp-Codons. Auch für diese *seed-target*-Sequenz konnte eine mögliche *supplemental*-Region 10–12 Nukleotide in 5'-Richtung identifiziert werden. Dabei handelt es sich um verschiedene 4 Nukleotide lange Sequenzen, welche an die miR-122 binden könnten. In Abbildung 2.2 sind diese in unterschiedlichen Rottönen dargestellt. Die komplette Sequenzanalyse befindet sich im Anhang 6.1.2.



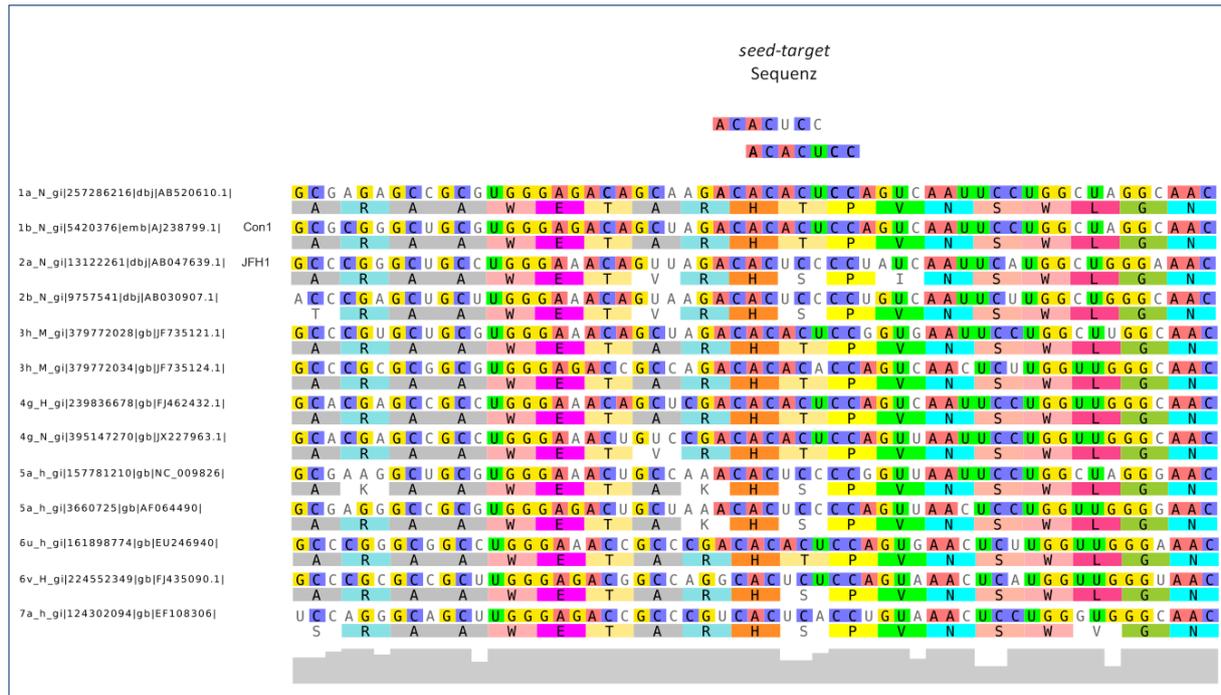
**Abbildung 2.2: Ausschnitt des Sequenzvergleichs für NS5B.3**

Dargestellt ist ein Ausschnitt des Sequenzvergleichs für die miR-122-Bindungsstelle 5B.3. Die komplette Übersicht befindet sich im Anhang 6.1.2. Links ist der Genotyp und Subtyp, sowie die Referenznummer der HCV-Sequenz aus der NCBI Nukleotide-Datenbank angegeben. Con1 und JFH1 (J6-JFH1) definieren die in dieser Arbeit untersuchten Isolate. Oberhalb des Sequenzvergleichs befindet sich die miR-122-Sequenz. Die paarenden Sequenzen sind rot markiert. Unterhalb: Histogramm der Konservierung jeder einzelnen Base. Die Zahlen geben die Position im HCV-Genom an.

In der NS5B-kodierenden Region konnte noch eine weitere Bindungsstelle, CACUCC (5B.1) [146], nachgewiesen werden. Bei der Sequenzanalyse hat sich jedoch gezeigt, dass diese Stelle nicht konserviert vorliegt und nur in 25 der 106 Isolate vorkommt (Daten nicht gezeigt). Sie wurde daher nicht weiter untersucht.

Außer einem Basenvergleich wurde auch ein Aminosäurevergleich für die miR-122-Bindungsstellen 5B.2 und 5B.3 durchgeführt. Überraschend ist, dass die beiden in der NS5B-kodierenden Region liegenden miR-122-Bindungsstellen stärker konserviert sind als es für die Protein-kodierende Sequenz Voraussetzung wäre (Abbildung 2.3; Anhang 6.1.3 und 6.1.4).

**A**



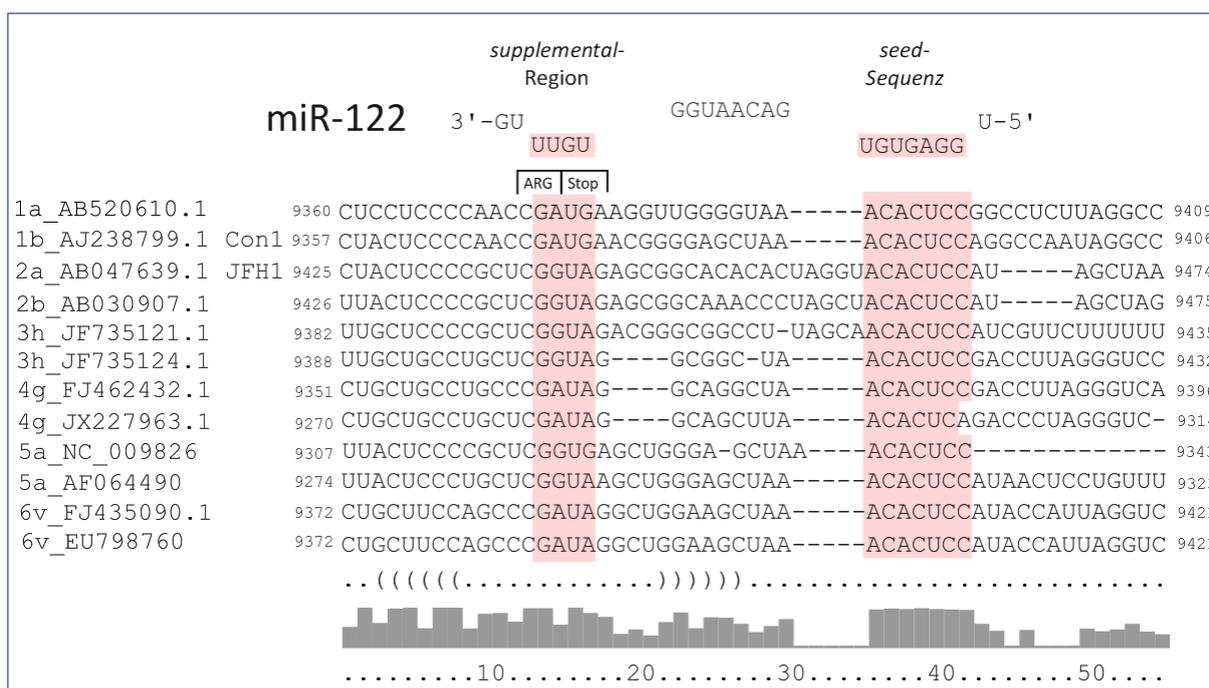
**B**



**Abbildung 2.3: Konservierung der Aminosäuren in der *seed-target*-Sequenz**

Dargestellt sind die Nukleotide-Sequenzen der 5B.2 (A) und 5B.3 (B) miR-122-Bindungsstellen verglichen mit der AS-Sequenz. Die Nukleotide sind farbig unterlegt, wenn mehr als 50 % konserviert sind. Das Histogramm zeigt den Anteil an vorliegenden Nukleotiden relativ zu der Anzahl an Nukleotiden, die eine bestimmte Aminosäure kodieren können, d.h. je niedriger der Balken im Histogramm ist, desto weniger Nukleotide werden aus den möglichen Nukleotiden tatsächlich verwendet, und desto eher hat diese Sequenz eine überlappende zusätzliche Funktion, z.B. die als miR-122-Bindungsstelle. Oberhalb: Position der *seed-target*-Sequenz.

Für die Analyse der 3'-UTR wurden 94 Isolate für den Sequenzvergleich herangezogen, da nicht alle Sequenzen der 106 Isolate vollständig vorlagen. In der VR-Region der 3'-UTR ist die miR-122-Bindungsstelle, ACACUCC (S3), in 85 von 94 Isolaten konserviert, und eine *supplemental*-Region konnte in 92 der 94 Isolate entdeckt werden. Diese vier Nukleotide lange ergänzende Sequenz liegt mit zwei Nukleotiden innerhalb der kodierenden Region und überschneidet mit zwei weiteren Nukleotiden des Stopp-Codons (Abbildung 2.4, komplette Sequenz Anhang 6.1.5). Außerdem wird sie, wie in Abbildung 1.5 dargestellt, in einer Haarnadelstruktur präsentiert. All dies könnte auf eine wichtige biologische Funktion hindeuten, weshalb diese *supplemental*-Region auch im Einzelnen betrachtet werden sollte.



**Abbildung 2.4: Ausschnitt des Sequenzvergleichs für die miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR**

Dargestellt ist ein Ausschnitt des Sequenzvergleichs für die miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR. Die komplette Übersicht befindet sich im Anhang 6.1.5. Links ist der Genotyp und Subtyp, sowie die Referenznummer der HCV-Sequenz aus der NCBI Nukleotide-Datenbank angegeben. Con1 und JFH1 (J6-JFH1) definieren die in dieser Arbeit untersuchten Isolate. Oberhalb des Sequenzvergleichs befindet sich die miR-122-Sequenz. Die paarenden Sequenzen sind rot markiert. Unterhalb: Histogramm der Konservierung jeder einzelnen Base. Die Zahlen geben die Position im HCV-Genom an. (-) markiert die eingefügten Lücken, um eine optimale Übereinstimmung der Sequenzen zu erhalten.

Ein Adenosin direkt strangabwärts der miRNA-Bindungsstelle ist in vielen miRNA-Zielssequenzen vorhanden und bindet direkt an Ago2 [102; 103; 147]. Interessanterweise konnte ein solches Adenosin in 70 von 106 Isolaten der 5B.2, in 101 von 106 Isolaten der 5B.3 und in 56 von 94 Isolaten der S3-Erkennungssequenz nachgewiesen werden. Besonders für 5B.3 ist das Adenosin über die Anforderung der kodierenden Sequenz hinaus konserviert. Diese Erkenntnis scheint auf eine funktionelle Rolle der miR-122-Bindungsstellen in HCV hinzudeuten.

## 2.2 Untersuchung der Bindung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA näher analysiert werden. Um die Bindung der miR-122 an die konservierten Bindungsstellen der HCV-RNA nachzuweisen, wurden HeLa-Zellen mit  $^{32}\text{P}$ -markierten HCV-RNAs, welche jeweils eine der Bindungsstellen enthielten, und miR-122-Duplexen transfiziert (Kapitel 4.2.2.6.1). Die Zellen wurden 6 h nach der Transfektion lysiert und der miR-122/Ago2/HCV-RNA-Komplex mittels einer co-Immunopräzipitation (co-IP) vom Rest des Zelllysates getrennt (Kapitel 4.2.4.1). Dabei wurden anti-Ago2-Antikörper (AK), welche an Magnetpartikeln gebunden wurden, verwendet [135]. Die gereinigte RNA wurde isoliert, auf ein Polyacrylamid-Gel (Tabelle 4.4) aufgetragen und mittels einer Gelelektrophorese (Kapitel 4.2.3.3.3) aufgetrennt. Die entstandenen Banden wurden mit Hilfe eines Phosphoimagers detektiert und die Menge der  $^{32}\text{P}$ -markierten HCV-RNA mit dem Programm OptiQuant ermittelt. Dabei wurde die zu bestimmende Bande mit einem Kästchen markiert, so dass von dem Programm die Strahlungsintensität gemessen werden konnte. Dieses Vorgehen erfolgte für alle HCV- und Input-Proben sowie für den Hintergrund, welcher anschließend von jeder Probe subtrahiert wurde. Es wurde darauf geachtet, die Größe der ausgewählten Markierung immer gleich zu halten. Dadurch war es möglich, die Menge der HCV-RNA auf die Menge der Input-RNA zu normalisieren und mit den Werten der Flag-Negativkontrolle zu vergleichen. Das Flag-Epitop kommt natürlicherweise nicht in HeLa-Zellen vor und kann somit als Negativkontrolle für den unspezifischen Hintergrund der co-IP fungieren. So konnte die Intensität der miR-122-Bindung an die HCV-RNA bestimmt werden (Kapitel 4.2.4.1).

### 2.2.1 Nachweis einer miR-122/Ago2-Hybridisierung an die Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR

Im Laufe der Dissertation von Dominik Conrad konnte mittels co-IP eine starke Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die beiden Bindungsstellen in der 5'-UTR nachgewiesen werden. Ebenso konnte er erste Interaktionsstudien an der 3'-UTR durchführen und eine schwache Bindung zeigen. Dies gelang jedoch nur, wenn sowohl die *seed-target*-Sequenz als auch die *supplemental*-Region für eine mögliche Hybridisierung der miR-122 vorhanden waren. Dies deutete auf einen besonderen Einfluss der ergänzenden Bindungsstelle für die Interaktion des miR-122/Ago2-Komplexes mit der HCV-RNA hin, weshalb sie in dieser Arbeit genauer untersucht werden sollte. Zunächst erfolgten jedoch weitere Versuche, um eine Bindung der miR-122 an die Bindungsstelle in der 3'-UTR zu bestätigen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob es auch in der NS5B-kodierenden Region zu einer Anlagerung des miR-122/Ago2-Komplexes kommt.

Dominik Conrad verwendete in seinen Versuchen den Klon Con1, welcher auf dem HCV-Genotyp 1b basiert. Um seine Daten zu bestätigen, wurden die anfänglichen co-IP-Experimente ebenfalls mit diesem Genotyp durchgeführt. Da Con1 jedoch langsam repliziert und zu keiner richtigen Infektion in bis jetzt bekannten Zelllinien führt, eignet er sich nur bedingt für die geplanten Funktionalitätsnachweise. Deshalb wurde zusätzlich die Chimäre J6-JFH1 (Genotyp 2a) verwendet, mit der virale Partikel hergestellt werden können und welche in der Arbeitsgruppe für Infektionsassays verwendet werden sollte.

### 2.2.1.1 Primäre Bindungsstudien mittels co-IP

Bei den ersten Versuchen in der NS5B-kodierenden Region wurden für die beiden Isolate Con1 und J6-JFH1, 200–260 Nukleotide lange RNA-Stücke generiert, welche die jeweiligen miR-122-Bindungsstellen enthielten. Da S3 für spätere Mutationsversuche in drei Bereiche unterteilt werden sollte, *supplemental*-Region ( $S3_{su}$ ), *seed-target*-Sequenz ( $S3_{se}$ ) und beide zusammen (*complete*-Bindungsstelle,  $S3_{co}$ ), wurde der vorwärts-Primer so gewählt, dass er eine paarende Sequenz sowohl zu der *seed-target*-Region als auch der ergänzenden Region aufwies (Kapitel 4.1.10.1). Dadurch wäre es möglich gewesen, für spätere Versuche Mutationen über eine einfache PCR in die resultierende Transkriptions-Matrize zu integrieren. Die kompletten Sequenzen der generierten HCV-RNAs befinden sich im Anhang 6.2.

Nachdem die Primerpaare festgelegt waren, erfolgte eine Standard-PCR (Kapitel 4.2.3.2.1). Die amplifizierte DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels eines Gelaufreinigungskits isoliert. Da jeder vorwärts-Primer die Sequenz für den T7-Promotor enthielt, konnte direkt anschließend eine *in vitro*-Transkription (Kapitel 4.2.3.14) mit  $^{32}\text{P}$ -markiertem UTP durchgeführt werden. Für jedes Transkript war eine bestimmte Menge an nicht-radioaktiv-markiertem UTP nötig. Diese Konzentration wurde in vorangegangenen Transkriptionsversuchen durch einen Gradienten mit nicht markiertem UTP ermittelt (Tabelle 2.1).

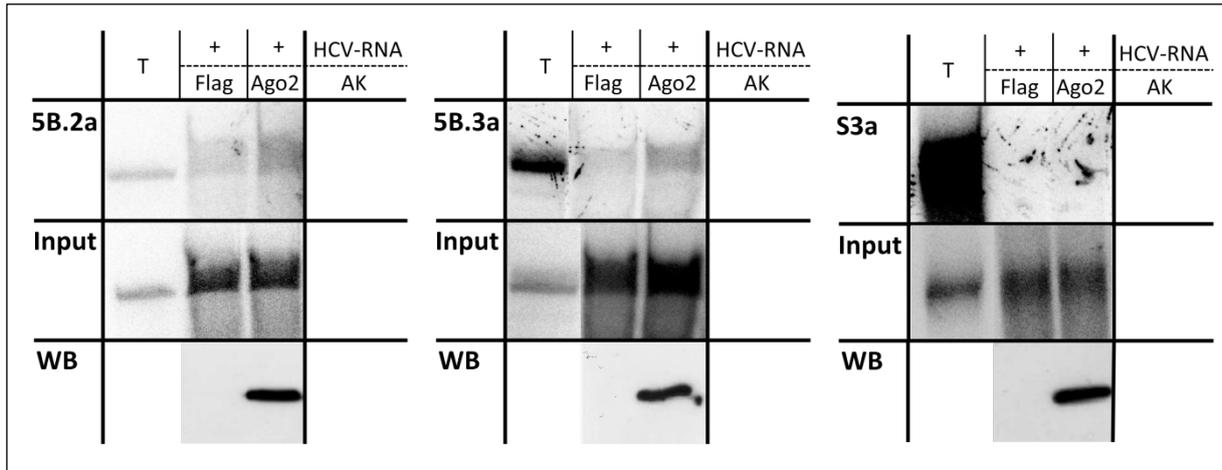
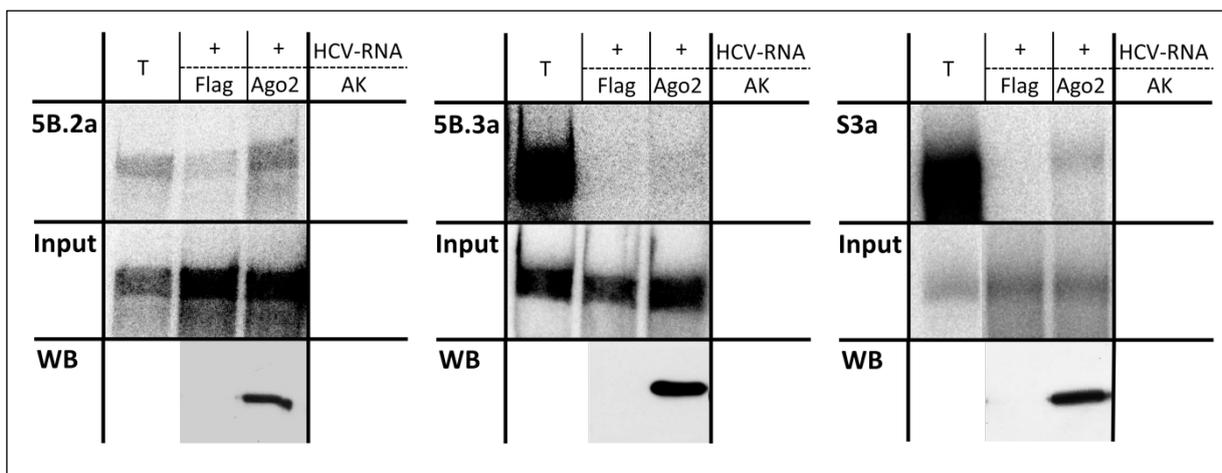
**Tabelle 2.1:** Menge des eingesetzten nicht-radioaktiv-markierten UTP in die *in vitro*-Transkription

Probe	$^{32}\text{P}$ -markiertes UTP ( $\mu\text{M}$ )	UTP ( $\mu\text{M}$ )
5B.2	0,5	100
5B.3	0,5	100
S3	0,5	300

Anschließend erfolgte eine Transfektion von 3  $\mu\text{g}$  radioaktiv-markierter HCV-RNA zusammen mit 3  $\mu\text{g}$  miR-122-Duplexen in die humane zervikale HeLa-Zelllinie. Diese Zelllinie wurde der humanen

Hepatomazelllinie Huh7.5, vorgezogen, da in HeLa-Zellen keine endogene miR-122 detektierbar ist und somit ein falsch positives Ergebnis verhindert wird. Die darauffolgenden co-IPs erfolgten mit zwei unterschiedlichen Antikörpern (AK). Die erste Probe wurde mit dem Flag-AK präzipitiert. Die zweite Probe sollte eine mögliche Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA zeigen, weshalb hierfür der anti-Ago2 11A9 AK [148] verwendet wurde. In Abbildung 2.5 sind exemplarisch co-IP-Ergebnis für jede der untersuchten Bindungsstellen in den jeweiligen Genotypen dargestellt. Weiterhin ist ein anti-Ago2 Western Blot (WB) (Kapitel 4.2.4.3) dargestellt, welcher in allen weiteren Experimenten das gleiche Ergebnis aufwies und deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr gezeigt wird.

Wie auf den abgebildeten Phosphoimager-Bildern (Abbildung 2.5) deutlich zu erkennen ist konnte auf der erwarteten Höhe, welche durch das Auftragen des Transkriptes definiert wird, für die untersuchten miR-122-Bindungsstellen, 5B.2a, 5B.3a und S3a, in beiden Genotypen keine bzw. eine nur sehr schwache Bande detektiert werden. Da die Flag-Kontrolle negativ ist, die Input-Proben die gleiche eingesetzte Menge an transfizierter HCV-RNA im Zellysat aufweisen und der WB die Funktionalität des anti-Ago2-AK bestätigt, sind die co-IP-Experimente auswertbar. Daher konnte bei diesen Experimenten festgestellt werden, dass keine effiziente Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA vorliegt.

**A: Con1****B: J6-JFH1**

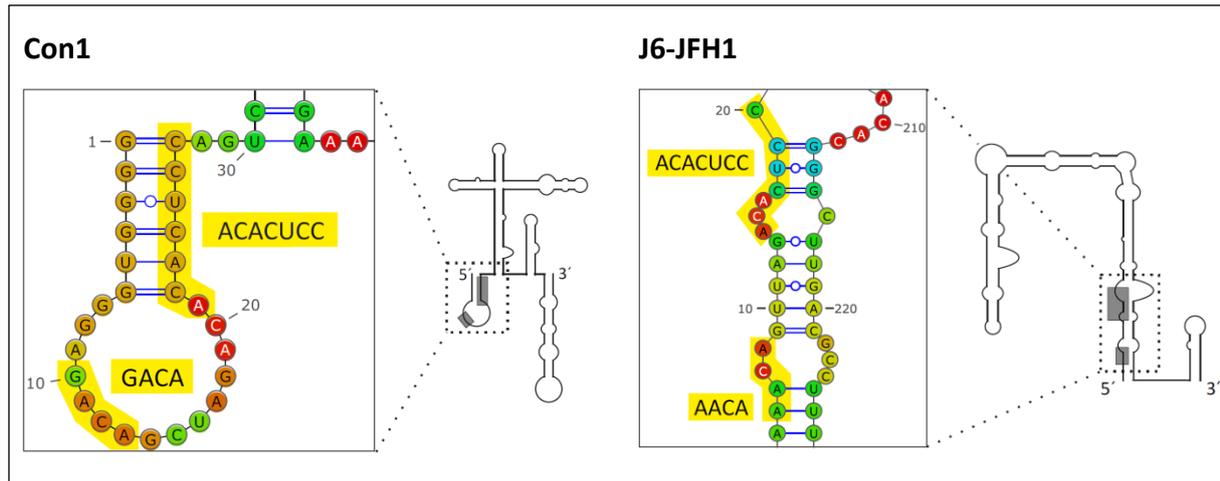
**Abbildung 2.5:** Erster Nachweis einer möglichen Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die miR-122-Bindungsstellen

Dargestellt sind exemplarisch Phosphorimager-Bilder der co-IP-Experimente für die miR-122-Bindungsstellen in den NS5B-kodierenden Regionen, 5B.2 und 5B.3, sowie für die Bindungsstelle in der 3'-UTR, S3, für die jeweiligen Isolate Con1 (**A**) und J6-JFH1 (**B**). Die obere Reihe zeigt die Immunopräzipitation mit den anti-Ago2- und Flag-Antikörpern (AK). Die mittlere Zeile stellt die reextrahierte radioaktive HCV-RNA aus 10 % des Zelllysates dar, welches bezüglich der co-IP als Input-Kontrolle dient. Die untere Zeile zeigt einen anti-Ago2 Western Blot (WB). T: aufgetragenes Transkript, als Höhenmarker.

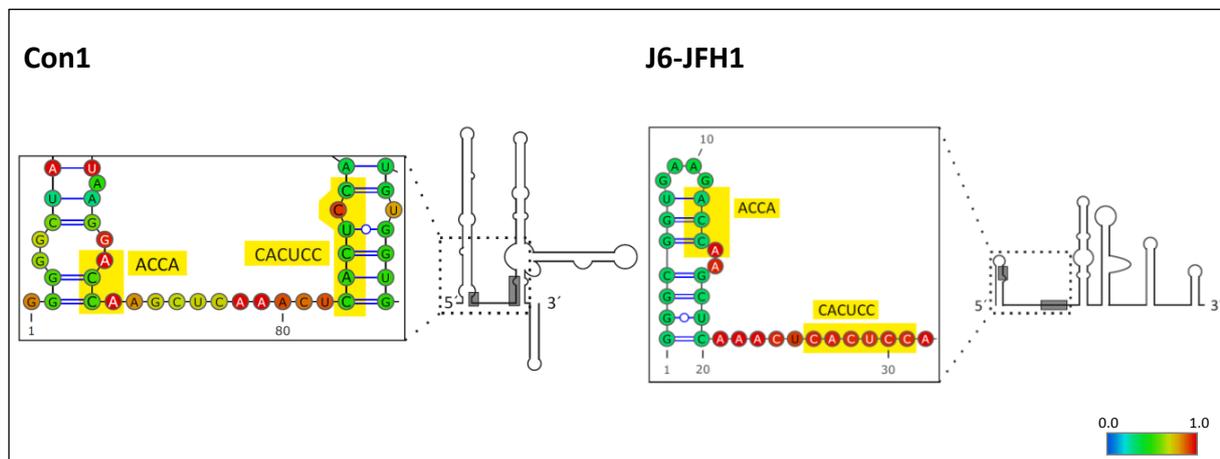
Nun stellte sich die Frage, warum keine Bindung an die miR-122-Erkennungssequenzen nachgewiesen werden konnte. Um eine mögliche Erklärung zu finden, wurden die miR-122-Bindungsstellen und die Ergebnisse vorangegangener Versuche an der 5'-UTR genauer angesehen. Dabei ist zu erkennen, dass die Bindungsstellen in der 5'-UTR innerhalb der IRES einzelsträngig vorliegen (Abbildung 1.14; Abbildung 1.15). Außerdem ist bekannt, dass die Sekundärstruktur der RNA einen großen Einfluss auf ihre Funktionalität sowie auf die miR-122/Ago2-Hybridisierung hat. Deswegen wurden die bioinformatisch vorhergesagten Strukturen

der oben verwendeten Transkripte genauer betrachtet. Hierfür wurde das ViennaRNAfold WebServer Programm verwendet, welches RNA-Strukturen nach energetisch günstigen Kriterien faltet (Abbildung 2.6 und Abbildung 2.7). Es ist zu erkennen, dass die *seed-target*-Bindesequenz sowie die *supplemental*-Region zu etwa 50 % in Doppelsträngen vorliegen. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass die Bindung der miR-122 an diese RNA erschwert bzw. verhindert wird.

## A: RNA 5B.2a



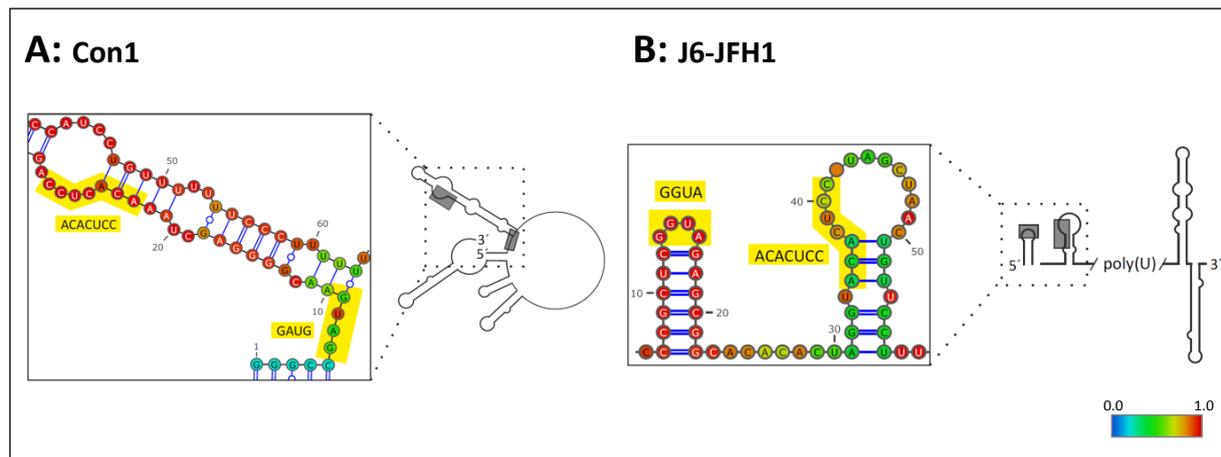
## B: RNA 5B.3a



**Abbildung 2.6: HCV-RNA-Strukturen der miR-122-Bindungsstellen 5B.2a und 5B.3a für Con1 und J6-JFH1**

Die oben beschriebenen Transkripte wurden mit dem ViennaRNAfold WebServer Programm gefaltet. Abbildung (A): miR-122-Bindungsstelle 5B.2a; (B): miR-122-Bindungsstelle 5B.3a. Links: Ausschnitt der HCV-RNA-Struktur für das Isolat Con1. Rechts: Ausschnitt der HCV-RNA-Struktur für die J6-JFH1 Chimäre. Beide jeweils mit einem vergrößertem Ausschnitt der miR-122 *seed-target*- und *supplemental* Region (gelb unterlegt), sowie einer schematischen Darstellung der kompletten HCV-RNA-Struktur (*seed-target*- und *supplemental*-Region hervorgehoben in den grauen Kästchen). Der Farbcode gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die Basen in der dargestellten Konformation vorliegen, wobei Blau eher unwahrscheinlich und Rot sehr wahrscheinlich wiederspiegelt.

## RNA S3a



**Abbildung 2.7:** HCV-RNA-Strukturen der miR-122-Bindungsstellen S3a für Con1 und J6-JFH1

Die oben beschriebenen Transkripte wurden mit dem ViennaRNAfold WebServer Programm gefaltet. Abbildung (A): Isolat Con1, (B): Isolat J6-JFH1. Beide jeweils mit einem vergrößertem Ausschnitt der miR-122 *seed-target*- und *supplemental*-Region (gelb unterlegt), sowie einer schematischen Darstellung der kompletten HCV-RNA-Struktur (*seed-target*- und *supplemental*-Region hervorgehoben in den grauen Kästchen). Der Farbcode gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die Basen in der dargestellten Konformation vorliegen, wobei Blau eher unwahrscheinlich und Rot sehr wahrscheinlich wiederspiegelt.

### 2.2.1.2 Generierung neuer Primerpaare

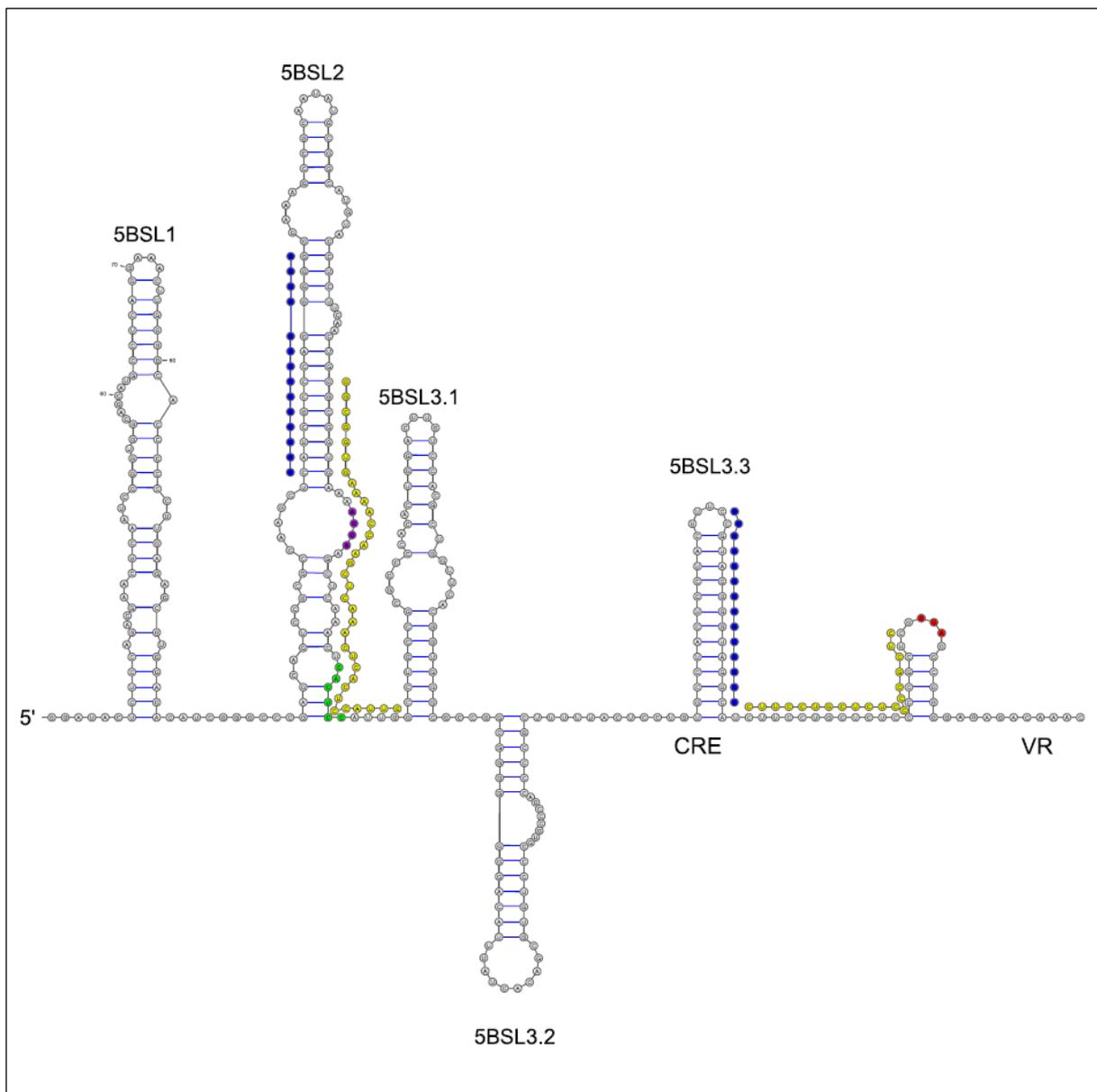
Wie in Abbildung 2.6 und Abbildung 2.7 zu sehen ist weisen die HCV-RNA-Strukturen der verwendeten Primer sehr komplexe Strukturen auf. Die miR-122-Bindungsstellen liegen oft gebunden in einer Haarnadelstruktur vor (die kompletten RNA-Strukturen befinden sich im Anhang 6.3). Ebenso könnte der vorhandene poly(U/C)-Trakt der S3-Bindungsstelle die Anlagerung des miR-122/Ago2-Komplexes durch Ausbildung komplexer Sekundärstrukturen negativ beeinflussen. Deshalb wurden die nächsten Primer erst nach *in silico*-Faltung der RNA generiert.

Für die Erkennungssequenzen in der 3'-UTR lag das Hauptaugenmerk darauf, die Primer so zu wählen, dass sie den poly(U/c)-Trakt nicht mehr umfassten und die *seed-target*- und *supplemental*-Region in der RNA-Sekundärstruktur-Vorhersage möglichst einzelsträngig vorlagen.

Neue Primer für die Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region zu generieren gestaltete sich jedoch um einiges schwieriger. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch keine klare Vorstellung von der Sekundärstruktur, die sich um die 5B.2-Bindungsstelle bildet. Deshalb war die Intention bei der Generierung neuer Primer darauf gerichtet, die Bindungsstelle möglichst einzelsträngig zu halten. Dies erfolgte für beide Genotypen durch das Variieren der Sequenzen strangaufwärts und strangabwärts der miR-122-Bindungsstellen.

Fricke, Dünnes *et al.* [48] veröffentlichten 2015 eine konservierte Sekundärstruktur für den Bereich um die Bindungsstelle 5B.3 (Abbildung 2.8). Nachdem in den vorangegangenen Experimenten die

Lage des ersten Primerpaares (dargestellt in Gelb) festgelegt wurde und sich so die konservierte Haarnadelstruktur 5BSL2 nicht ausbilden konnte, war das Ziel der Bestimmung der nächsten Primer-Bindungsstellen, diese wie in Abbildung 2.8 dargestellt zu erhalten. Die miR-122-Bindungsstelle sollte zusätzlich noch einzelsträngig vorliegen. Um dies zu testen, wurden für diese Erkennungssequenzen nur Primer für die Chimäre J6-JFH1 generiert, da diese für die nachfolgenden Funktionalitätsversuche eine bedeutendere Rolle spielt und zudem von mehr Mitgliedern der Arbeitsgruppe verwendet wird. Das neu generierte Primerpaar ist in der Abbildung 2.8 Blau dargestellt.



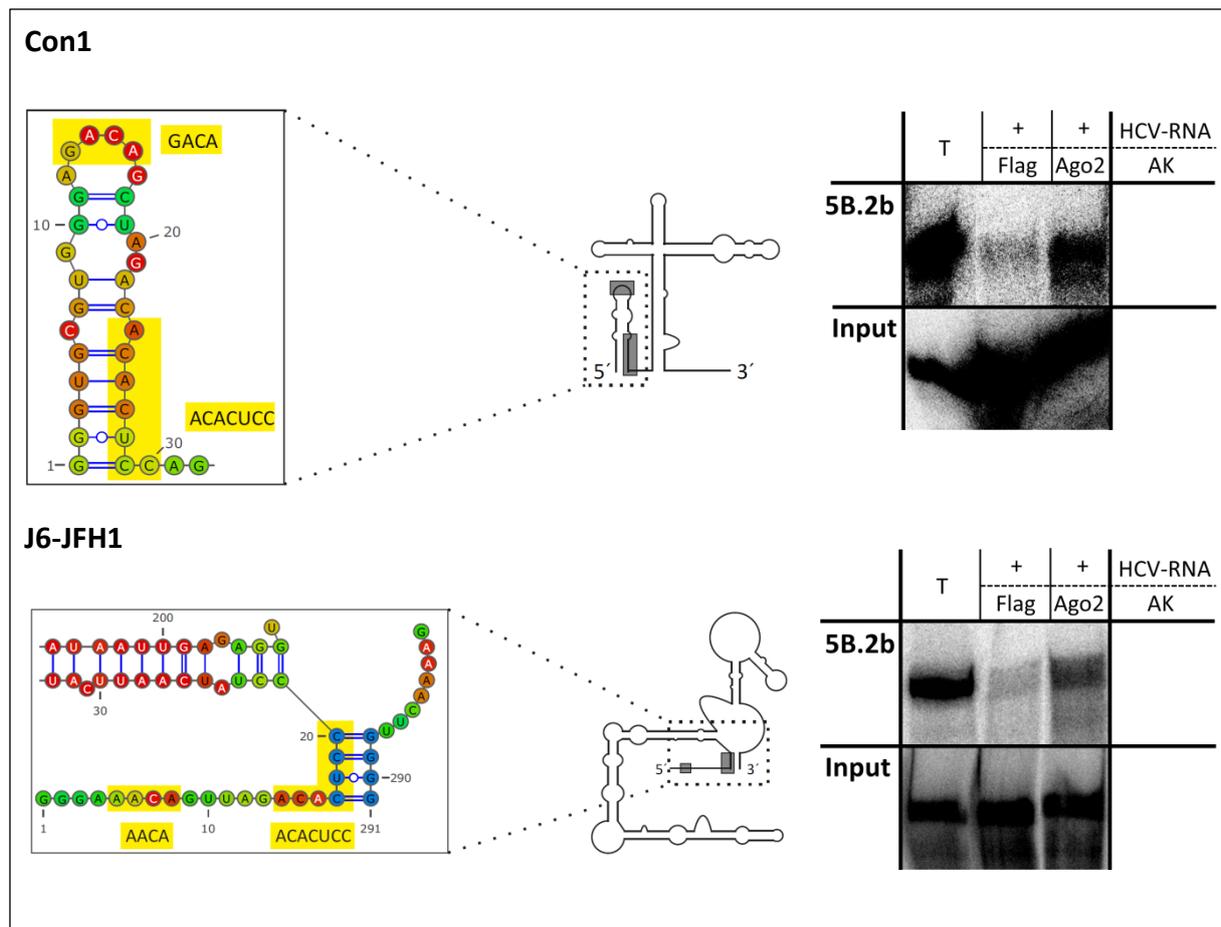
**Abbildung 2.8: Konservierte Sekundärstruktur um die miR-122-Bindungsstelle 5B.3**

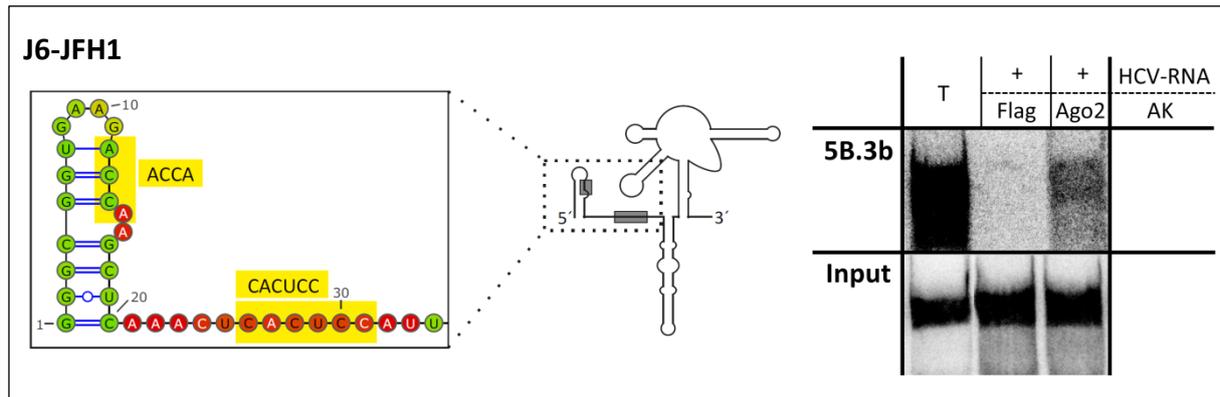
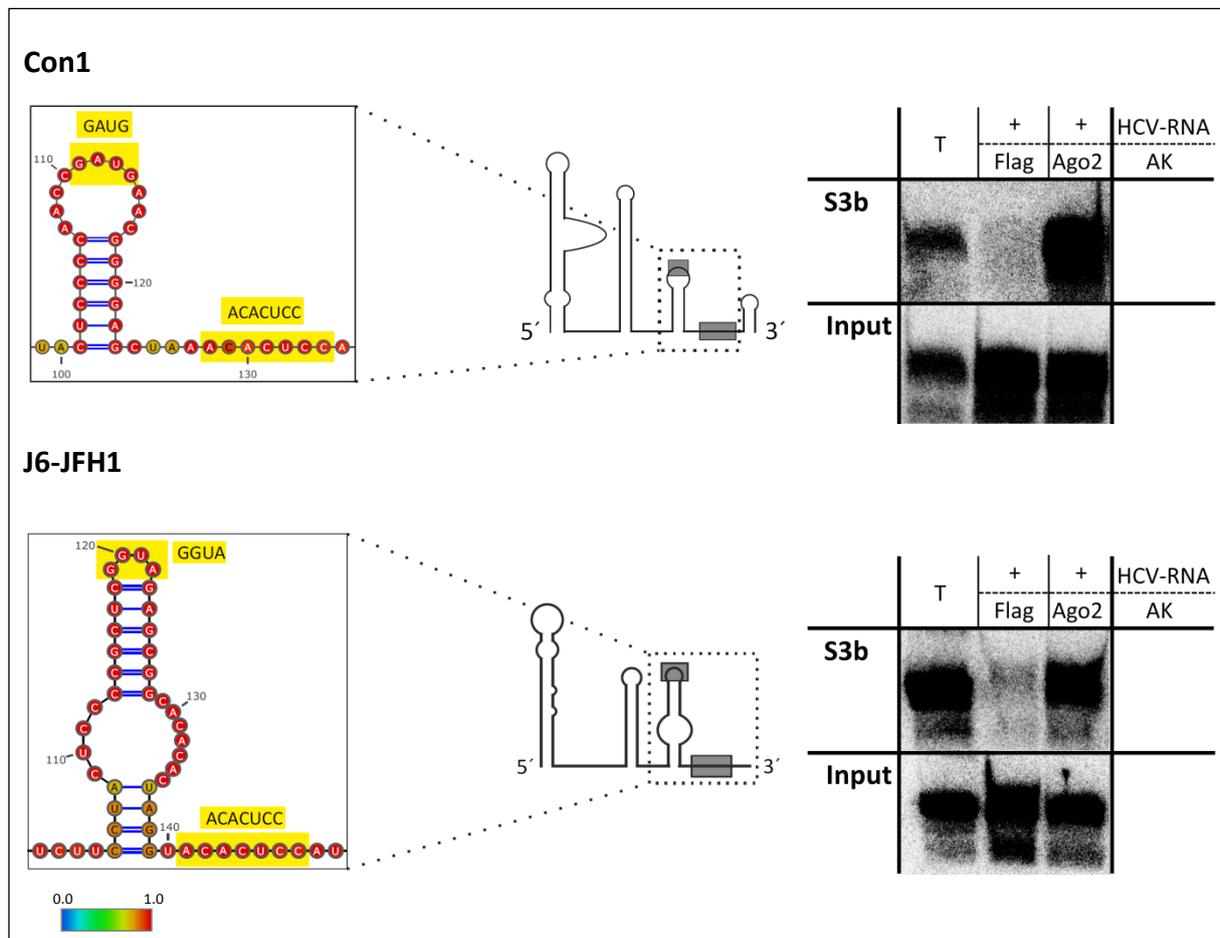
Dargestellt ist die Sekundärstruktur, welche sich um die miR-122-Bindungsstelle 5B.3 bildet. Eingezeichnet sind zusätzlich die verwendeten Primerpaare (Gelb: erstes Primerpaar, Blau: zweites Primerpaar) sowie die miR-122 *seed-target*-Sequenz 5B.3 in grün und die *supplemental*-Region in lila. Rot markiert ist das Stopp-Codon. SL: *stem-loop*, VR: variable Region, CRE-Element: *cis-acting replication element*

### 2.2.1.3 co-IPs auf Basis der mit ViennaRNAfold vorhergesagten RNA-Strukturen

Mit den neuen Transkripten konnte für jede der untersuchten miR-122-Bindungsstellen eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA nachgewiesen werden (exemplarisch gezeigt in Abbildung 2.9). Die Intensität der Bindung wurde wie in Kapitel 2.2 beschrieben mit dem OptiQuant-Programm berechnet. Für die Bindungsstelle 5B.2b im Isolat Con1 konnte im Vergleich zur Flag-Probe eine 3,6-fach stärkere miR-122-Bande detektiert werden, während für J6-JFH1 eine im Durchschnitt 3,1-fache Verstärkung berechnet wurde (Abbildung 2.9 A). Die nur für den Genotypen J6-JFH1 untersuchte miR-122-Bindungsstelle 5B.3b zeigt ebenfalls eine 3,6-fache stärkere Bindung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA (Abbildung 2.9 B). Die jedoch stärkste Bindung mit einer 4-fachen Verstärkung der Bindungsintensität konnte für S3b im Genotypen Con1 nachgewiesen werden. Für J6-JFH1 wurde eine Bindungsintensität von 3,6-fach ermittelt (Abbildung 2.9 C). Diese Werte sind berechnete Mittelwerte aus mehreren Experimenten, von denen in Abbildung 2.9 jeweils eines gezeigt ist.

#### A: RNA 5B.2b



**B: RNA 5B.3b****C: RNA S3b****Abbildung 2.9: HCV-RNA-Strukturen und co-IP-Experimente der miR-122-Bindungsstellen 5B.2b, 5B.3b und S3b**

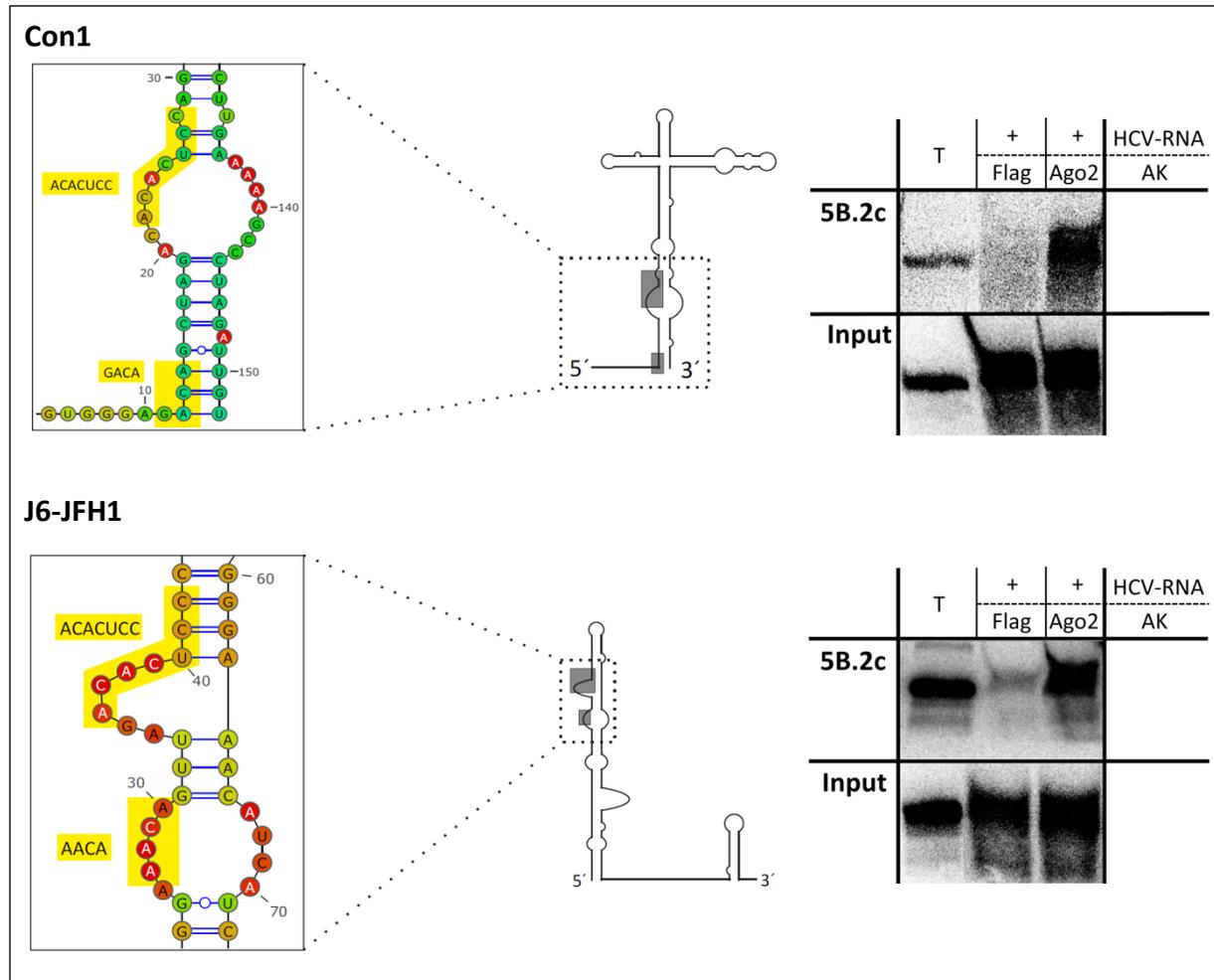
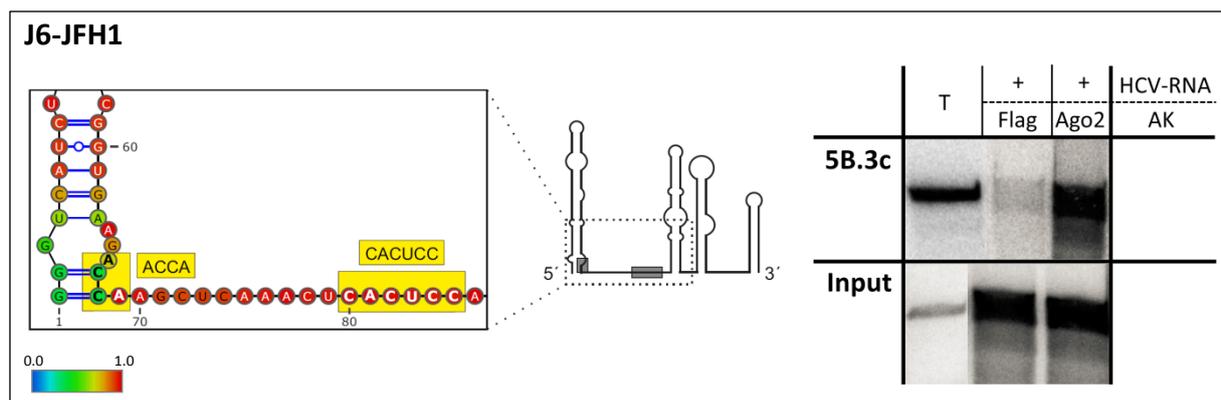
Die unter Kapitel 2.2.1.3 beschriebenen Sequenzen wurden mit dem ViennaRNAfold WebServer-Programm gefaltet. Abbildung (A): miR-122-Bindungsstelle 5B.2b für Con1 und J6-JFH1; (B): miR-122-Bindungsstelle 5B.3b für J6-JFH1 und (C): miR-122-Bindungsstelle S3b für Con1 und J6-JFH1. Links: Ausschnitt der HCV-RNA-Struktur mit der miR-122 *seed-target*- und *supplemental*-Region (gelb unterlegt). Der Farbcode gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die Basen in der dargestellten Konformation vorliegen, wobei Blau eher unwahrscheinlich und Rot sehr wahrscheinlich widerspiegelt. Mitte: schematische Darstellung der kompletten HCV-RNA-Struktur mit der *seed-target*- und *supplemental*-Region hervorgehoben in den grauen Kästchen. Rechts: ein zu den Strukturen exemplarisch dargestelltes co-IP-Experiment. Die obere Reihe zeigt die Immunopräzipitation mit den anti-Ago2- und Flag-Antikörpern (AK). Die mittlere Reihe stellt die reextrahierte radioaktive HCV-RNA aus 10 % des Zelllysates dar, welches bezüglich der co-IP als Input-Kontrolle diente. T: aufgetragenes Transkript, als Höhenmarker.

In Verbindung mit der Struktur (über 60% der *seed-target*-Sequenz liegt einzelsträngig vor) der einzelnen HCV-RNA-Fragmente deuten diese Ergebnisse auf eine Korrelation zwischen der Zugänglichkeit und der miR-122/Ago2-Komplex-Hybridisierung an die HCV-RNA hin. Unterstützt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass für die Bindungsstelle S3 die größte strukturelle Veränderung der vorhergesagten RNA-Sekundärstruktur von gering zugänglich zu gut zugänglich vorliegt und daher die stärkste Veränderung der Bindungsintensität zeigt. Zudem deutet die Bindung der miR-122 an die 5B.3 Bindungsstelle auf einen Einfluss der Sekundärstruktur über die Grenzen der eigentlichen Bindungsstelle hinweg hin (vergleiche Abbildung 2.6 B und Abbildung 2.9 B). Um diese Theorie nachzuprüfen, erfolgten für die Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region noch weitere co-IPs mit optimierten Primern. Die Bindungsstellen in der 3'-UTR wurden nicht weiter untersucht, da hier bereits eine sehr starke Bindung nachgewiesen werden konnte.

#### 2.2.1.4 Optimierte Primer für die Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region

Bei der Festlegung der nächsten Primerpaare lag das Hauptaugenmerk darauf, die miR-122-Bindungsstellen so zugänglich wie möglich für den miR-122/Ago2-Komplex zu erhalten. Dies bedeutet, dass sowohl die *seed-target*-Sequenz als auch zusätzlich die *supplemental*-Region möglichst einzelsträngig vorliegen und für 5B.3 die konservierte Sekundärstruktur möglichst erhalten bleiben sollte. Um die bestmöglichen Primer zu generieren, führte Markus Fricke aus der Arbeitsgruppe von Prof. Manja Marz (Jena) Faltungsstudien mit verschiedenen langen Fragmenten für 5B.2 (Con1 und J6-JFH1) und 5B.3 (J6-JFH1) durch. Im Fall dieser NS5B-Bindungsstellen wurden Abstände der Primer gewählt, welche den Abstand translatierender Ribosomen simulieren, um eine möglichst natürliche Formation der Sekundärstrukturen zu erlauben. Die so vorgeschlagenen Primer wurden dann verwendet, um erneut radioaktiv-markierte Transkripte herzustellen und co-IP-Versuche durchzuführen (Abbildung 2.10). Die Sequenz der Primer und der Transkripte befindet sich im Anhang 6.2.

Wie der Abbildung 2.10 zu entnehmen ist, konnte für alle drei untersuchten HCV-RNA-Fragmente eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes nachgewiesen werden. Für die Bindungsstelle 5B.2c konnte sowohl für Con1 als auch für J6-JFH1 eine im Vergleich zu den zweiten co-IPs messbare Verstärkung bei der Bindungsintensität festgestellt werden (exemplarisch in der Abbildung 2.10 A dargestellt). Für Con1 wurde eine durchschnittliche Verbesserung auf das 4,7-fache der Flag-Kontrolle und für J6-JFH1 eine 3,8-fache Steigerung erzielt. Die Bindungsintensität für 5B.2c konnte im Isolat Con1 also fast verdoppelt werden. Die jedoch stärkste Bindung (8,1-fach über der Kontrolle) konnte bei 5B.3c mit J6-JFH1 nachgewiesen werden (Abbildung 2.10 B). Dies deutet darauf hin, dass die Sekundärstruktur, welche um die eigentliche Bindungsstelle liegt, eine wichtige Rolle bei der Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA spielt.

**A: RNA 5B.2c****B: RNA 5B.3c****Abbildung 2.10: HCV-RNA-Strukturen und co-IP-Experimente der miR-122-Bindungsstellen 5B.2c und 5B.3c**

Die unter Kapitel 2.2.1.4 beschriebenen Sequenzen wurden mit dem ViennaRNAfold WebServer Programm gefaltet. Abbildung (A): miR-122-Bindungsstelle 5B.2c für Con1 und J6-JFH1 und (B): miR-122-Bindungsstelle 5B.3c von J6-JFH1. Links: Ausschnitt der HCV-RNA-Struktur mit der miR-122 *seed-target*- und *supplemental* Region (gelb unterlegt). Der Farbcode gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die Basen in der dargestellten Konformation vorliegen, wobei Blau eher unwahrscheinlich und Rot sehr wahrscheinlich wiederspiegelt. Mitte: schematische Darstellung der kompletten HCV-RNA-Struktur mit der *seed-target*- und *supplemental*-Region hervorgehoben in den grauen Kästchen. Rechts: ein zu den Strukturen exemplarisch dargestelltes co-IP-Experiment. Die obere Zeile zeigt die Immunopräzipitation mit den anti-Ago2- und Flag-Antikörpern (AK). Die mittlere Zeile stellt die reextrahierte radioaktive HCV-RNA aus 10 % des Zelllysates dar, welches bezüglich der co-IP als Input-Kontrolle diente. T: aufgetragenes Transkript, als Höhenmarker.

## 2.2.2 Zugänglichkeit der Bindungsstellen des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA

Die Experimente für den Nachweis einer miR-122-Bindung an die HCV-RNA (Kapitel 2.2.1) führte zu dem Schluss, dass die Zugänglichkeit der Erkennungssequenzen in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR eine Rolle für die Interaktion des miR-122/Ago2-Komplexes mit der HCV-RNA spielt. Um diese Beobachtung zu überprüfen wurde für jede Base der jeweiligen miR-122-Bindungsstelle die *single strand probability (ssp)* der RNA-Struktur berechnet.

Dazu wurden die HCV-Sequenzen der jeweiligen Primerpaare in das RNAFold-Programm geladen und mit folgenden Einstellungen analysiert:

1. *Fold algorithms and basic options: minimum free energy (MFE) and partition function, avoid isolated base pairs*
2. *Advances folding options: no dangling end energies, Turner model 2004.*

Das Programm berechnet die energetisch günstigste und somit am wahrscheinlichsten vorliegende Struktur. Somit wird angegeben, welche Bereiche einzel- und doppelsträngig vorliegen. Für jede einzelne Base wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, in genau dieser Konformation vorzuliegen. Liegt die Base gebunden in einer Haarnadelstruktur vor, beschreibt die ermittelte Wahrscheinlichkeit die *base pair probability (bpp)*, während bei einzelsträngigem Vorliegen die *ssp* angegeben ist. Um die *ssps* der kompletten (*complete*) miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR bestimmen zu können, muss zunächst für jede doppelsträngig vorliegende Base der *seed-target-* und *supplemental-*Region die *ssp* berechnet werden. Dies erfolgte durch Subtrahieren der angegebenen Wahrscheinlichkeit von dem Wert 1. Danach wird der Mittelwert der einbezogenen *ssps* berechnet. Die Werte in Tabelle 2.2 geben somit an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass die Basen der kompletten miR-122-Bindungsstellen einzelsträngig vorliegen. Zudem ist der Mittelwert für die Bindungsstärke der co-IP-Experimente angegeben.

**Tabelle 2.2: *single strand probability (ssp)* und Bindungsstärke der kompletten miR-122-Bindungsstellen 5B.2, 5B.3, S3**

Aufgelistet sind die Primer der drei miR-122-Bindungsstellen für die Klone Con1 und J6-JFH1 mit der *ssp* der jeweiligen Bindungsstelle und der dazugehörigen durchschnittlichen Bindungsstärke. Bindungsstellen, für die kein Primerpaar vorlag, sind mit einem (-) dargestellt.

Primer	Klon	miR-122-Bindungsstellen					
		5B.2		5B.3		S3	
		<i>ssp</i>	Bindungsstärke	<i>ssp</i>	Bindungsstärke	<i>ssp</i>	Bindungsstärke
A	Con1	0,49	1,54	0,64	0,91	0,59	1,09
	J6-JFH1	0,77	1,68	0,88	1,24	0,81	2,30
B	Con1	0,58	3,62	-	-	0,98	2,70
	J6-JFH1	0,85	3,12	0,77	3,64	0,99	4,35
C	Con1	0,70	4,74	-	-	-	-
	J6-JFH1	0,76	3,75	0,88	8,15	-	-

Es ist zu erkennen, dass die drei untersuchten miR-122-Bindungsstellen für Con1 von Primerpaar A nach Primerpaar C eine höhere Wahrscheinlichkeit aufzeigen einzelsträngig vorzuliegen. Ebenso verhält es sich für die miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR von J6-JFH1. Diese Beobachtung, zusammen mit der ermittelten Intensität der co-IPs, zeigt eine Abhängigkeit der Bindungsintensität des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA mit der Zugänglichkeit der Bindungsstelle. Ein solch klarer Zusammenhang kann für die Erkennungssequenzen in der NS5B-kodierenden Region allerdings nicht erfolgen, obwohl sich für 5B.3 die Bindungsintensität fast verdreifacht.

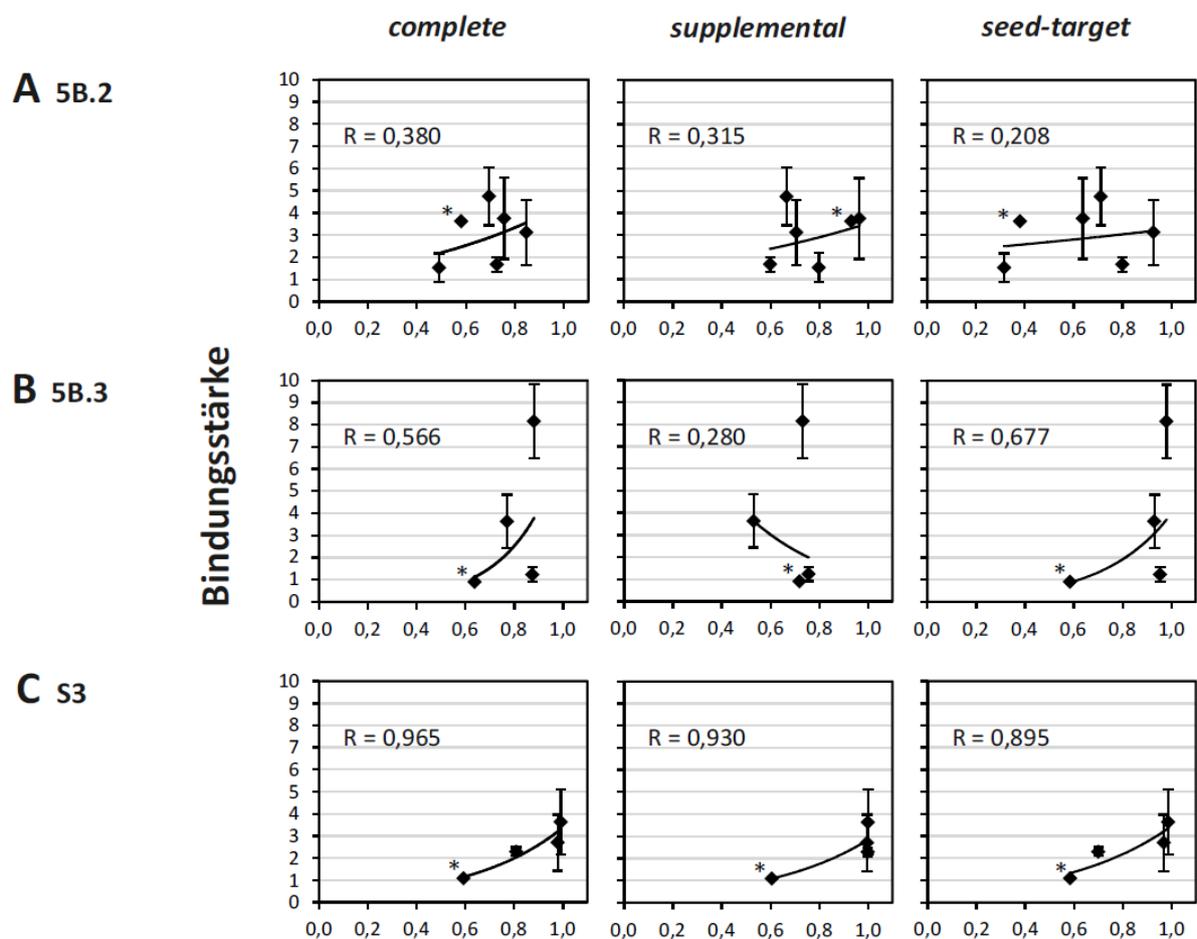
In den nachfolgenden Abschnitten wird die Korrelation zwischen Bindungsstärke und Zugänglichkeit genauer untersucht.

### 2.2.2.1 Bindungsstärke der miR-122 an die HCV-RNA

Da Dominik Conrad in seiner Dissertation erste Hinweise darauf gegeben hat, dass die *supplemental*-Region für eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA von Bedeutung zu sein scheint, wurden die miR-122-Bindungsstellen für eine detailliertere Analyse der Korrelation zwischen Zugänglichkeit und Bindungsstärke zunächst in drei Regionen eingeteilt:

1. *complete*-Bindungsstelle (*seed-target*- und *supplemental*)
2. nur die *seed-target*-Sequenz
3. nur die *supplemental*-Region.

Für eine graphische Darstellung wurde die Zugänglichkeit der jeweiligen Region gegen die Bindungsstärke aufgetragen (Abbildung 2.11), wobei sich die Bindungsstärke aus dem Mittelwert (n = 3) der quantifizierten co-IP-Experimente ergibt.



**Abbildung 2.11: Korrelation von Bindungsstärke und Zugänglichkeit der miR-122-Bindungsstellen für 5B.2, 5B.3 und S3**

Die berechnete Intensität der Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die drei Regionen der Bindungsstellen 5B.2 (A), 5B.3 (B) und S3 (C), aufgetragen gegen die Zugänglichkeit der Erkennungssequenzen. Die Intensität für jede Bindungsstelle aus den co-IP-Experimenten wurde mit dem Programm OptiQuant quantifiziert und die *single strand probability* (*ssp*) wie oben beschrieben berechnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. R: Korrelationskoeffizient. \*: n = 1

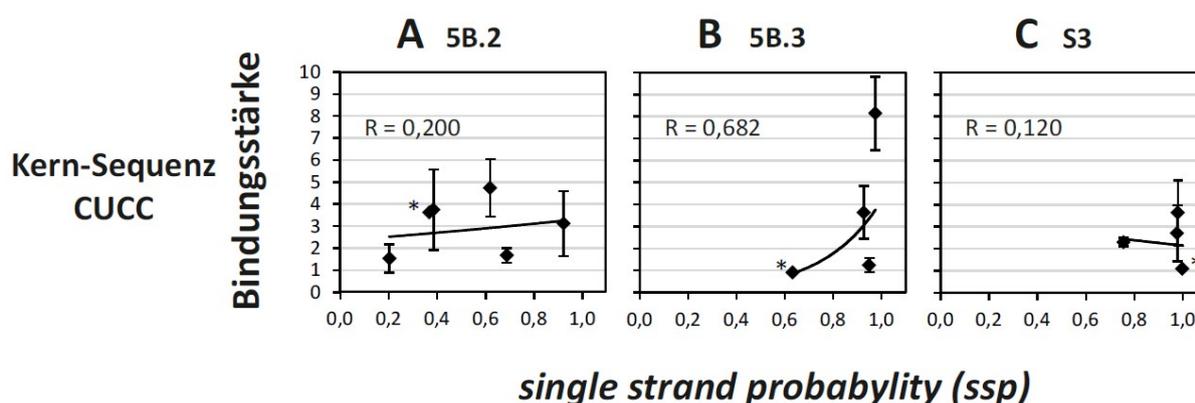
Die dargestellten Ergebnisse zeigen für die *complete*-miR-122-Bindungsstelle S3 mit einem Korrelationskoeffizienten von über 0,9 einen starken Zusammenhang zwischen der Bindungsstärke und der Zugänglichkeit. Für 5B.2 und 5B.3 dagegen konnte mit Werten von  $R = 0,380$  und  $R = 0,566$  nur eine geringe Korrelation ermittelt werden. Diese Aussage bestätigt das in Tabelle 2.2 gezeigte Ergebnis.

Für die Bindungsstelle 5B.2 entspricht der Korrelationskoeffizient der *supplemental*-Region mit  $R = 0,315$  in etwa der der *complete*-Bindungsstelle, während er bei der Betrachtung der *seed-target*-Sequenz auf  $R = 0,208$  sinkt. Die Bindungsstelle 5B.3 dagegen zeigt deutliche Unterschiede bei der Betrachtung der einzelnen Regionen. Während der Korrelationskoeffizient für die *supplemental*-Region sogar eine negative Korrelation aufweist, kann für die *seed-target*-Sequenz eine Steigerung beobachtet werden,  $R = 0,677$ . Dies zeigt, dass die *supplemental*-Region nicht wesentlich zur Bindung der miR-122 an die HCV-RNA beiträgt. Die sehr gute Korrelation der

S3-Bindungsstelle wird durch die Unterteilung nicht beeinflusst und bleibt mit einem Wert von  $R = 0,930$  für die *supplemental*-Region und  $R = 0,895$  für die *seed-target*-Sequenz sehr hoch.

### 2.2.2.2 Korrelation der Zugänglichkeit der Kern-Sequenz der miR-122 mit der Bindungsstärke

Die Nukleotide 2–5 des miRNA-Führungsstrangs spielen eine bedeutende Rolle bei der initialen Phase der Bindung an die Ziel-RNA. Sie wird daher auch als Kern-Sequenz bezeichnet. Diese Nukleotide hybridisieren in einer offen für die Ziel-RNA (meist mRNA) zugänglichen Falte des Ago2-Proteins und sind somit verantwortlich für die initiale Ausbildung des miR-122/Ago2-Ziel-RNA-Komplexes, wohingegen die anderen Nukleotide zunächst weniger zugänglich sind [103]. Um zu sehen, in wie weit die Kern-Sequenz an der Bindungsstärke der miR-122 beteiligt ist wird ihre Zugänglichkeit ebenfalls in Korrelation zur Bindungsstärke gesetzt (Abbildung 2.12).



**Abbildung 2.12: Korrelation von Bindungsstärke und Zugänglichkeit der miR-122 Kern-Sequenz für 5B.2, 5B.3 und S3**

Die Intensität der Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region 5B.2 (A), 5B.3 (B) und der 3'-UTR S3 (C), aufgetragen gegen die Zugänglichkeit der Bindungsstelle. Die Intensität für jede Bindungsstelle aus den co-IP-Experimenten wurde mit dem Programm OptiQuant quantifiziert. Für die Berechnung der *single strand probability (ssp)* wurden nur die zur Kern-Sequenz komplementären Nukleotide herangezogen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. R: Korrelationskoeffizient. \*: n = 1

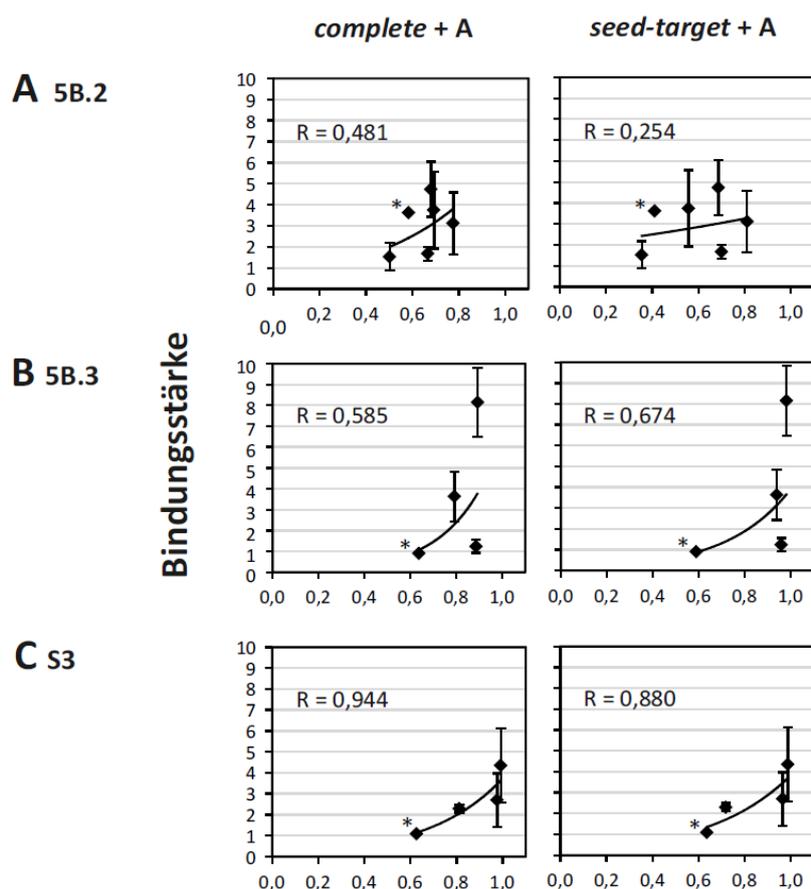
Diese Betrachtungsweise zeigt, dass die Korrelation zwischen Bindungsstärke und Zugänglichkeit dieser Kern-Sequenz für die Bindungsstelle 5B.3 der entspricht, die auch für die *seed-target*-Sequenz ermittelt wurde (Abbildung 2.11 B). Die geringe Korrelation der Bindungsstelle 5B.2 wird durch die Betrachtung der Kern-Sequenz nochmals bestätigt und liegt bei  $R = 0,200$ , sehr ähnlich wie für die *seed-target*-Sequenz (Abbildung 2.11 A). Für S3, welche eine starke Korrelation für die einzelnen Regionen der miR-122-Bindungsstelle aufweist, konnte dagegen keinerlei Korrelation zwischen der Kern-Sequenz und der Bindungsstärke nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Bindungsstelle in der 3'-UTR im Ganzen, mindestens aber die *seed-target*-Sequenz, für die Anlagerung des miR-122/Ago2-Komplexes benötigt wird.

### 2.2.2.3 Zugänglichkeit eines Adenosins korreliert mit der Bindungsstärke

Es konnte gezeigt werden, dass ein Adenosin (A) direkt strangabwärts der *seed-target*-Sequenz in den meisten miR-122 Zielsequenzen vorhanden ist [102; 147]. Es kann direkt in die Tasche des Ago2-Proteins binden [103] und trägt vermutlich zur Zielsequenzbindung bei.

Für die miR-122-Bindungsstelle 5B.2 konnte ein solches Adenosin in 70 von 106 Isolaten nachgewiesen werden, für 5B.3 in 101 von 106 und in 56 von 94 Isolaten von S3 (Anhang 6.1). Diese deutliche Konservierung veranlasste dazu ein vorhandenes A in die Berechnungen der Korrelation zwischen Zugänglichkeit und Bindungsstärke zu integrieren.

War ein Adenosin strangabwärts der *seed-target*-Sequenz vorhanden wurde der entsprechende Wert für die *ssp* in die Berechnung des Mittelwertes der miR-122-Bindungsstellen einbezogen. Wies eine Sequenz kein Adenosin auf, wurde die *ssp* für das stattdessen vorhandene Nukleotid auf null gesetzt und dieser Wert bei der Mittelwertberechnung für die *ssp* der gesamten Bindungsstelle mit einbezogen. Die Einbeziehung eines Adenosins erfolgte für die *complete*-Bindungsstelle und die *seed-target*-Sequenz (Abbildung 2.13).



**Abbildung 2.13: Korrelation von Bindungsstärke und Zugänglichkeit der miR-122-Bindungsstellen für 5B.2, 5B.3 und S3 unter Einbeziehung eines Adenosins**

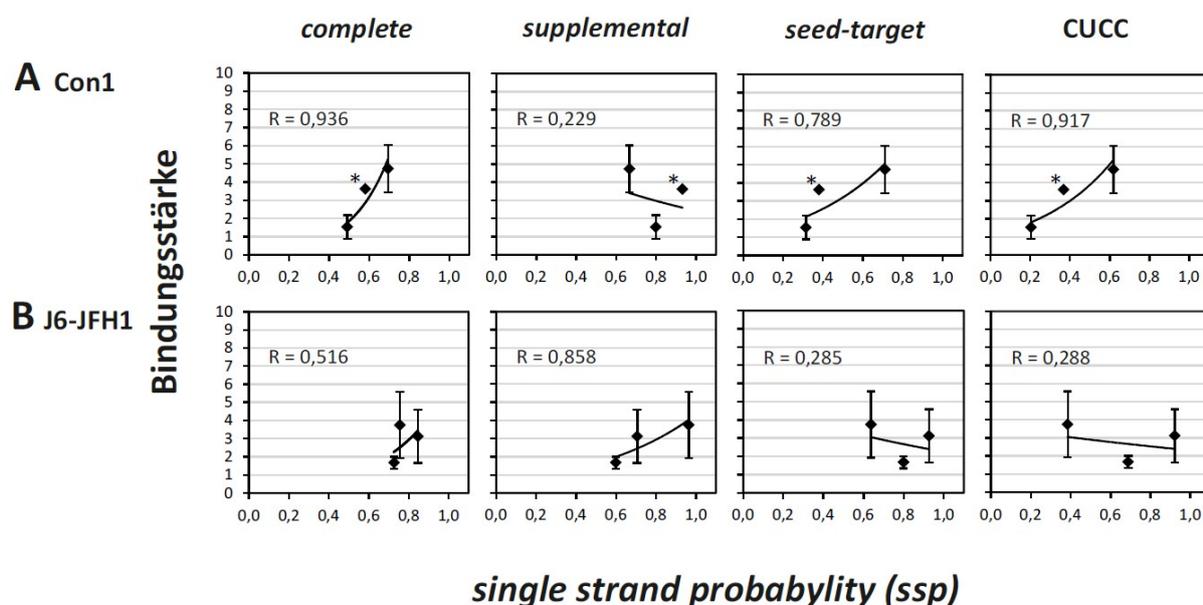
Die berechnete Intensität der Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an zwei Regionen der miR-122-Bindungsstellen 5B.2 (A), 5B.3 (B) und S3 (C), aufgetragen gegen die Zugänglichkeit der Bindungsstelle. Die Intensität für jede Bindungsstelle aus den co-IP-Experimenten wurde mit dem Programm OptiQuant quantifiziert. Die *single strand probability (ssp)* wurde wie oben beschrieben berechnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. R: Korrelationskoeffizient. \*: n = 1

Wird das Adenosin bei der Berechnung der *ssp* berücksichtigt zeigt sich nur bei der *complete*-miR-122-Bindungsstelle 5B.2 eine Steigerung der Korrelation zwischen Bindungsstärke und Zugänglichkeit von  $R = 0,380$  (Abbildung 2.11 A) auf  $R = 0,481$  (Abbildung 2.13 A). Ebenso sieht man bei der Betrachtung der *seed-target*-Sequenz der Erkennungssequenz 5B.2 eine Steigerung der Korrelation von  $R = 0,208$  (Abbildung 2.11 A) auf  $R = 0,254$  (Abbildung 2.13 A) bei Einbeziehung des Adenosins. Für die beiden anderen untersuchten Bindungsstellen (5B.3 und S3) ändert sich der Korrelationskoeffizient im Vergleich zu dem unter Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen nicht wesentlich. Somit scheint das Adenosin durchschnittlich gesehen wenig bis keinen direkten Einfluss bei der Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die Zielsequenz zu haben. Allerdings legen obige Daten die Vermutung nahe, dass solche Bindungsstellen, bei denen die Zugänglichkeit stark von den umgebenden Sequenzen abhängig und durchschnittlich eher niedrig ist (wie bei der Bindungsstelle 5B.2), das zusätzliche Adenosin am ehesten eine Rolle spielt.

#### 2.2.2.4 Abhängigkeit der Bindung vom verwendeten HCV-Isolat

Die in dieser Arbeit verwendeten Isolate Con1 (1b) und J6-JFH1 (2a) unterscheiden sich nicht nur in der Häufigkeit ihres geographischen Vorkommens sondern auch im Krankheitsverlauf und dadurch in der Art der Therapieform [149]. Zudem ist das Genom von Con1 um 100 Nukleotide kürzer als von J6-JFH1 und in der NS5-Region besteht nur eine 64 % Übereinstimmung innerhalb der Nukleotidsequenz. Wie auch in der Tabelle 2.2 zu erkennen ist unterscheiden sich die *ssps* zwischen Con1 und J6-JFH1 teilweise sehr deutlich. Da für 5B.2 am meisten Datenpunkte vorhanden sind erfolgte hier eine Separierung der Isolate voneinander. Dazu wurde ebenfalls die Bindungsstärke gegen die Zugänglichkeit der miR-122-Bindungsstelle aufgetragen und zwar jeweils für die *complete*-Bindungsstelle, die *supplemental*-Region, die *seed-target*-Sequenz und für die Kern-Sequenz CUCC.

Wie in Abbildung 2.14 zu erkennen ist besteht bei dem Isolat Con1 eine stärkere Korrelation zwischen Bindungsstärke und Zugänglichkeit der miR-122-Bindungsstelle als bei J6-JFH1. Während für Con1 sowohl für die *complete*-Bindungsstelle als auch für die *seed-target*- und die Kern-Sequenz ein Korrelationskoeffizient von bis zu  $R = 0,9$  vorliegt, zeigt sich bei J6-JFH1 in diesen drei Region eine geringere bzw. eine negative Korrelation. Einzig die *supplemental*-Region weist für J6-JFH1 mit einem Korrelationskoeffizienten von  $R = 0,858$  einen starken Zusammenhang zwischen Bindungsstärke und Zugänglichkeit auf, wohingegen Con1 in dieser Region eine negative Korrelation zeigt.



**Abbildung 2.14: Korrelation von Bindungsstärke und Zugänglichkeit an die miR-122-Bindungsstelle 5B.2 in Abhängigkeit vom verwendeten Genotyp**

Die berechnete Intensität der Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die Bindungsstelle 5B.2 für die Genotypen Con1 (A) und J6-JFH1 (B), aufgetragen gegen die Zugänglichkeit der Bindungsstelle. Die Intensität für jede Bindungsstelle aus den co-IP-Experimenten wurde mit dem Programm OptiQuant quantifiziert. Die *single strand probability (ssp)* wurde wie oben beschrieben berechnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. R: Korrelationskoeffizient. \*:  $n = 1$

## 2.3 Einfluss einer Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA

In den weiterführenden Experimenten sollte zum einen die Bedeutung der *supplemental*-Region bei einer miR-122-Bindung an die Erkennungssequenz in der 3'-UTR untersucht werden, zum anderen der Einfluss dieser Bindungsstelle auf die Translation. Außerdem sollte die Bedeutung aller drei miR-122-Bindungsstellen auf die Funktionalität der Replikation betrachtet werden. Um diese Versuche durchführen zu können, mussten zunächst Konstrukte mit mutierten Erkennungssequenzen hergestellt werden. Dabei wurde nur die RNA-Sequenz des Genotyps J6-JFH1 verwendet, da es nur mit diesem möglich ist virale Partikel herzustellen.

Dafür mussten zunächst Nukleotide ausgetauscht werden, welche in der NS5B-kodierenden Region zu keinem Aminosäure-Austausch führen und die RNA-Struktur nicht verändern. Dadurch kann in den folgenden co-IP-Experimenten durch Mitführen der Wildtyp-RNA als Positivkontrolle nachgewiesen werden, ob durch die Mutation eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die jeweilige Bindungsstelle unterbunden wird. Die Strukturhaltung war auch für die Mutation in der 3'-UTR eine wichtige Voraussetzung. Zudem wurde diese miR-122-Bindungsstelle in drei Bereiche untergliedert: Mutationen nur in der *supplemental*-Region ( $S3_{su,m}$ ), nur in der *seed-target*-Sequenz ( $S3_{se,m}$ ) und in der *complete*-Bindungsstelle ( $S3_{co,m}$ ).

Da Dominik Conrad in seiner Dissertation Hinweise dafür gefunden hatte, dass die *supplemental*-Region dieser Bindungsstelle eine wichtige Rolle bei der Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA spielt, sollte dies hier genauer untersucht werden. Außerdem sollten die integrierten Nukleotidaustausche in allen miR-122 Zielsequenzen verschieden sein, aber auch unterschiedlich zu den bereits vorhandenen Mutationen in den miR-122-Bindungsstellen der 5'-UTR (S1m und S2m). So ist es möglich, jede Bindungsstelle mit ihrer komplementären mutierten miR-122 einzeln zu adressieren, um eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die jeweilige Bindungsstelle wieder herzustellen.

### 2.3.1 Generieren von Mutationen in den miR-122-Bindungsstellen

Da für die miR-122-Bindungsstellen 5B.2 und 5B.3 die AS-Sequenzen erhalten bleiben müssen, waren die Möglichkeiten für Nukleotidaustausche sehr begrenzt, zumal bekannt war, dass ein Austausch von 2 Nukleotiden am besten für eine Mutation geeignet ist [98] und bereits Mutationen in der 5'-UTR vorlagen. Dennoch war es möglich, für beide Stellen Mutationen zu finden, welche keinen Einfluss auf die RNA-Sekundärstruktur haben und im Leserahmen liegen (Tabelle 2.3).

Eine Mutation für die *seed-target*-Sequenz in der 3'-UTR zu generieren, gestaltete sich um einiges leichter, da dort nicht auf die AS-Sequenz geachtet werden musste. Dies galt jedoch nicht für die Mutation in der *supplemental*-Region, von welcher 2 Nukleotide in die NS5B-kodierende Region ragen und 2 weitere Nukleotide Teile des Stopp-Codons darstellen. Aufgrund dieser Tatsache und des Wissens, dass ein Guanin nicht nur mit einem Cytosin paaren kann, sondern ebenso mit einem Uracil [150], war es nicht möglich, eine Mutation zu finden, welche keinen AS-Austausch hervorruft. Da das Stopp-Codon für die geplanten Replikationsversuche auf jeden Fall erhalten bleiben musste, konnte nur die letzte AS ausgetauscht werden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass diese nicht durch eine in ihren biochemischen Eigenschaften vollkommen unterschiedliche AS ersetzt wird. Daher erfolgte ein Austausch vom positiv geladenen Arginin zum neutralen Alanin. Die Sequenzen der Mutationen sind in Tabelle 2.3 gezeigt.

**Tabelle 2.3: Mutationen der miR-122-Bindungsstellen in der 5'-UTR, der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR**

Mutierte Nukleotide sind in unterstrichen.

Vorkommen	Bezeichnung	Sequenz
5'-UTR	S1m	AG <u>ACT</u> AC
5'-UTR	S2m	CT <u>AT</u> CC
NS5B	5B.2m	ACAC <u>AG</u> C
NS5B	5B.3m	<u>GAC</u> ACC
3'-UTR	S3 <sub>su</sub> m	<u>GCCT</u> AGAGCGGCACACACTAGGTACTACTCC
3'-UTR	S3 <sub>se</sub> m	CGGTAGAGCGGCACACACTAGGTACT <u>CTGC</u>
3'-UTR	S3 <sub>co</sub> m	<u>GCCT</u> AGAGCGGCACACACTAGGTACT <u>CTGC</u>

Um die Mutationskonstrukte herzustellen, wurde eine *in vitro*-Mutagenese-PCR (Kapitel 4.2.3.2.2) durchgeführt. Bei dieser Methode erfolgt eine Amplifikation des gesamten Plasmides. Sie eignet sich somit nur für Plasmide mit einer Größe von bis zu 7000 bp. Für die geplanten Experimente mussten sechs verschiedene Ausgangsplasmide mit den jeweiligen Mutationen generiert werden, zum einen Translationskonstrukte, um den Einfluss der miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR auf die Translation zu untersuchen, und zum anderen Plasmide für Replikationsversuche.

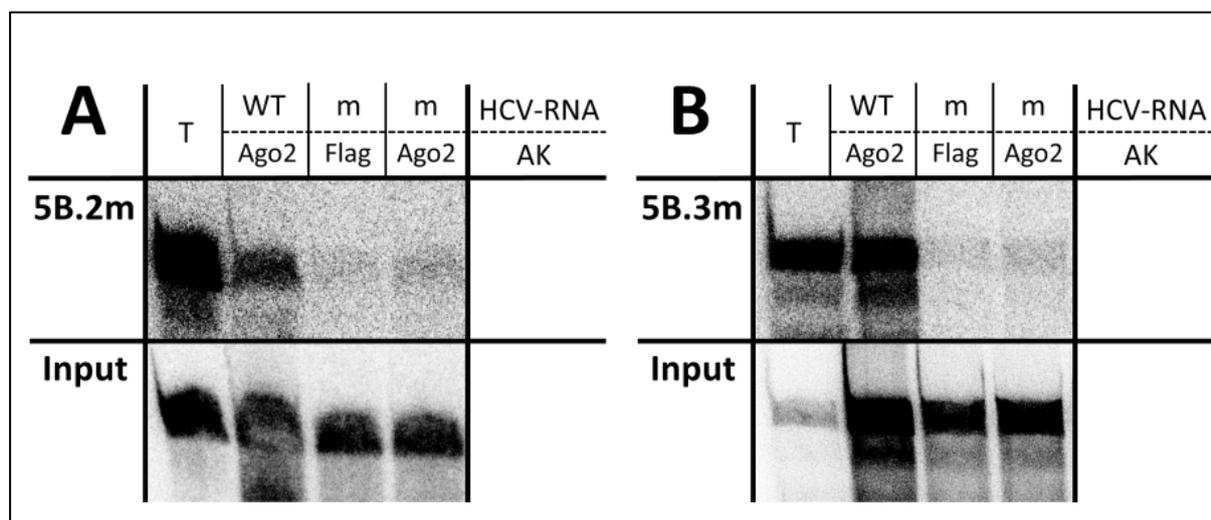
Die für die Translationsversuche verwendeten Ausgangsplasmide, pUC18\_J6/JFH1\_hRLuc (5'-UTR mutiert sowie nicht mutiert) enthalten einen T7-Promotor, die 5'-UTR, die *Renilla Luciferase*, die letzten 20 Basen der NS5B-kodierenden Region und die 3'-UTR (Anhang 6.4.6). Die Plasmide weisen eine Größe von ca. 4300 bp auf. Somit konnte direkt mit der *in vitro*-Mutagenese der drei Regionen in der 3'-UTR begonnen werden.

Die verwendeten Ausgangsplasmide, pUC18\_P.s\_WT\_SLI-II (5'-UTR mutiert sowie nicht mutiert) für die Replikationsversuche sind von Lyudmila Shalamova (Arbeitsgruppe Prof. Niepmann, unpublizierte Daten) hergestellte Minimalkonstrukte, welche u.a. eine veränderte IRES-Struktur enthalten. Da sie mit knapp 10.000 bp sehr groß sind, musste zunächst kloniert werden. Die Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Als erstes wurde die zu mutierende HCV-RNA von J6-JFH1 in ein pUC18 Grundgerüst kloniert. Das DNA-Stück war ca. 1000 bp lang und enthielt die miR-122-Bindungsstellen der NS5B-kodierenden Region und die komplette 3'-UTR. Das daraus resultierende Plasmid (pUC18\_J6/JFH1\_NS5B-3'-UTR; Anhang 6.4.3) war 3669 bp lang, wodurch direkt mit der Mutagenese begonnen werden konnte. Anschließend wurden die verschiedenen mutierten DNA-Fragmente in die Minimalkonstrukte (5'-UTR: 1. Mutiert und 2. Nicht mutiert) zurück kloniert. Durch diese Art der Vorgehensweise entstanden eine Reihe von Plasmiden (Kapitel 4.1.9). Die während des Zwischenschritts entstanden Plasmide pUC18\_J6/JFH1\_NS5B-3'-UTR dienten als Template für die nachfolgenden Mutationsversuche.

### 2.3.2 Überprüfung der Mutationen mittels co-IP

Bevor mit den Translations- und Replikations-Experimenten begonnen werden konnte, musste zunächst mit Hilfe der co-IP nachgewiesen werden, ob die eingefügten Mutationen tatsächlich eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA unterbinden. Zur Überprüfung wurden die unter Kapitel 2.2.1 beschriebenen Primerpaare, 5B.2c, 5B.3c und S3b, zur Herstellung der radioaktiv-markierten mutierten sowie nicht mutierten HCV-RNA-Sequenzen verwendet.

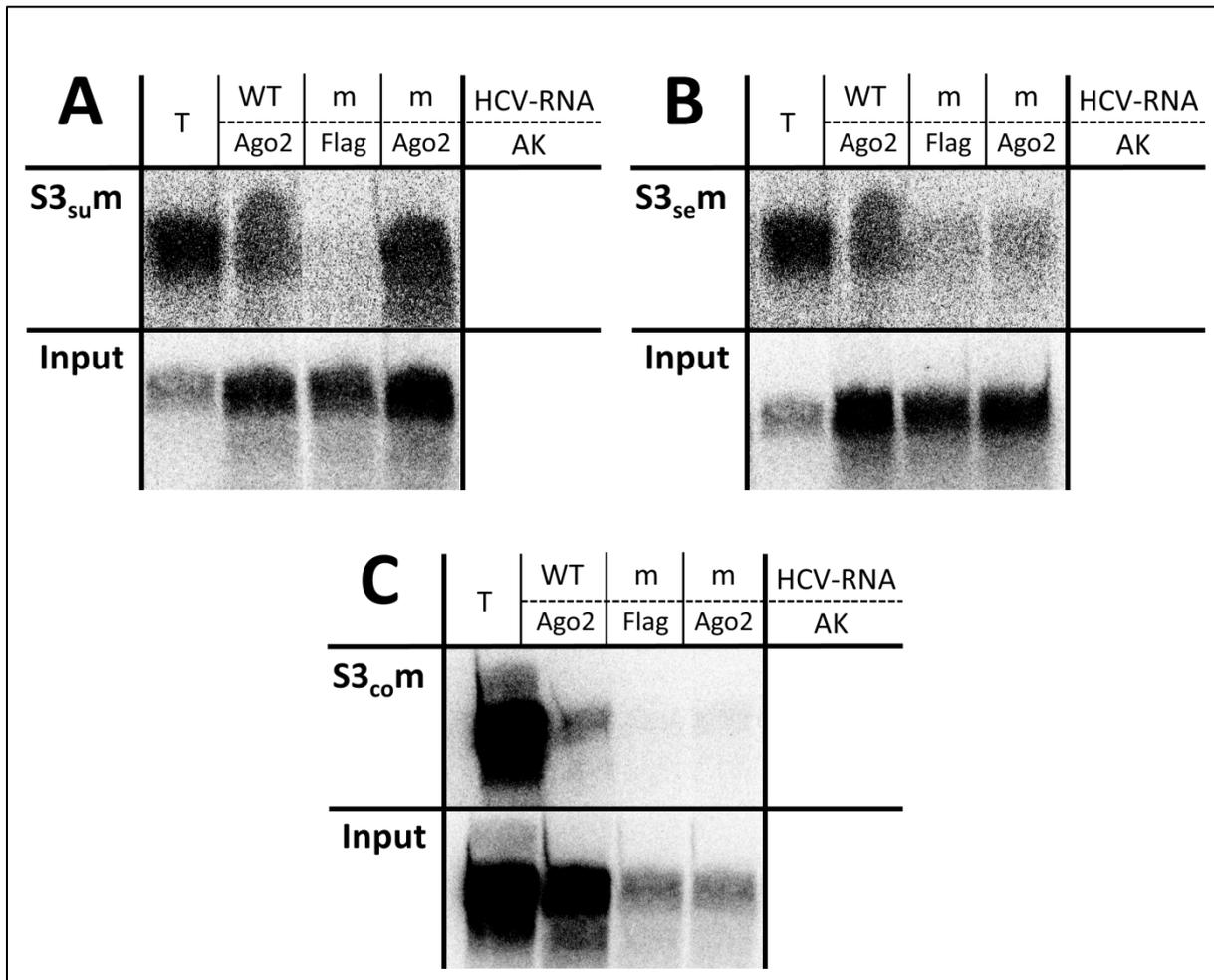
Für die co-IPs wurden HeLa-Zellen mit der mutierten HCV-RNA und der Wildtyp (WT) miR-122 transfiziert und daraus nach 6 h miR-122/Ago2-HCV-RNA-Komplexe immunopräzipitiert. Als Positivkontrolle diente die Wildtyp-RNA. Es handelte sich somit um verschiedene Transkripte, die für die Transfektion der Zellen benutzt wurden. Dadurch erklären sich die teils unterschiedlich starken Banden der Input-Proben. Die nachfolgenden Abbildung 2.15 und Abbildung 2.16 zeigt die co-IP-Ergebnisse für jede der mutierten miR-122-Bindungsstellen.



**Abbildung 2.15: co-IP-Experimente der mutierten HCV-RNAs mit den Bindungsstellen 5B.2m und 5B.3m**

Dargestellt ist exemplarisch jeweils ein durchgeführtes co-IP-Experiment für die mutierten miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region, 5B.2m (**A**) und 5B.3m (**B**). Die obere Reihe jeder Tabelle zeigt die Immunopräzipitation mit den anti-Ago2- und Flag-Antikörpern (AK). Die untere Reihe stellt die reextrahierte RNA aus 10 % des Zelllysates dar, welches als Input-Kontrolle dient. T: aufgetragenes Transkript als Höhenmarker. WT: Wildtyp-RNA als Positivkontrolle, m: mutierte RNA. Transfiziert wurden alle Proben mit der Wildtyp-miR-122.

Die co-IP-Versuche zeigen deutlich für die NS5B-kodierenden Regionen, dass die miR-122-Bindung sowohl an der 5B.2m-HCV-RNA als auch an der 5B.3m-HCV-RNA verhindert wird, diese Mutationen also für die Translations- und Replikations-Versuche verwendet werden können.



**Abbildung 2.16: co-IP-Experimente der mutierten HCV-RNAs mit den Bindungsstellen S3<sub>su,m</sub>, S3<sub>se,m</sub> und S3<sub>co,m</sub>**

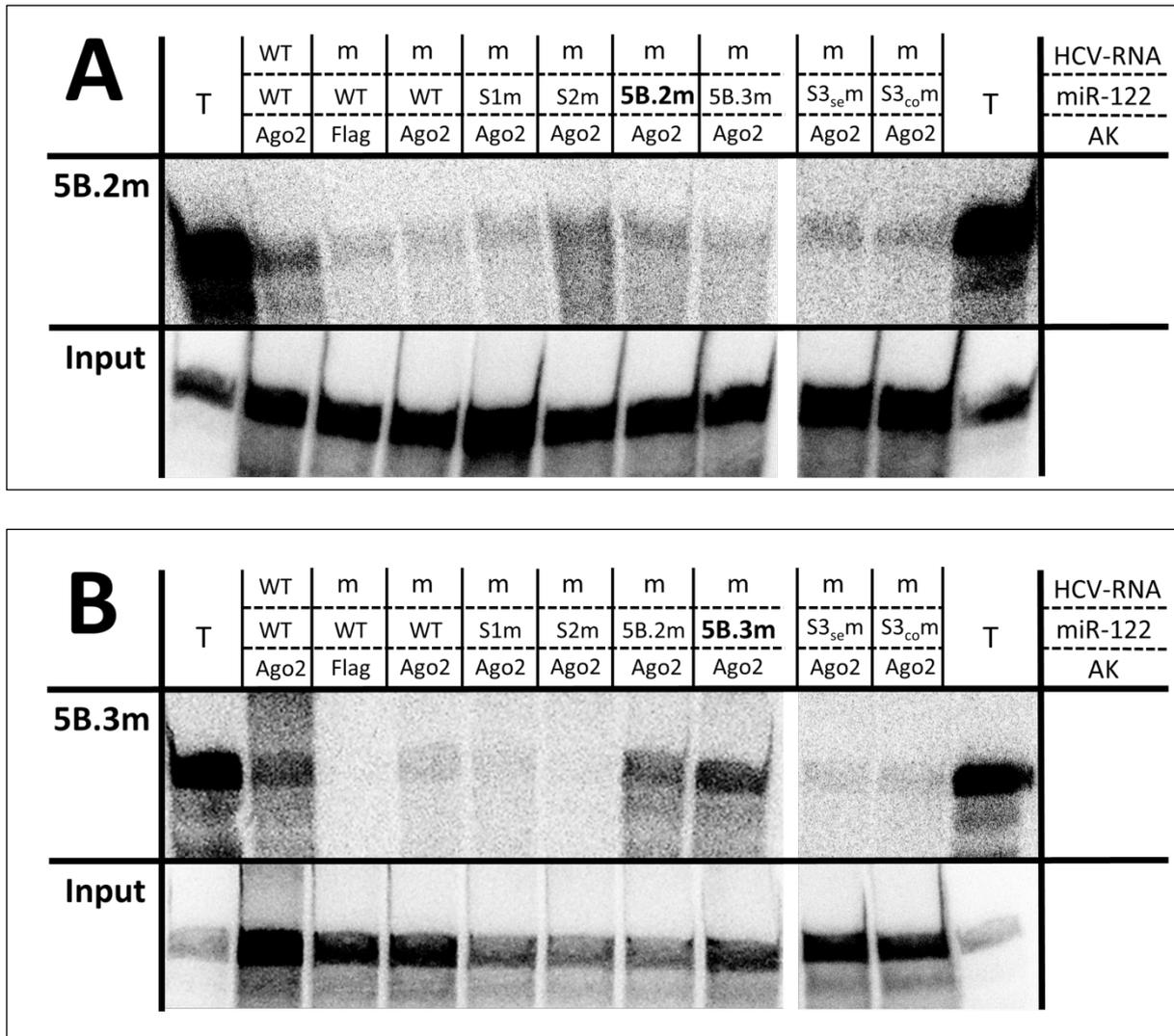
Dargestellt ist exemplarisch jeweils ein durchgeführtes co-IP-Experiment für die mutierten miR-122-Bindungsstelle S3. Die co-IP mit der 3'-UTR wurde in drei Experimente unterteilt, je nachdem, welcher Bereich mutiert vorliegt: nur *supplemental* (A), nur *seed-target* (B) und *complete* (C). Die obere Reihe jeder Tabelle zeigt die Immunopräzipitation mit den anti-Ago2- und Flag-Antikörpern (AK). Die untere Reihe stellt die reextrahierte RNA aus 10 % des Zelllysates dar, welches als Input-Kontrolle dient. T: aufgetragenes Transkript als Höhenmarker. WT: Wildtyp-RNA als Positivkontrolle, m: mutierte RNA. Transfiziert wurden alle Proben mit der Wildtyp-miR-122.

Die 3'-UTR wurde in drei Regionen eingeteilt: S3<sub>su,m</sub>, S3<sub>se,m</sub> und S3<sub>co,m</sub>. Wie für die miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region konnte eine Bindung durch die Mutationen S3<sub>se,m</sub> und S3<sub>co,m</sub> unterbunden werden, jedoch nicht durch die Mutation der *supplemental*-Region (S3<sub>su,m</sub>). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die ergänzende miR-122-Region für die Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes nicht benötigt wird. Dies widerspricht den von Dominik Conrad generierten Ergebnissen, allerdings wurde bei den vorherigen Experimenten ein anderer Genotyp verwendet.

### 2.3.3 Bindung verschieden mutierter miR-122 an die mutierte HCV-RNA

Nachdem also gezeigt wurde, dass die Mutationen eine Bindung verhindern, konnte mit den eigentlichen Translationsversuchen (Kapitel 2.3.5) begonnen werden. Parallel erfolgten weitere co-IP-Versuche. Es sollte dabei untersucht werden, ob die Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA durch die komplementär mutierte miR-122 wiederhergestellt werden kann. Diese Ergebnisse sind für spätere Gegenversuche der Funktionalität der miR-122-Bindungsstellen in den Replikationsversuchen von Bedeutung. Des Weiteren musste nachgeprüft werden, ob die verschieden mutierten miR-122 unspezifisch an eine andere mutierte Bindungsstelle paaren. Nur wenn das nicht der Fall ist, können Transfektionsversuche mit einer Kombination von verschiedenen miRs durchgeführt werden, ohne dass ein falsch positives Ergebnis generiert wird, so dass letztlich eine Aussage spezifisch für die jeweils adressierte Bindungsstelle getroffen werden kann.

Die Abbildung 2.17 und Abbildung 2.18 zeigen die jeweilige mutierte miR-122-Bindungsstelle 5B.2m und 5B.3m, sowie S3<sub>se</sub>m und S3<sub>co</sub>m transfiziert mit allen vorliegenden kompensierenden mutierten miR-122-Varianten. Die Mutation S3<sub>su</sub>m wurde in dieser Art nicht weiter untersucht, da diese *supplemental*-Region für die miR-122-Bindung an die Erkennungssequenz S3 nicht relevant ist (Abbildung 2.16). Sowohl die Translationsversuche als auch die Replikationsversuche sollten in Konstrukten mit mutierter und nicht mutierter 5'-UTR durchgeführt werden. Deshalb wurden die jeweiligen RNAs mit den mutierten Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region, 5B.2m und 5B.3m, sowie S3<sub>se</sub>m und S3<sub>co</sub>m mit ihren komplementär mutierten miR-122 Pendantes transfiziert und zusätzlich jeweils zusammen mit den komplementär mutierten miR-122 der 5'-UTR S1m und S2m. Um eine quantitative Aussage treffen zu können, erfolgte auch hier eine Auswertung mit dem OptiQuant-Programm.



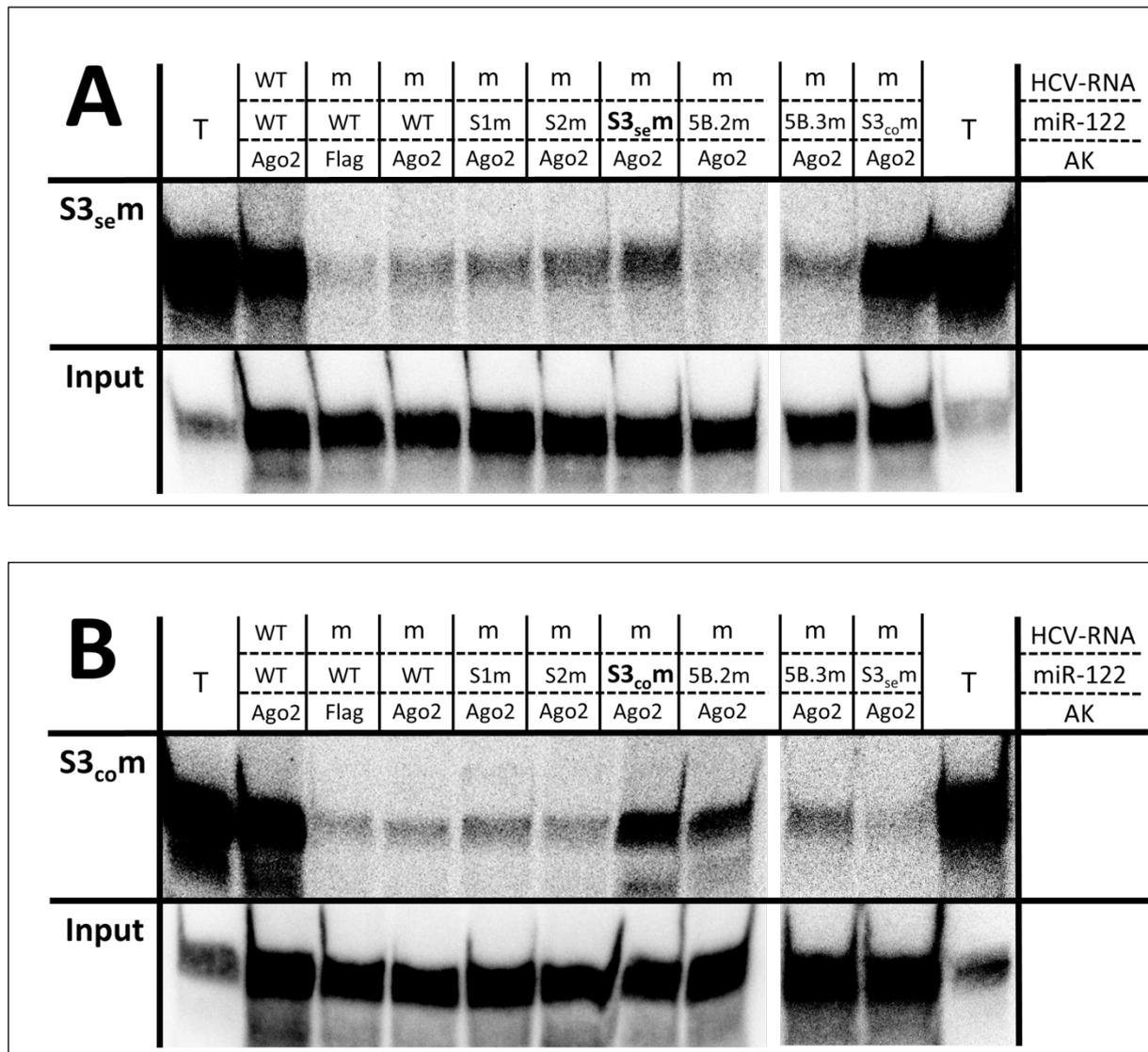
**Abbildung 2.17: Bindungsversuche der mutierten HCV-RNA 5B.2m und 5B.3m, transfiziert mit allen miR-122-Varianten**

Die HCV-RNAs 5B.2m und 5B.3m wurden mit jeder mutierten miR-122 in HeLa-Zellen transfiziert und nach 6 h mit anti-Ago2 immunopräzipitiert. Dargestellt ist exemplarisch ein durchgeführtes co-IP-Experiment für die mutierten miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region, 5B.2m (**A**) und 5B.3m (**B**). Die obere Reihe zeigt die Immunopräzipitation mit den anti-Ago2- und Flag-Antikörpern (AK). Die mittlere Reihe stellt die reextrahierte RNA aus 10 % des Zelllysates dar, welches als Input-Kontrolle dient. T: aufgetragenes Transkript als Höhenmarker. WT: Wildtyp. Die WT-HCV-RNA transfiziert mit der miR-122/WT dient als Positivkontrolle, während die mutierte HCV-RNA mit der miR-122/WT als Negativkontrolle für eine Bindung betrachtet wird. Die Flag-Probe ist die Negativkontrolle für die Versuchsdurchführung. Die Proben wurden auf zwei verschiedene Gele aufgetragen, da die Probenaschen auf einem Gel nicht ausreichten. Stark hervorgehoben ist die zur Bindungsstelle komplementär mutierte miR-122.

Wie in Abbildung 2.17 A zu erkennen ist, konnte für die komplementäre miR-122/5B.2m zwar eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA erfolgen, allerdings ist sie nur halb so stark wie die Bindung der miR-122/WT an die WT-RNA. Außerdem bindet die miR-122/S2m unspezifisch an die 5B.2m HCV-RNA. Zwar ist die Bindung auch hier nicht so stark wie bei der Positivkontrolle, aber um ein Viertel stärker als bei der passenden miR-122/5B.2m.

Abbildung 2.17 B zeigt die co-IP-Experimente für die 5B.3m Bindungsstelle. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA 5B.3m mit der

komplementären miR-122/5B.3m wieder hergestellt werden konnte. Im Vergleich zur Positivkontrolle ist die Bindung um ein Drittel stärker. Allerdings erfolgt hier ebenfalls eine unspezifische Bindung einer anderen miR-122, der miR-122/5B2m. Nach Quantifizierung mit dem OptiQuant-Programm ist diese Bindung in etwa gleich stark wie die komplementäre miR-122/5B.3m. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die komplementären miRs zwar für Gegenversuche verwendet werden können, eine Kombination mehrerer mutierter miRs jedoch möglicherweise falsch positive Resultate hervorruft.



**Abbildung 2.18: Bindungsversuche der mutierten HCV-RNA S3<sub>se</sub>m und S3<sub>co</sub>m, transfiziert mit allen miR-122-Varianten**

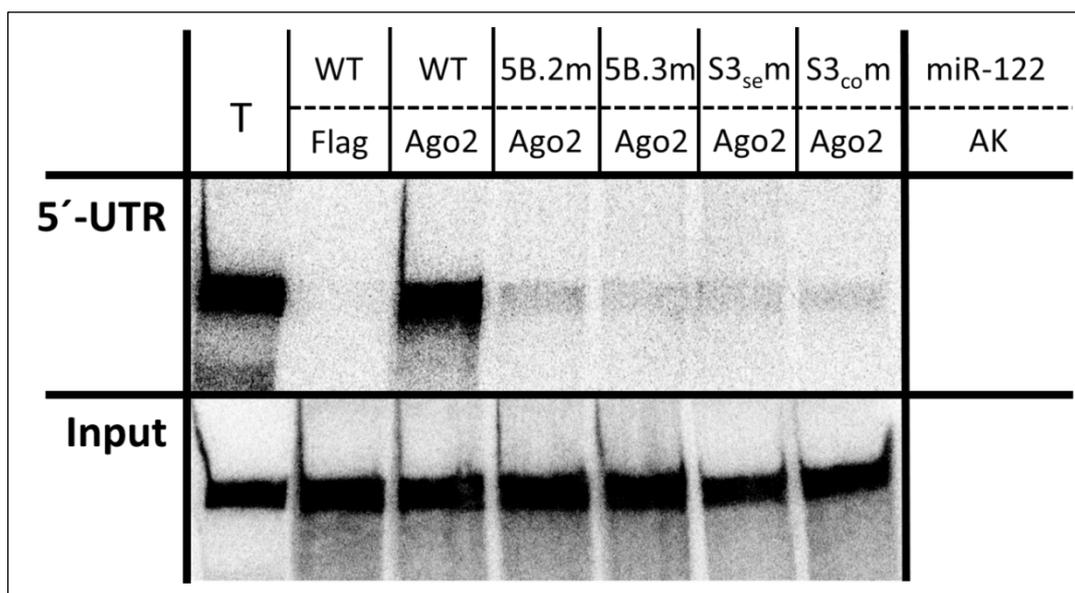
Die HCV-RNA S3<sub>se</sub>m und S3<sub>co</sub>m wurden mit jeder mutierten miR-122 in HeLa-Zellen transfiziert und nach 6 h mit anti-Ago2 immunopräzipitiert. Dargestellt ist exemplarisch ein durchgeführtes co-IP-Experiment für die mutierten miR-122-Bindungsstellen S3<sub>se</sub>m (**A**) und S3<sub>co</sub>m (**B**). Die obere Reihe zeigt die Immunopräzipitation mit den anti-Ago2- und Flag-Antikörpern (AK). Die mittlere Reihe stellt die reextrahierte RNA aus 10 % des Zelllysates dar, welches als Input-Kontrolle dient. T: aufgetragenes Transkript als Höhenmarker. WT: Wildtyp. Die WT-HCV-RNA transfiziert mit der miR-122/WT dient als Positivkontrolle, während die mutierte HCV-RNA mit der miR-122/WT als Negativkontrolle für eine Bindung betrachtet wird. Die Flag-Probe ist die Negativkontrolle für die Versuchsdurchführung. Die Proben wurden auf zwei verschiedene Gele aufgetragen, da die Anzahl der Probenaschen auf einem Gel nicht ausreichten. Stark hervorgehoben ist die zur Bindungsstelle komplementär mutierte miR-122.

Die Abbildung 2.18 zeigt Experimente der mutierten miR-122 an die Bindungsstellen S3<sub>sem</sub> und S3<sub>com</sub>. An der Bindungsstelle S3<sub>sem</sub> konnte durch die komplementäre miR-122/S3<sub>sem</sub> eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes wiederhergestellt werden. Diese Bindung ist jedoch 4-fach schwächer, als sie im Wildtypkontext gezeigt werden konnte. Mit der komplementären miR-122/S3<sub>com</sub>, welche sich nur in 3 Nukleotiden von miR-122/S3<sub>sem</sub> unterscheidet, konnte jedoch eine sehr starke Bindung festgestellt werden. Diese ist vergleichbar mit der Bindung des Wildtyps. In Abbildung 2.18 B ist zu sehen, dass mit der miR-122/S3<sub>com</sub> die Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die Bindungsstelle S3<sub>com</sub> zwar wiederhergestellt werden konnte, bei weitem jedoch nicht so stark wie es an die S3<sub>sem</sub> Bindungsstelle erfolgte. Umgekehrt zeigt die miR-122/S3<sub>sem</sub> allerdings keinerlei Bindung an die S3<sub>com</sub> Bindungsstelle. All das könnte ein Hinweis dafür sein, dass die *supplemental*-Region doch eine Rolle bei der miR-122/Ago2-Komplex-Bindung an die HCV-RNA spielt, was mit der Methode der co-IP jedoch nicht genau untersucht werden kann.

Die durchgeführten co-IP-Experimente mit den mutierten miR-122 führen zu dem Schluss, dass die miR-122 zwar für ihre komplementären Bindungsstellen eingesetzt werden können, eine Kombination jedoch zu falsch positiven Ergebnissen führen kann.

### 2.3.4 Bindung verschieden mutierter miR-122 an die Wildtyp-miR-122-Bindungsstellen der HCV-RNA

Da in den verwendeten Konstrukten ebenfalls immer Wildtyp-miR-122-Bindungsstellen vorhanden sind, musste noch nachgeprüft werden, ob die mutierten miR-122 an diese Stellen binden. Für diese Untersuchung wurde ein  $^{32}\text{P}$ -radioaktiv-markiertes Transkript der 5'-UTR WT-HCV-RNA hergestellt und eine co-IP mit den mutierten miR-122 durchgeführt. Es wurde die RNA-Sequenz der 5'-UTR verwendet, da hier generell eine stärkere Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes nachgewiesen werden kann.



**Abbildung 2.19: Bindungsversuche der verschiedenen mutierten miR-122-Duplexe an die WT-miR-122-Bindungsstelle**

Die Wildtyp-HCV-RNA der 5'-UTR wurde mit den mutierten miR-122 5B.2m, 5B.3m, S3<sub>se</sub>m und S3<sub>co</sub>m in HeLa-Zellen transfiziert und nach 6 h mit anti-Ago2 immunopräzipitiert. Die obere Reihe zeigt die Immunopräzipitation mit den anti-Ago2- und Flag-Antikörpern (AK). Die mittlere Reihe stellt die reextrahierte RNA aus 10 % des Zelllysates dar, welches als Input-Kontrolle dient. T: aufgetragenes Transkript als Höhenmarker. WT: Wildtyp.

Die Abbildung 2.19 zeigt ein co-IP-Experiment bei dem die 5'-UTR mit den WT-miR-122-Bindungsstellen und den zu den 5B.2m, 5B.3m, S3<sub>se</sub>m und S3<sub>co</sub>m Bindungsstellen komplementären miR-122 transfiziert wurde. Es konnte zwar für jede der verwendeten miR-122 eine schwache Bande detektiert werden, jedoch sind diese im Vergleich zur Positivkontrolle sehr schwach. Dieses Resultat spricht dafür, dass die jeweilige mutierte miR-122 für eine Adressierung an die jeweils mutierte Bindungsstelle in Verbindung mit WT-Bindungsstellen verwendet werden kann.

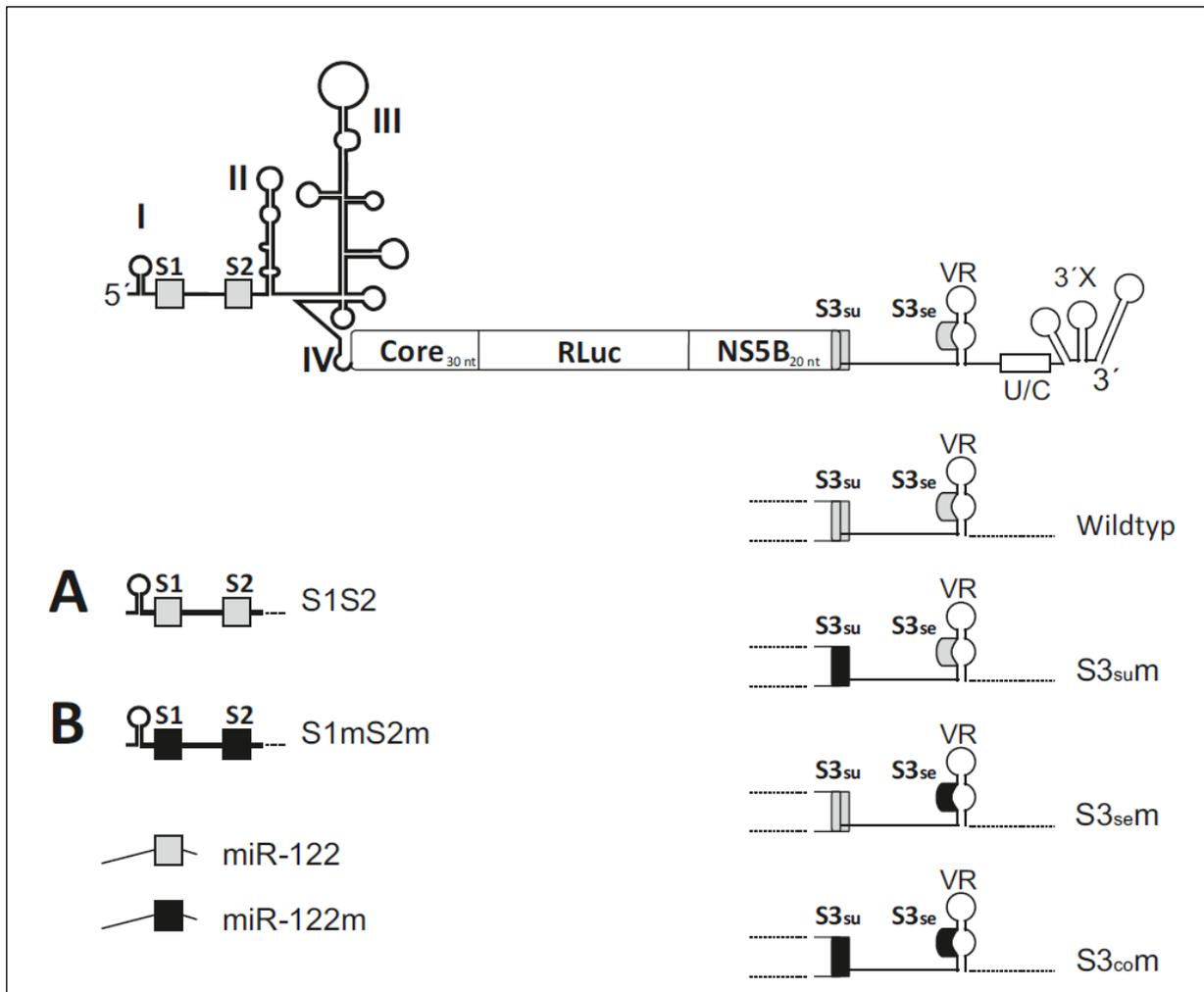
### 2.3.5 Einfluss der miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR auf die Translation der HCV-Proteine

Es ist bekannt, dass microRNAs an der eukaryotischen post-translationalen Genregulation beteiligt sind. Sie paaren mit ihrer *seed*-Sequenz an eine komplementäre Sequenz der 3'-UTR ihrer Ziel-mRNAs und reprimieren die Translation. Von HCV dagegen ist bekannt, dass die Translation durch die Interaktion mit der leberspezifischen miR-122 stimuliert werden kann. Die dafür wichtigen *cis*-regulatorischen Elemente befinden sich in der 5'- und 3'-UTR des HCV-Genoms (Abbildung 1.14). Während die stimulierende Funktionsweise der miR-122-Bindungsstellen in der 5'-UTR auf die Translation deutlich gezeigt werden konnte [99], wird generell die Bedeutung der 3'-UTR für die Translation kontrovers diskutiert. Einige Studien zeigen keinen Einfluss der 3'-UTR auf die Translation [151], wohingegen andere einen inhibierenden [152] oder einen stimulierenden Effekt [50; 51] darlegen. Übt die Anwesenheit der 3'-UTR Struktur allerdings einen Effekt auf die Translation aus, stellt sich die Frage, in wie weit die miR-122-Bindungsstelle dabei eine Rolle spielt. Um diese Frage zu beantworten, sollten im Rahmen dieser Arbeit Translationsversuche mit einer mutierten miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR durchgeführt werden.

Obwohl bereits gezeigt wurde, dass weniger die Sequenz als vielmehr die Sekundärstruktur dieser Region eine Rolle bei der Translation zu spielen scheint [50; 99], wurden erneut entsprechende Versuche durchgeführt. Die Begründung dafür lag darin, dass in den vorangegangenen Untersuchungen zwar die miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR mutiert wurde, die Luciferase-Assays allerdings immer in Anwesenheit der Wildtyp 5'-UTR erfolgten. Es lagen somit zwei funktionelle miR-122-Bindungsstellen im Konstrukt vor und der alleinige Einfluss der miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR konnte nicht untersucht werden. Außerdem wurde in den früheren Arbeiten nicht wie hier explizit auf den Erhalt der Sekundärstruktur der RNAs, die die Bindungsstelle enthalten, geachtet. In dieser Arbeit konnte durch Kombinationen eingefügter Mutationen in die miR-122-Bindungsstellen S1 und S2 zusammen mit S3 der Einfluss der 3'-UTR separat betrachtet werden. Zudem wurde das Hauptaugenmerk bis dahin nur auf die *seed-target*-Sequenz gerichtet, während die *supplemental*-Region bislang unbearbeitet blieb. Im Laufe dieser Arbeit konnten diese Bereiche durch Mutationen jedoch getrennt analysiert werden, so dass eine separate Betrachtungsweise möglich war.

Um den Einfluss der miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR auf die Translation von HCV-RNA zu untersuchen, wurden zur Herstellung monocistronischer HCV-Reporter-RNAs verschiedene Ausgangsplasmide verwendet (Kapitel 2.3.1). Allen gemein ist das Vorhandensein eines *Renilla Luciferase*-Reportergens, einer IRES-Struktur, die letzten Basen der NS5B-kodierenden Region, welche die *supplemental*-Region enthält, und die komplette 3'-UTR. Der Unterschied liegt in den mutierten oder nicht mutierten miR-122-Bindungsstellen, wobei die 5'-UTR als Wildtyp

(Abbildung 2.20 A) oder mutiert (Abbildung 2.20 B) vorliegt und mit allen vier Varianten der 3'-UTR kombiniert wird. Abbildung 2.20 gibt einen Überblick der verschiedenen HCV-Reporter-RNAs.



**Abbildung 2.20: Schematische Darstellung der verwendeten HCV-Reporter-RNAs**

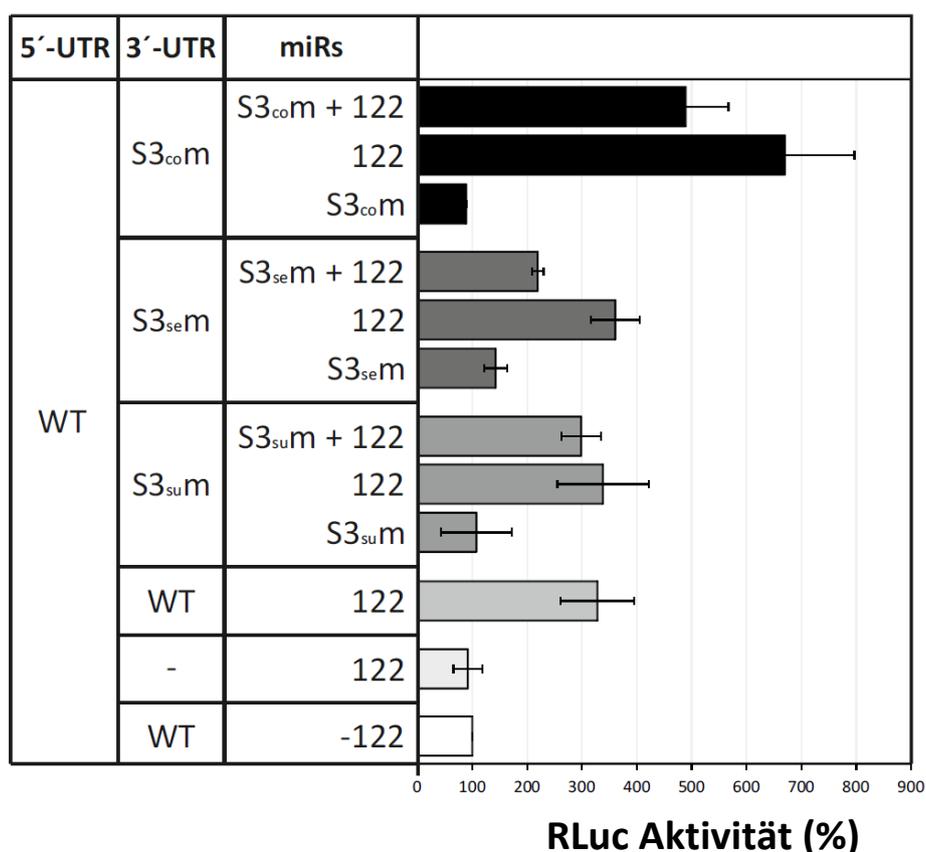
Die kodierende Sequenz der *Renilla*-Luciferase wird in 5'-Richtung von der IRES-Struktur und in 3'-Richtung von einem Teil der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR flankiert. Außerdem sind die miR-122-Bindungsstellen als Wildtyp (graue Kästen) und mutiert (schwarze Kästen) dargestellt. Die 5'-UTR liegt entweder in ihrer Wildtypform (**A**) oder mutiert (**B**) vor. Die miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR ist unterteilt in die *supplemental*- und *seed-target*-Region, welche ebenfalls als Wildtyp (graue Kästen) oder mutiert (schwarze Kästen) vorliegen. Für die Versuche werden HCV-Reporter-Konstrukte verwendet, welche jeweils die 5'-UTR mit allen vier Varianten der 3'-UTR enthalten. S1S2: miR-122-Bindungsstellen in der 5'-UTR, S3<sub>su</sub>: *supplemental*-Region, S3<sub>se</sub>: *seed-target*-Sequenz, S3<sub>co</sub>: *complete*-Bindungsstelle in der 3'-UTR. m: mutiert, VR: variable Region, RLuc: *Renilla*-Luciferase, die Zahlen bei Core und NS5B geben die Nukleotidlänge dieser Region in dem Konstrukt an.

Die dargestellten HCV-Reporter-RNAs wurden zusammen mit einer polyadenylierten *Cap-Firefly*-Luciferase-mRNA und den entsprechenden kompensierenden miR-122's in HeLa-Zellen transfiziert und nach 6 h lysiert. Anschließend wurden sie mit dem „Renilla-Juice Luciferase Assay“ und dem „Beetle-Juice Luciferase Assay“ Kit gemessen. Die FLuc-mRNA dient als interne Kontrolle um Transfektionsunterschiede innerhalb des Versuches auszugleichen. Bei jedem Versuch wurde jede

HCV-Reporter-RNA auch ohne die Zugabe einer miR-122 gemessen, so dass alle anderen Werte auf diesen dann als 100 % gesetzten Wert normalisiert werden konnten.

In der geplanten Versuchsdurchführung wurden Translationsstudien für alle drei in Kapitel 2.3.1, beschriebenen Mutationskonstrukte ( $S3_{su,m}$ ,  $S3_{se,m}$  und  $S3_{co,m}$ ) durchgeführt. In Abbildung 2.16 wurde gezeigt, dass die  $S3_{su,m}$ -Mutation eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA nicht unterbindet. Die Einzelresultate sind zwar nicht aussagekräftig, werden aber für die Interpretation und den Vergleich zwischen  $S3_{se,m}$  und  $S3_{co,m}$  benötigt.

Es wurden Translationsversuche mit HCV-Reporter-RNAs der drei verschiedenen mutierten miR-122-Bindungsstellen in der 3'-UTR in Kombination mit den mutierten (Abbildung 2.21) und nicht mutierten (Abbildung 2.22) miR-122-Bindungsstellen in der 5'-UTR durchgeführt. Die Proben wurden alle auf ihre HCV-Reporter-RNA normalisiert, welche ohne miR-122 in HeLa-Zellen transfiziert wurde. In Abbildung 2.21 sind die Translationsergebnisse der HCV-Reporter-RNAs dargestellt deren miR-122-Bindungsstellen in der 5'-UTR in ihrer WT-Form vorliegen. Variiert werden die einzelnen Proben nur aufgrund ihrer mutierten 3'-UTR-Region in Kombination mit unterschiedlichen miR-122-Duplexen, weshalb bei der Beschreibung nur noch auf die 3'-UTR eingegangen wird.



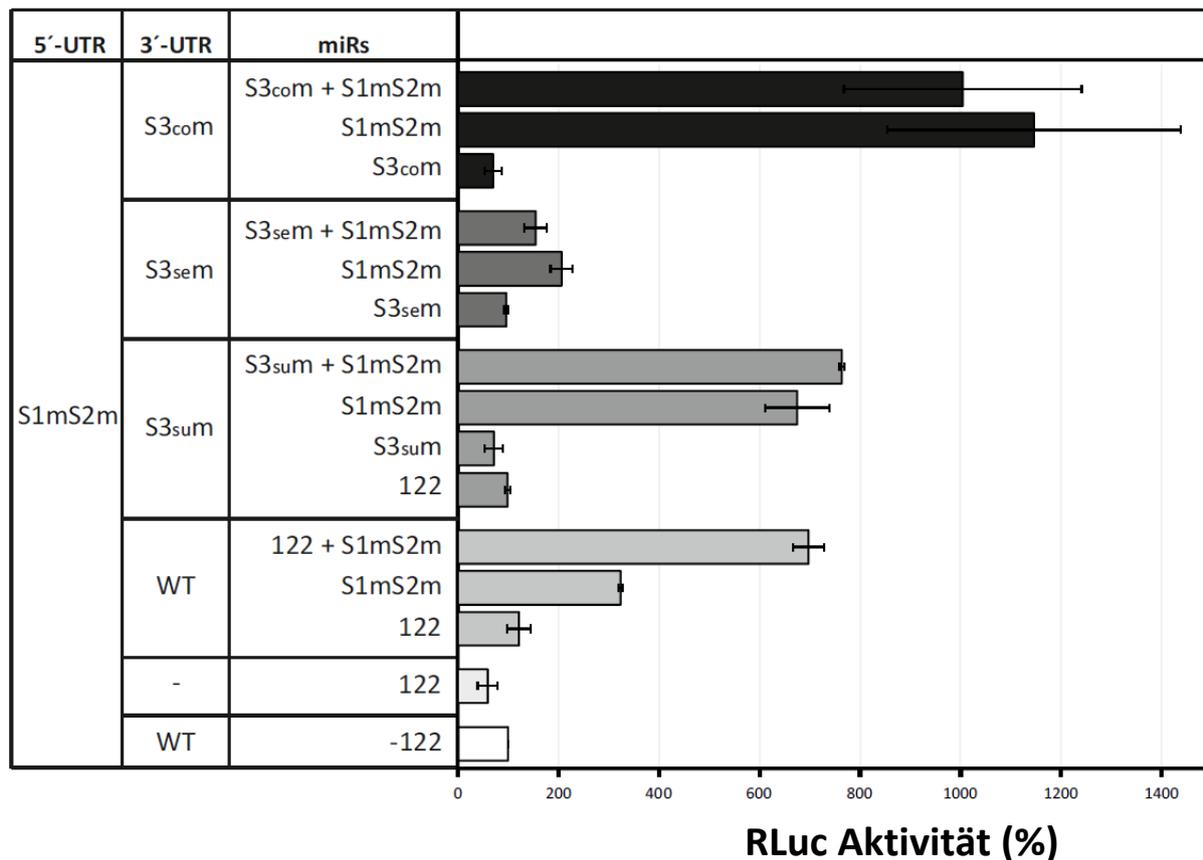
**Abbildung 2.21: Translationsversuche von HCV-Reporter-RNAs mit mutierter miR-122-Bindungsstelle der 3'-UTR und Wildtyp-miR-122-Bindungsstelle der 5'-UTR**

Expression der *Renilla*-Luciferase (RLuc) der HCV-Reporter-RNAs mit WT-miR-122-Bindungsstellen in der 5'-UTR und mutierten Bindungsstellen in der 3'-UTR, 6 h nach der Transfektion in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen mutierten miR-122-Duplexen transfiziert. WT: Wildtyp. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2–3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Durch das Mitführen einer HCV-Reporter-RNA, welche keine 3'-UTR-Struktur enthält, wird die in vorangegangenen Studien beschriebene Aussage belegt, dass diese Struktur für eine effiziente Translation anwesend sein sollte.

Werden die HCV-Reporter-RNAs mit den drei verschiedenen miR-Bindungsstellen  $S3_{su}m$ ,  $S3_{se}m$  und  $S3_{co}m$ , jeweils mit der miR-122/WT und ihrer komplementären miR-122 separat transfiziert, zeigt sich teilweise ein unerwartetes Ergebnis. Die Translationseffizienz der  $S3_{su}m$  und  $S3_{se}m$  Konstrukte mit der miR-122/WT entspricht der des WT-Konstrukts, wohingegen sie bei  $S3_{co}m$  fast doppelt so stark ist. Dies ist deshalb überraschend, da die Mutation  $S3_{su}m$  die Bindung der miR-122 nicht unterbindet und somit für  $S3_{se}m$  und  $S3_{co}m$  ein ähnliches Ergebnis erwartet wurde. Eine mögliche Erklärung liegt in der Sequenz der Mutante  $S3_{su}m$ . Diese verhindert zwar nicht die Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA scheint aber einen anderweitigen positiven Einfluss auf die Translation zu haben. Die Bindung der mutierten miR-122 an die entsprechende mutierte Region in der 3'-UTR führt nicht zu einer veränderten Translationseffizienz, solange die 5'-UTR nicht von miR-122 gebunden wird. Dies deutet darauf hin, dass die miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR allein keinen Einfluss auf die Translation ausübt. Werden nun aber die Bindungsstellen in der 5'-UTR mit der miR-122/WT transfiziert und die Regionen der 3'-UTR mit ihrer jeweils komplementären miR-122 zeigt sich bei allen drei HCV-Reporter-RNAs eine Verminderung der Translationseffizienz im Vergleich zur Kontrolle mit nur adressierter 5'-UTR. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Bindung der miR-122 an die Bindungsstelle in der 3'-UTR einen reprimierenden Einfluss auf die Translation ausübt, wenn die 5'-UTR miR-122 gebunden hat.

Die Abbildung 2.22 zeigt die Translationsergebnisse der HCV-Reporter-RNAs, deren miR-122-Bindungsstellen in der 5'-UTR mutiert vorliegen. Variiert werden die einzelnen Proben nur aufgrund ihrer mutierten 3'-UTR-Region in Kombination mit unterschiedlichen miR-122-Duplexen, weshalb bei der Beschreibung nur noch auf die 3'-UTR eingegangen wird.



**Abbildung 2.22: Translationsversuche von HCV-Reporter-RNAs mit mutierter miR-122-Bindungsstelle der 3'-UTR und mutierten miR-122-Bindungsstelle der 5'-UTR**

Expression der *Renilla*-Luciferase (RLuc) der HCV-Reporter-RNAs mit mutierten miR-122-Bindungsstellen in der 5'-UTR und mutierten Bindungsstellen in der 3'-UTR, 6 h nach der Transfektion in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen mutierten miR-122 Duplexe transfiziert. WT: Wildtyp. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2–3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Auch bei dieser Untersuchung wurde eine HCV-Reporter-RNA ohne 3'-UTR Struktur mitgeführt. Sie zeigte eine leichte Verminderung der Translationseffizienz im Vergleich zur HCV-Reporter-RNA mit dieser Struktur. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass die 3'-UTR wichtig für die Translation ist.

Werden nun die miR-122-Bindungsstellen der drei verschiedenen HCV-Reporter-RNAs S3<sub>su</sub>m, S3<sub>se</sub>m und S3<sub>co</sub>m jeweils mit ihrer komplementären miR-122 allein transfiziert und die 5'-UTR wird nicht adressiert, entsprechen die Werte in etwa der Negativkontrolle. Erfolgt allerdings eine umgekehrte Adressierung, also die Transfektion der HCV-Reporter-RNAs nur mit den mutierten miR-122 S1m und S2m, kommt es für S3<sub>su</sub>m zu einer Verdopplung der Translationseffizienz und für S3<sub>co</sub>m sogar zu einer Verdreifachung. Bei S3<sub>se</sub>m erfolgt zwar ebenfalls eine Translationssteigerung im Vergleich zur Transfektion mit der komplementären miR-122/S3<sub>se</sub>m, jedoch ist diese geringer als beim 3'-UTR Wildtyp. Wird nun nicht nur jeweils eine UTR-Region adressiert sondern beide kommt es bei dem Konstrukt mit der WT-3'-UTR zu einer sehr deutlichen Translationssteigerung. Auch bei der Mutation

S3<sub>su</sub>m wird die Translation gesteigert, wenn auch nur sehr gering. Anders verhält es sich jedoch bei den Mutationen S3<sub>se</sub>m und S3<sub>co</sub>m, hier ist eine Reduktion der Translation zu beobachten.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse kann zusammenfassend festgehalten werden, dass die miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR eine mögliche reprimierende Wirkung auf die Translation der HCV-RNA hat, dies jedoch nur, wenn die miR-122 an die Bindungsstellen in der 5'-UTR gebunden hat. All dies könnte ebenfalls auf eine Interaktion der miR-122/Ago2-Komplexe an den Bindungsstellen in der 5'-UTR und der 3'-UTR hinweisen und müsste in weiterführenden Experimenten genauer untersucht werden.

### 3 Diskussion

Das Hepatitis C Virus-Genom besitzt mehrere konservierte Bindungsstellen für die leberspezifische miR-122. Es ist bekannt, dass die microRNA einen Komplex mit den Ago-Proteinen bildet und es dadurch zu einer Ago-Protein vermittelten miR-122-Bindung an die HCV-RNA kommt. Die intensivste Anlagerung erfolgt in Kombination mit dem Ago2-Protein, welches in dieser Arbeit ausschließlich verwendet wurde [135; 136].

Am eingehendsten untersucht und in der Literatur beschrieben wurden die zwei Bindungsstellen, die sich zwischen der Haarnadelstrukturen I und II der hoch konservierten 5'-UTR von HCV befinden (Abbildung 1.14). Eine Bindung der miR-122/Ago2-Komplexe an diese Stellen hat einen großen Einfluss auf den HCV-Vermehrungszyklus, u.a. kommt es zu einer Verstärkung der RNA-Replikation [98], zu einer Stimulation der Translation [99; 140; 141; 142; 143] und zu einer Stabilisierung der RNA gegen Exonuklease-Verdau [136; 137; 138].

Weitere miR-122-Bindungsstellen befinden sich in der NS5B-kodierenden Region und der variablen Region der 3'-UTR des HCV-Genoms (Abbildung 1.14). Da bisher noch sehr wenig darüber bekannt ist, welchen Einfluss die miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region auf den HCV-Vermehrungszyklus haben und ob es überhaupt zu einer miR-122/Ago2-Komplex-Bindung kommt sollte dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Im Vergleich zur Bedeutung der miR-122-Bindungsstellen in der 5'-UTR als stimulierende Elemente wird der Einfluss generell der 3'-UTR kontrovers diskutiert. Während einige Studien keinen Einfluss der 3'-UTR im Ganzen auf die Translation zeigen, sprechen andere von einem inhibierenden [152] oder auch einem stimulierenden Effekt [50; 51]. In wie weit die miR-122-Bindungsstelle dabei allerdings eine Rolle spielt, ist kaum bekannt und sollte deshalb im zweiten Teil dieser Arbeit genauer untersucht werden. Aufgrund von Konstrukten, in denen sowohl die miR-122-Bindungsstellen der 5'-UTR als auch der 3'-UTR mutiert vorlagen, war es möglich die miR-122-Erkennungssequenzen in der 3'-UTR eingehender zu betrachten. Des Weiteren sollte die von Dominik Conrad aufgestellte Theorie, dass eine *supplemental*-Region innerhalb der 3'-UTR eine große Rolle bei einer miR-122-Bindung an die HCV-RNA spielt, im Translationskontext eingehender betrachtet werden. Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse zeigen, dass sich der miR-122/Ago2-Komplex ebenfalls an die Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR des HCV-Genoms anlagert. Eine erfolgreiche Bindung bzw. deren Stärke hängt jedoch von der RNA-Struktur und dem untersuchten HCV-Isolat ab (Kapitel 2.2), und die *supplemental*-Region scheint für eine Bindung an die 3'-UTR keine entscheidende Rolle zu spielen. Die Durchführung von Luciferase-Assays führt dann in speziellen Fällen zu der Erkenntnis, dass die Bindung der miR-122 sogar zu einer Reduktion der Effizienz der Translation führen kann (Kapitel 2.3.5).

### 3.1 Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR des HCV-Genoms

Eine hoch konservierte Bindungsstelle in der variablen Region der 3'-UTR konnte bereits von mehreren Forschergruppen nachgewiesen, sowie ihre funktionelle Rolle im HCV-Vermehrungszyklus untersucht werden. So konnte gezeigt werden, dass die Hybridisierung der miR-122 an diese Stelle vermutlich keine funktionelle Relevanz im HCV-Vermehrungszyklus ausübt, und das obwohl die Affinität der miR-122 an diese Bindungsstelle vermutlich höher ist als an die zweite Bindungsstelle in der 5'-UTR [50; 99; 145]. Da jedoch lange noch kein Nachweis erfolgt war, ob sich der miR-122/Ago2-Komplex überhaupt an diese miR-122-Bindungsstelle der HCV-RNA anlagert, führte Dominik Conrad im Rahmen seiner Dissertation erste Bindungsstudien durch. Dabei entdeckte er, dass die Intensität der Bindung an die 3'-UTR jedoch um einiges schwächer ist als an die miR-122-Bindungsstellen in der 5'-UTR und nur dann zustande kommt, wenn sowohl die *seed-target*-Sequenz, als auch die *supplemental*-Region für eine miR-122-Anlagerung vorhanden ist. Diese Art der miR-122-Bindung konnte bereits für die Bindungsstellen in der 5'-UTR gezeigt werden (Abbildung 1.15) [144]. Seine Beobachtung führte zu dem Schluss, dass die *supplemental*-Region eine wichtige Rolle bei der miR-122-Bindung an die Con1 HCV-RNA spielt und möglicherweise auch einen Einfluss auf die Translation hat.

Des Weiteren konnte von Nasheri *et al.* [145] eine vierte hoch konservierte miR-122-Bindungsstelle in der NS5B-kodierenden Region nachgewiesen werden. Erste Untersuchungen deuteten auf eine hohe Affinität der miR-122 zu dieser Bindungsstelle hin, welche vermutlich einen negativen Effekt auf die HCV-Translation und Replikation ausübt. Auch von Luna *et al.* [146] wurde diese Bindungsstelle (5B.2) mit der Ago-HiTS-CLIP-Methode nachgewiesen und zusätzlich noch zwei weitere miR-122-Bindungsstellen (5B.1 und 5B.3) in dieser Region. In unserer Bioinformatik-Studie [48] konnten wir durch Sequenz-Alignments zeigen, dass die erste Stelle, welche sich 30 Nukleotide strangaufwärts von der zweiten Bindungsstelle befindet, innerhalb der Genotypen nicht konserviert vorliegt, die bereits bekannte 5B.2 Bindungsstelle und die neu entdeckte 5B.3 miR-122-Bindungsstelle dagegen innerhalb der Genotypen hoch konserviert sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Nukleotide-Sequenz innerhalb der Genotypen hoch konserviert vorliegen, sondern ebenso die AS-Sequenz (Abbildung 2.3, Anhang 6.1). Diese Beobachtung spricht dafür, dass die miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region eine funktionelle Bedeutung für den HCV-Vermehrungszyklus haben. Die in dieser Arbeit durchgeführten anti-Ago2-HCV-RNA co-IP-Experimente für die miR-122-Erkennungssequenzen 5B.2 und 5B.3 zeigen, ebenso wie von Luna *et al.* Beschrieben, eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA (Kapitel 2.2.1.4).

Auch in dieser Arbeit gestaltete sich der Nachweis einer miR-122/Ago2-Bindung an die miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR der HCV-RNA schwierig. Obwohl für die Bindungsstelle in der 3'-UTR die *supplemental*-Region anwesend war und neben dem inzwischen gängigeren Isolat J6-JFH1 auch das von Dominik Conrad verwendete Isolat Con1 genutzt wurde, konnte zunächst für keine der drei Bindungsstellen der zwei Isolate eine Hybridisierung nachgewiesen werden. Für die 3'-UTR lieferte dies bereits den ersten Hinweis dafür, dass die *supplemental*-Region keine solch große Bedeutung hat wie von Dominik Conrad beschrieben. Durch das Einfügen von Mutationen in den verschiedenen Bereichen der miR-122-Bindungsstelle konnte dies dann nochmals bestätigt werden. In Kapitel 3.2.1 wird näher auf dieses Ergebnis eingegangen. Eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die drei miR-122-Bindungsstellen konnte erst nachgewiesen werden, als die flankierenden Sequenzen der *seed-target*-Sequenz und somit die Sekundärstruktur des Transkriptes so verändert wurden, dass die miR-122-Erkennungssequenzen möglichst frei zugänglich vorlagen und dies in beiden Isolaten gleichermaßen (Kapitel 2.2.1). Auf die einzelnen Bindungsstudien und die Beobachtung einer Korrelation zwischen Zugänglichkeit der miR-122-Bindungsstelle und der Bindungsintensität soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

### **3.1.1 Die Stärke der Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA ist abhängig von der Zugänglichkeit der Bindungsstellen und ihrer flankierenden Sequenzen**

Es ist bekannt, dass die Bindungseffizienz der miRNA an Bindungsstellen in der 3'-UTR von zellulären mRNAs mit der Zugänglichkeit korreliert und diese Stellen somit meist in gut zugänglichen Regionen vorliegen [153; 154; 155; 156]. Eine solche Korrelation konnte auch für Bindungsstellen in den kodierenden Regionen nachgewiesen werden [157]. Die Daten in dieser Arbeit zeigen ebenfalls, dass die Effizienz einer miR-122-Bindung an die untersuchten Erkennungssequenzen in der NS5B-kodierenden Region und in der 3'-UTR des HCV-Genoms u.a. davon abhängt, welche RNA-Sekundärstruktur sich um diese Bindungsstellen ausbildet und wie zugänglich sie dadurch ist (Kapitel 2.2.2).

Es ist jedoch zu beobachten, dass die Korrelation zwischen Zugänglichkeit und Bindungsintensität von Bindungsstelle zu Bindungsstelle unterschiedlich stark ist. Zudem konnte durch die Berechnung der *ssp* für die verschiedenen untersuchten Bereiche der miR-122-Bindungsstelle gezeigt werden, dass je nach Bindungsstelle ein anderer Nukleotidabschnitt für eine erfolgreiche Interaktion zwischen HCV-RNA und dem miR-122/Ago2-Komplex am stärksten von Bedeutung ist. Während für die miR-122-Bindungsstelle 5B.2, mit einem Korrelationskoeffizienten von  $R = 0,380$  für die *complete*-Bindungsstelle und  $R = 0,208$  für die *seed-target*-Sequenz, kaum ein Zusammenhang

zwischen Zugänglichkeit und Stärke der Bindung zu beobachten ist, kann für die miR-122-Bindungsstelle 5B.3 festgehalten werden, dass hauptsächlich die *seed-target*-Sequenz mit einem Korrelationskoeffizient von  $R = 0,677$  für eine Anlagerung benötigt wird. Für die Bindungsstelle S3 dagegen zeigt die *complete*-Bindungsstelle mit  $R = 0,965$  eine starke Korrelation zwischen Zugänglichkeit und Bindungsstärke (Abbildung 2.11). Dies legt nahe, dass die Dynamik der miR/Ago2-Bindung nicht nur von der *seed-target*-Sequenz selbst abhängig ist, sondern auch in erheblichen Maßen von den umgebenden Sequenzen. Diese flankierenden Bereiche könnten mit den Bindungsstellen interagieren und somit Auswirkungen auf die Zugänglichkeit haben. Auch andere Proteine könnten sich anlagern und somit die Zugänglichkeit beeinflussen. Zudem könnten die miR-122-Bindungsstellen einer dynamischen Veränderung aufgrund der sich heterogen bildenden RNA-Sekundärstrukturen, welche sie umgeben, unterliegen. Dies könnte beispielsweise durch sich auf der kodierenden Region der RNA bewegend translatierende Ribosomen geschehen.

Die Hypothese, dass die miR-122-Bindung an die Erkennungssequenzen in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR von der Zugänglichkeit abhängen kann, wird durch die Erkenntnis gestützt, dass der miR-122/Ago2-Komplex stark an die zwei sehr frei zugänglichen Bindungsstellen in der 5'-UTR hybridisiert, aber um einiges schwächer an die Bindungsstellen strangabwärts.

Diese Beobachtung wird ebenfalls durch die Ergebnisse aus der Dissertation von Dominik Conrad unterstützt. Er konnte eine sehr starke Bindung an die Bindungsstellen in der 5'-UTR nachweisen, jedoch nur eine sehr schwache an die 3'-UTR [135]. Durch CLIP-Assays konnte ebenfalls eine Bindung der miR-122 an die drei Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region nachgewiesen werden, welche jedoch im Vergleich zu den Bindungen an die Bindungsstellen in der 5'-UTR (S1 und S2) mit einer viel schwächeren Bindungsintensität erfolgt [146]. Eine weitere Studie zeigt, dass die miR-122 *in vitro* mit einer hohen Affinität an die Bindungsstelle 5B.2 bindet, was zu einer leichten Reduktion der HCV-Replikation führt [145].

Damit die Ziel-RNA durch den miRNA/Ago2-Komplex erkannt wird und es zu einer Bindung kommen kann, spielen zwei weitere Aspekte eine Rolle, welche die Eigenschaften des Ago-Proteins beeinflussen und dessen Interaktion mit der RNA verstärken.

Der erste Aspekt bezieht sich auf die Rolle des sogenannten *nucleation-step* (Kern-Sequenz) bei der initialen Phase der miRNA-Bindung an ihre Erkennungssequenz, welche von der Ago-Protein-Struktur und deren Dynamik abhängt (Kapitel 3.1.2) [158]. Das zweite Kriterium ist das Vorhandensein eines Adenosins direkt stromabwärts des 3'-Endes der Zielsequenz für die miRNA (Kapitel 3.1.3) [147].

### 3.1.2 Die Kern-Sequenz spielt keine spezielle Rolle bei der initialen Phase einer miR-122-Bindung an die Bindungsstelle in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR

Von Long *et al.* konnte 2007 der Ablauf einer miRNA-Bindung an ihre Zielsequenz beschrieben werden. Die Interaktion läuft demnach als eine zweistufige Hybridisierung ab. Als erstes erfolgt eine Bindung an eine zugängliche, 4 Nukleotide lange Kern-Sequenz (CUCC), gefolgt von einer anschließenden Bindung der miRNA an den Rest der Zielsequenz [158]. Zusätzlich konnte durch bioinformatische Analysen der Zugänglichkeit der miRNA-Bindungsstelle in der 3'-UTR von CLIP-Daten [159; 160] gezeigt werden, dass die erste Bindung zwischen miRNA und mRNA bevorzugt am 3'-Ende der Zielsequenz beginnt. Diese Schlussfolgerung basiert auf bioinformatischen Analysen von Erkennungssequenzen, welche zeigen, dass Ago2-Proteine tatsächlich zunächst die miRNA-Nukleotide 2–5 für eine initiale Hybridisierung freilegen und es anschließend zu einer Umlagerung des Ago-Proteins kommt. Dies führt dann zu einer Präsentation der restlichen Nukleotide der *seed*-Sequenz und der *supplemental*-Region der miRNA [103]. Im Gegensatz dazu werden die miRNA-Nukleotide 9–12 in einer Spalte des Ago2-Proteins gebunden und sind in der Regel nicht an der Zielsequenz-Bindung beteiligt [102; 103].

Die in dieser Arbeit durchgeführte Berechnung der *ssp* für die Kern-Sequenz bestätigt mit einem Korrelationskoeffizient von  $R = 0,200$  nochmals die geringe Korrelation zwischen Zugänglichkeit und Bindungsstärke für die Bindungsstelle 5B.2. Für S3, welche einen negativen Korrelationskoeffizient aufweist, kann aufgrund dieser Betrachtung geschlossen werden, dass die starke Korrelation zwischen Zugänglichkeit und Bindungsstärke nicht auf die Zugänglichkeit der Kern-Sequenz zurückzuführen ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die gesamte Bindungsstelle in der 3'-UTR für die Anlagerung des miR-122/Ago2-Komplexes benötigt wird. Für die Erkennungssequenz 5B.3 dagegen konnte mit  $R = 0,682$  eine Korrelation zwischen der Zugänglichkeit der Kern-Sequenz und der Bindungsstärke nachgewiesen werden, welche im Vergleich zur Korrelation der *seed-target*-Sequenz ( $R = 0,677$ ) nochmals leicht erhöht ist. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass hier die Zugänglichkeit der Kern-Sequenz für die initiale Bindung des Ago2-Proteins eine entscheidende Rolle spielt. Ein Grund dafür könnte in der *seed-target*-Sequenz liegen, welche bei dieser miR-122-Bindungsstelle nur 6 Nukleotide lang ist und nicht wie bei den anderen 7 Nukleotide. Die 4 Nukleotide der Kern-Sequenz könnten so bei der Erkennung einen größeren Ausschlag geben. Dies könnte durch Bindungsstudien und den anschließenden Vergleich bei der Berechnung der *ssp* für die miR-122-Bindungsstelle S1 und S2 in der 5'-UTR genauer untersucht werden, da auch hier die zweite Bindungsstelle nur eine 6 Nukleotide lange *seed-target*-Sequenz aufweist, während die erste 7 Nukleotide lang ist.

Ebenso könnten die, im Vergleich zur Literatur, unterschiedlichen Ergebnisse damit zu erklären sein, dass zum einen Long *et al.* [158] ihre Experimente in *C. elegans* und *D. melanogaster* durchführten

und zum anderen die beiden weiteren Studien rein bioinformatisch vorgenommen wurden (unter Verwendung von humanen Protein-kodierenden Gen-Sequenzen). Außerdem wird bei der Durchführung der co-IP-Experimente jeweils nur ein Abschnitt der HCV-RNA in die Zellen transformiert. Es stellt sich daher die Frage, in wie weit diese kurzen Transkripte eine realistische Sekundärstruktur des authentischen HCV-Genoms nachbilden. Zudem ist es nicht klar, in wie weit die Zugänglichkeit der miR-122-Bindungsstellen bei der Betrachtung des authentischen HCV-Genoms so gegeben ist, wenn nicht nur die miR-122 bindet, sondern auch die benötigten Proteine, welche beim HCV-Vermehrungszyklus gebraucht werden.

Dass die Kern-Sequenz an sich eine Rolle bei der Bindung zu spielen scheint, ist in Kapitel 2.3.2 zu sehen. Befindet sich eine Mutation in diesem Bereich, kann eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die miR-122-Bindungsstelle nicht mehr nachgewiesen werden. Die Kern-Sequenz ist somit für alle drei Bindungsstellen für die initiale Phase notwendig, jedoch spielt speziell ihre Zugänglichkeit im Vergleich mit der Zugänglichkeit der gesamten *seed-target*-Sequenz oder der *complete*-Bindungsstelle keine entscheidende Rolle.

### **3.1.3 Die Zugänglichkeit eines Adenosins verstärkt die Bindung des miR-122/Ago2-Komplexes an schwer zugängliche miR-122-Bindungsstellen**

Eine bioinformatisch durchgeführte Studie weist eine deutliche Konservierung eines Adenosins direkt am 3'-Ende der miR-Zielsequenz auf [147]. Von Wu *et al.* konnte 2005 gezeigt werden, dass dieses Adenosin zu einer verbesserten Bindung des miRNP-Komplexes an die Ziel-mRNA beiträgt [161]. Sie konnten zeigen, dass das Adenosin am 3'-Ende von zwei miR-125-Bindungsstellen wesentlich zur miRNA-Funktion beiträgt, unabhängig davon, wie stark die Nukleotide des 5'-Endes der miRNA binden. Eine andere Studie wiederholte frühere experimentelle Daten von drei siRNA-Transfektionsstudien und konnte eine starke Herunterregulierung der Ziel-mRNAs nachweisen, wenn ein Adenosin am 3'-Ende der Zielsequenz vorhanden war [162]. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse konnte kürzlich durch Strukturanalysen des Ago-Proteins gegeben werden. Befindet sich ein Adenosin am 3'-Ende der miRNA-Zielsequenz, kann dieses in einer Tasche des Ago2-Proteins binden. Durch diese Interaktion erhöht sich die Affinität des Ago2-Proteins für die mRNA-Zielsequenz [103].

Bei der Betrachtung meiner Ergebnisse kann nicht allgemein festhalten werden, dass ein Adenosin am 3'-Ende der miR-122-Bindungsstelle eine Verbesserung der Korrelation zwischen der berechneten Zugänglichkeit und der Intensität der miR-122/Ago2-Komplex-Bindung hervorruft (Abbildung 2.13). Es muss zwischen den einzelnen Erkennungssequenzen unterschieden werden. Die Bindungsstelle 5B.3, welche mit  $R = 0,677$  für die *seed-target*-Sequenz eine mittelmäßige Korrelation zwischen Zugänglichkeit und Bindungsstärke aufweist und die Bindungsstelle S3 mit einer sehr starken

Korrelation für alle drei Regionen von ca.  $R = 0,9$ , können durch die zusätzliche Berücksichtigung des Adenosins nicht gesteigert werden. Für die *complete*-Bindungsstelle 5B.2 in der NS5B-kodierenden Region konnte jedoch durch das zusätzliche Adenosin eine Verbesserung der schwachen Korrelation von  $R = 0,380$  (ohne Adenosin) auf  $R = 0,481$  (mit Adenosin) nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung der *seed-target*-Sequenz, in Kombination mit dem Adenosin, kann allerdings nur eine sehr geringe Steigerung von  $R = 0,208$  auf  $R = 0,254$  beobachtet werden. Dieses Ergebnis ist besonders überraschend, da bei der Berechnung der Korrelation zwischen Zugänglichkeit und Bindungsintensität jeweils die Isolate Con1 und J6-JFH1 mit einbezogen wurden, J6-JFH1 für die Bindungsstelle 5B.2 jedoch kein Adenosin aufweist. In die Berechnung fließt somit nur die Hälfte der Datenpunkte ein und dennoch konnte eine Steigerung nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass für Bindungsstellen, bei denen die Zugänglichkeit stark von den umgebenden Sequenzen abhängig und durchschnittlich eher niedrig ist, das zusätzliche Adenosin am ehesten eine Rolle spielt. Eine weitere Erklärung könnte auch in der Betrachtungsweise liegen. In dieser Arbeit erfolgte nur eine bioinformatische Auswertung aufgrund der Berechnung der *ssp* und nicht wie in den anderen Arbeiten experimentell. Um eine genauere Aussage darüber treffen zu können, in wie weit das Adenosin bei der Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die miR-122-Bindungsstelle in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR eine Rolle spielt, sollten Mutationsversuche durchgeführt werden, was jedoch aufgrund von mangelnder Zeit im Laufe dieser Arbeit nicht mehr möglich war. So könnte aber eine genauere Aussage über die Relevanz des Adenosins auf die Bindungsintensität getroffen werden. Dies wäre vor allem für die Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region interessant, da hier keine starke Korrelation nachgewiesen werden konnte. Zum einen wäre insbesondere für die 5B.2 Bindungsstelle interessant zu sehen, ob die Steigerung der Bindungsintensität tatsächlich aufgrund des Adenosins zustande kommt und sich durch mehr Datenpunkte für Con1, welches im Vergleich zu J6-JFH1 ein Adenosin enthält, die Korrelation nochmals steigern lässt. Zum anderen wäre es für die miR-122-Bindungsstelle 5B.3, aber auch für S3, bei denen das Adenosin bioinformatisch keine Rolle spielt, interessant zu sehen, ob die Bindungsintensität durch einen Austausch des Adenosins reduziert wird. Dadurch könnte man darauf schließen, dass die Anwesenheit des Adenosins wichtig ist, jedoch nicht unbedingt das Vorliegen als Einzelstrang.

Auch wenn es für die miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR nicht unbedingt bestätigt werden konnte, ist es interessant zu sehen, dass ein solches Adenosin ebenfalls in 70/83 Isolaten für die ersten miR-122-Bindungsstelle in der HCV-5'-UTR nachgewiesen werden konnte (*Sequenz-Alignments* im Anhang von [48]). Diese Ergebnisse sind ein weiterer Grund, in zukünftigen Arbeiten das Adenosin am 3'-Ende der miR-122-Bindungsstellen genauer zu untersuchen.

### 3.1.4 Die Auswirkung der Zugänglichkeit der miR-122-Bindungsstelle auf die Bindungsstärke hängt vom HCV-Isolat ab

Das HCV zeigt ein großes Maß an Variabilität in seinem Genom. Daher konnten bisher 7 Genotypen identifiziert werden, welche sich weiter in 67 Subtypen unterteilen lassen [6]. Die Genotypen und Subtypen zeigen eine unterschiedliche geographische Verbreitung. So kommen die Genotypen 1–3 überwiegend weltweit vor, wobei in Europa der Genotyp 1 am häufigsten auftritt. Die Genotypen 4–6 dagegen kommen geographisch nur sehr begrenzt vor [7; 8; 9]. Bisher konnten noch keine Unterschiede in der Virulenz der Genotypen oder Subtypen nachgewiesen werden. Um eine geeignete Therapie beginnen zu können, ist es allerdings wichtig zu wissen, welcher Genotyp bei dem Patienten vorliegt, da diese mit unterschiedlichen Medikamenten und unterschiedlich lange behandelt werden müssen [12; 163]. In den vergangenen Jahren konnten immer mehr Interferon-freie Behandlungsmöglichkeiten entwickelt werden, welche eine gute Heilungsrate aufweisen [164]. Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass der Genotyp 1 schlechter auf eine antivirale Therapie anspricht als die Genotypen 2 und 3, weshalb mehrere Kombinationstherapien angewendet werden [165; 166].

Da die miR-122 einen großen Einfluss auf den HCV-Vermehrungszyklus hat [98; 135; 139; 142] und ein Medikament, welches als anti-miR-122 wirken soll, erforscht wird [167; 168; 169] ist es interessant zu sehen, wie sich unterschiedliche Genotypen in Verbindung mit der miR-122 verhalten. In Rahmen dieser Arbeit wurden für die Bindungsexperimente zwei HCV-Isolate verwendet, das Isolat Con1, welches auf dem HCV-Subtyp 1b basiert, und die Chimäre J6-JFH1, welche dem Subtyp 2a zugeordnet ist. Während in den Kapiteln 2.2.2.1–2.2.2.3 die Ergebnisse der Bindungsstudien beider Isolate verwendet wurden, wurde in Kapitel 2.2.2.4 die Daten separiert und die Korrelation zwischen Zugänglichkeit der miR-122-Bindungsstelle 5B.2 und der Bindungsstärke für das jeweilige Isolat betrachtet.

Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Zugänglichkeit der miR-122-Bindungsstelle für Con1 eine größere Rolle spielt als für J6-JFH1 (Abbildung 2.14). Während für Con1 sowohl die *complete*-Bindungsstelle, als auch die kürzeren Nukleotidsequenzen der *seed-target*-Sequenz und der Kern-Sequenz mit  $R = 0,789–0,936$  eine sehr hohe Korrelation aufweisen, zeigt sich bei J6-JFH1 mit  $R = 0,516$  nur eine mittlere Korrelation bei der *complete*-Bindungsstelle und eine starke bei der *supplemental*-Region ( $R = 0,858$ ). Die Zugänglichkeit der *seed-target*-Sequenz und der Kern-Sequenz haben mit einem negativen Korrelationskoeffizienten bei diesem Isolat keinen speziellen Einfluss auf die Stärke der Bindung der miR-122 an ihre Erkennungssequenz. Die Bindungsintensität scheint daher von Faktoren abzuhängen, die nicht direkt in der Bindungsstelle selbst lokalisiert sind, z.B. vom unterschiedlichen Einfluss RNA-bindender Proteine oder von subtilen Unterschieden in der Sequenz der flankierenden Regionen, deren Einfluss auf die Zugänglichkeit der Bindungsstelle von meinen Berechnungen nicht erfasst werden konnte. Die Bindung der miR-122 an die Bindungsstelle 5B.2 ist

im Isolat J6-JFH1 auch insgesamt etwas schwächer als beim Isolat Con1. Diese Beobachtung könnte eine mögliche Erklärung dafür liefern, weshalb der Genotyp 1 schlechter auf eine antivirale Therapie anspricht und die Therapiedauer länger nötig ist als bei anderen Genotypen.

Es konnte in humanen Huh7.5 Zellen bereits nachgewiesen werden, dass die Infektion von J6-JFH1 basierten Plasmiden, welche jeweils die HCV-Sequenzen 5'-UTR, Core, E1, E2, p7 und NS2 der Genotypen 1–6 enthalten, durch die Gabe einer Antagonisten-miR-122 (Miravirsen) vermindert werden kann [170]. Zudem konnte gezeigt werden, dass für diese Wirkungsweise vor allem die miR-122-Bindungsstelle S1 benötigt wird [171]. Allerdings konnte eine klinische Studie mit Genotyp 1-infizierten Patienten zwar nachweisen, dass es bei der Gabe von Miravirsen dosis-unabhängig zu keiner viralen Resistenz kommt, jedoch nur etwa die Hälfte der Patienten eine mehr als 50-fache Reduktion der Viruslast aufweisen [169]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten an der Untersuchungsweise liegen, aber auch durch unterschiedliche Reaktion der Genotypen auf die Gabe von Miravirsen zu erklären sein.

Da die obige Untersuchung nur die miR-122-Bindungsstellen S1 und S2 in die Betrachtung mit einbezog, wäre es im Hinblick auf die Ergebnisse in dieser Arbeit interessant zu sehen, wie sich die unterschiedlichen Isolate bei einer solchen Behandlung verhalten wenn die strangabwärts liegenden miR-122-Bindungsstellen untersucht werden. Außerdem sollten weitere Experimente für einen größeren Stichprobenumfang durchgeführt werden, um eine genauere Aussage über die Unterschiede der Isolate bei einer miR-122-Bindung treffen zu können. Da für die Bindungsstellen 5B.3 und S3 zu wenig Datenpunkte zur Verfügung standen, konnte hier keine Separierung der Isolate vorgenommen werden. Daher wäre es interessant, auch hier weitere Experimente durchzuführen, um zu sehen, ob es sich hier ebenso verhält. Zudem könnten Untersuchungen an weiteren Isolaten in Betracht gezogen werden.

## 3.2 Einfluss einer miR-122/Ago2-Bindung auf HCV

### 3.2.1 Die *supplemental*-Region hat keinen bedeutenden Einfluss auf die Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA

Dominik Conrad führte im Laufe seiner Dissertation nicht nur Bindungsstudien an den Bindungsstellen in der 5'-UTR durch, sondern auch erste Versuche an der Bindungsstelle in der 3'-UTR. Während er mit der co-IP direkt eine starke Bindung an die Bindungsstellen in der 5'-UTR nachweisen konnte, gelang ihm das in der 3'-UTR zunächst nicht. Um eine mögliche Erklärung dafür zu finden, betrachtete er die Art der miR-122-Anlagerung an die Bindungsstellen in der 5'-UTR etwas genauer. Wie bereits mehrfach in der Literatur beschrieben wurde, bindet die miR-122 nicht nur mit der *seed*-Sequenz an die Bindungsstelle der HCV-RNA, sondern auch mit einer *supplemental*-Region (Abbildung 1.15), wobei sich zwischen den Regionen eine *bulge*- und dahinter eine „Schwanz“-Region

ausbildet [144; 172]. Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass diese Art der Bindung die HCV-RNA stabilisiert und vor einer möglichen Degradierung schützt [136; 137; 138; 141; 144; 172].

Diese Bindung verglich er mit der Art, wie die miR-122 an die 3'-UTR bindet und erkannte, dass die miR-122 bei seinem verwendeten Transkript keine Möglichkeit hat, mit einer *supplemental*-Region an die HCV-RNA zu binden. Deswegen führte er erste Sequenz-Alignments durch und entdeckte eine 4 Nukleotide lange konservierte Region, an der die miR-122 mit einer *supplemental*-Region binden könnte. Nachdem er co-IP-Experimenten durchführte, welche diese Region beinhaltete, konnte er eine schwache Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die 3'-UTR nachweisen (Dissertation Dominik Conrad). Diese *supplemental*-Region überlappt zwei Nukleotide mit dem Stopp-Codon und ragt zwei weitere Nukleotide in die NS5B-kodierenden Region. Die Konservierung und die Lage dieser Region lassen auf eine mögliche Funktion schließen. Um den Einfluss dieser Region genauer untersuchen zu können wurde in dieser Arbeit die miR-122-Bindungsstelle S3 in drei Bereiche aufgeteilt und in jeden Bereich Mutationen eingefügt, die eine Bindung der miR-122 verhindern soll (Kapitel 2.3). Neben diesen Mutationen wurden auch Mutationen in die miR-122-Bindungsstellen der NS5B-kodierenden Region 5B.2 und 5B.3 integriert, um deren Bedeutung im HCV-Vermehrungszyklus untersuchen zu können.

Wie bereits von Machlin *et al.* für die *seed-target*-Sequenzen in der 5'-UTR nachgewiesen werden konnte, verhindert bereits der Austausch eines Nukleotids die Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA [98; 144]. Auch Jopling *et al.* konnten für die erste *seed-target*-Sequenz in der 5'-UTR zeigen, dass der Austausch eines Nukleotids ausreicht, um mittels Northern Blot keine RNA-Akkumulation mehr nachweisen zu können, diese allerdings durch eine komplementär mutierte miR-122 wieder hergestellt werden kann. Zudem führten sie erste Mutationsversuche für die miR-122-Bindungsstelle der 3'-UTR durch, konnten jedoch trotz eines 4 Nukleotide-Austauschs innerhalb der *seed-target*-Sequenz die RNA-Akkumulation nicht verhindern [98]. Aufgrund all dieser Punkte wurden die Mutationen wie in Tabelle 2.3 dargestellt vorgenommen. Die durchgeführten co-IP-Experimente zeigen für 4 der 5 verwendeten radioaktiv-markierten Transkripte, dass eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA unterbunden werden konnte. Einzig die Mutation der *supplemental*-Region S3<sub>su,m</sub> konnte die Bindung nicht verhindern (Abbildung 2.16). Diese Ergebnisse widerlegen die von Dominik Conrad aufgestellte Theorie, dass die *supplemental*-Region für die Bindung der miR-122 an die Bindungsstelle in der 3'-UTR benötigt wird.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte darin liegen, dass Dominik Conrad das Isolat Con1 nutzte, während in dieser Arbeit die Chimäre J6-JFH1 für die Untersuchung der *supplemental*-Region verwendet wurde. Eine andere Erklärung könnte in der Betrachtungsweise liegen. Die Nukleotide der *supplemental*-Region werden in einer konservierten Haarnadelstruktur präsentiert [48]. Während bei den Versuchen von Dominik Conrad diese HCV-Struktur entweder

an- oder abwesend war, wurden in dieser Arbeit zwar Mutationen in die *supplemental*-Region eingefügt, die Haarnadelstruktur an sich war aber immer vorhanden. Für weitere Untersuchungen wäre es somit interessant zu sehen, ob die Bindung der miR-122 an die HCV-RNA auch im J6-JFH1-Kontext unterbunden werden kann, wenn die Haarnadelstruktur, in der die *supplemental*-Region präsentiert wird, nicht anwesend wäre. Dies würde darauf schließen lassen, dass nicht zwingend die 4 Nukleotide lange Sequenz für eine Bindung vorhanden sein muss, sondern die HCV-Struktur strangaufwärts eine entscheidende Rolle spielt und somit die Bedeutung der Sekundärstruktur nochmals bestätigt. Denn auch von Mortimer und Doudna konnte 2013 im Genotyp 1b gezeigt werden, dass die *supplemental*-Regionen der miR-122-Bindungsstellen in der 5'-UTR für die beiden Bindungsstellen eine unterschiedliche Bedeutung haben [172]. Während für S1 diese Region *in vitro* nicht an der Bindung der miR-122 beteiligt ist, spielt sie für die Bindung an die S2 eine Rolle und ist wichtig für die Stabilität der miR-122/HCV-Bindung.

Da in dieser Arbeit aber auch gezeigt werden konnte, dass insbesondere für das Isolat Con1 die Zugänglichkeit der Bindungsstelle mit der Bindungsstärke korreliert (Tabelle 2.2), könnte das eine andere Erklärung dafür sein, weshalb Dominik Conrad mit dem längeren NS5B-Transkript eine Bindung nachweisen konnte. Nach einer erfolgten Berechnung der *ssp* für die *seed-target*-Sequenz kann nämlich gezeigt werden, dass sich die Zugänglichkeit von  $ssp = 0,305$  für das Transkript ohne die NS5B-Region auf  $ssp = 0,487$  mit der NS5B-Region verbessert, die miR-122-Bindungsstelle somit um einiges zugänglicher wird und eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes erleichtert.

### **3.2.2 Die Nutzung der verschieden mutierten miR-122 in einem Konstrukt ist nur bedingt möglich**

Für den weiteren Verlauf dieser Arbeit war es nicht nur wichtig zu sehen, dass die Mutationen die Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA unterbinden, sondern auch, dass die komplementär mutierten miR-122 die Bindung wieder herstellen können. Nur so ist es möglich, eine konkrete Aussage über die Funktion der einzelnen Bindungsstellen zu treffen. Außerdem ist es für Experimente mit einer Kombination mutierter miR-122-Bindungsstellen wichtig zu sehen, ob es zu unspezifischen Bindungen der mutierten miR-122 an diese Erkennungssequenzen kommt. Dazu wurde jede mutierte miR-122 mit jeder mutierten miR-122-Bindungsstelle transfiziert und in co-IP-Experimenten auf eine Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes hin untersucht. Die einzelnen Ergebnisse sind in Kapitel 2.3.3 dargestellt.

Wie in Abbildung 2.17 zu erkennen ist, konnte sowohl für die miR-122-Bindungsstelle 5B.2m als auch für 5B.3m mit der jeweiligen komplementär mutierten miR-122 wieder eine Bindung nachgewiesen werden. Diese Bindung ist im Falle von miR-122/5B.2m jedoch nur halb so stark wie bei dem Wildtyp. Außerdem wird jede der beiden Erkennungssequenzen jeweils noch von einer anderen mutierten

miR-122 gebunden. Die miR-122/S2m bindet ebenfalls an die Bindungsstelle 5B.2m und dies sogar doppelt so stark wie die eigentliche kompensierende miR-122/5B.2m. An die Bindungsstelle 5B.3m bindet zusätzlich noch die miR-122/5B.2m, und das genauso stark wie bei der Adressierung mit der miR-122/5B.3m. Um eine mögliche Erklärung dafür zu finden, weshalb miR-122/S2m an die 5B.2m-RNA und miR-122/5B.2m an die 5B.3m-RNA bindet, wurden die mutierten miR-122-Bindungsstellen (Tabelle 2.3) mit jeder mutierten miR-122-Sequenz verglichen (Kapitel 4.1.10.2). Diese Art der Betrachtung liefert allerdings keine klare Erkenntnis darüber, weshalb die eine mutierte miR-122 bindet und andere nicht, denn alle weisen eine gleich große Übereinstimmung mit der mutierten Bindungsstelle auf. Es kann sich somit einfach um unspezifische Bindungen handeln und sollte durch weitere co-IP-Experimente überprüft werden.

Für die Versuche an den Bindungsstellen S3<sub>se</sub>m und S3<sub>co</sub>m zeigt Abbildung 2.18 deutlich, dass in beiden Fällen eine Bindung wiederhergestellt werden konnte. Die Bindung der miR-122/S3<sub>se</sub>m an die entsprechende Erkennungssequenz zeigt jedoch eine 4-fach schwächere Bindung als im Wildtyp-System (Abschnitt A der Abbildung 2.18). Ebenfalls zu erkennen ist eine schwache unspezifische Bindung der S3<sub>se</sub>m-Bindungsstelle mit der miR-122/S2m, aber dafür eine sehr starke, mit dem Wildtyp vergleichbare Bindung der miR-122/S3<sub>co</sub>m. Wie oben erwähnt und in Abschnitt B der Abbildung 2.18 zu sehen ist, kann durch die miR-122/S3<sub>co</sub>m zwar der miR-122/Ago2-Komplex an die Bindungsstelle S3<sub>co</sub>m hybridisieren, dies jedoch nicht so stark wie an der Bindungsstelle S3<sub>se</sub>m (Abschnitt A). Dass sich die miR-122/S3<sub>se</sub>m nicht an die S3<sub>co</sub>m Erkennungssequenz anlagert, könnte dafür sprechen, dass die *supplemental*-Region doch eine gewisse Rolle bei der miR-122/Ago2-Komplex-Bindung an die HCV-RNA spielt, da sich die beiden miR-122 nur durch den 3 Nukleotide Austausch in der *supplemental*-Region unterscheiden. Aber auch hier bedarf es weiterer co-IP-Experimente, bevor Versuche mit einer Kombination von Mutationen durchgeführt werden können, um eine unspezifische Bindung auszuschließen.

Da in den verwendeten Konstrukten ebenfalls immer wildtypische miR-122-Bindungsstellen vorliegen, musste noch nachgeprüft werden, ob die mutierten miR-122 an diese Stellen binden. Wie in Abbildung 2.19 zu erkennen ist, konnte für keine der untersuchten mutierten miR-122 eine Anlagerung an die Wildtyp-miR-122-Bindungsstelle nachgewiesen werden. Für die miR-122/S1m und miR-122/S2m wurde dies von Anika Nieder-Röhrmann im Laufe ihrer Dissertation gezeigt und in dieser Arbeit nicht nochmals überprüft. Aufgrund dieser Ergebnisse kann mit Funktionalitätsversuchen, welche Konstrukte mit nur einer Mutation enthalten, begonnen werden.

### 3.2.3 Die Bindung der miR-122 an die Bindungsstelle in der 3'-UTR hat einen inhibierenden Effekt auf die Translation

Dass die Bindung der leberspezifischen miR-122 an die Bindungsstellen in der 5'-UTR zu einer Steigerung der IRES-vermittelten Translation führt, wurde schon mehrfach *in vitro* und *in vivo* untersucht und in der Literatur beschrieben [99; 135; 142]. Diese Entdeckung war zu dem Zeitpunkt allerdings sehr überraschend, da nur wenig darüber bekannt war, dass es durch die Interaktion von microRNAs mit der 5'-UTR zu einer Translationsregulation kommt [173; 174; 175]. So klar die Rolle der 5'-UTR wurde, so unklarer und widersprüchlicher wird der Einfluss der 3'-UTR auf die HCV-Translation diskutiert. Während einige Studien keine Bedeutung der 3'-UTR nachweisen können [151], gibt es andere, die einen stimulierenden [50] bzw. einen inhibierenden [152] Effekt zeigen. Aufgrund dieser unterschiedlichen Erkenntnisse ist vielleicht auch zu erklären, weshalb die Bedeutung der miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR bislang so gut wie gar nicht untersucht wurde. Lediglich von Henke und Goergen wurden 2008 erste Versuche an der miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR durchgeführt [99]. Es gab ein Konstrukt mit mutierter miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR, während die 5'-UTR als Wildtyp vorlag. In Luciferase-Assays konnten die Autoren für das Konstrukt eine Steigerung der Translationseffizienz nachweisen. Sie kamen jedoch zu dem Schluss, dass die Translationsstimulation nicht durch eine Bindung der miR-122 an die Erkennungssequenz in der 3'-UTR hervorgerufen wurde. Dies bedarf jedoch einer genaueren Untersuchung. Dafür wurden in dieser Arbeit Luciferase-Konstrukte generiert, in denen zum einen nur die Bindungsstellen in der 5'-UTR oder nur die Bindungsstelle in der 3'-UTR mutiert vorlagen, und zum anderen auch ein Konstrukt, in dem alle drei mutiert sind (Abbildung 2.20). Die Transfektion der HCV-Reporter-RNAs erfolgte in HeLa-Zellen, welche keine endogene miR-122 besitzen. Dadurch war es möglich, die mutierten Bindungsstellen mit der mutierten miR-122 zu adressieren und so den Effekt einer Bindung genauer zu untersuchen sowie den Einfluss anderer Faktoren zu minimieren.

Ein weiterer wichtiger Grund für die erneute Untersuchung der 3'-UTR in Bezug auf die Translation lag in der Beobachtung von Dominik Conrad, dass die *supplemental*-Region eine wichtige Rolle bei der Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA spielt. Da die Region bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht untersucht war, stellte sich die Frage, welchen Einfluss sie auf die Translation hat. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnisse, welche in den Abbildung 2.21 und Abbildung 2.22 dargestellt sind, zeigen einen deutlichen Einfluss der miR-122-Bindungsstelle S3 auf die Translation und widerspricht in diesem Punkt der Interpretation der bisher einzigen Publikation dazu [99]. Andere Aussagen konnten jedoch auch bestätigt werden. So ist die Anwesenheit der 3'-UTR für die Translation von HCV unbedingt notwendig [50] und die Bindung einer miR-122 an die Bindungsstellen in der 5'-UTR steigert die Translation [99; 135].

Bei der Betrachtung der Daten in Abbildung 2.21 und Abbildung 2.22 ist zu erkennen, dass die Bindung der mutierten miR-122 an die kompensierend mutierte Bindungsstelle in der 3'-UTR zu einer Reduktion der Translation führt. Wird die Bindungsstelle in denselben Konstrukten nicht adressiert, ist die Translation um durchschnittlich 100 % gesteigert. Auch bei Henke und Goergen ist eine solche Reduktion zu erkennen, wenn darauf geachtet wird, dass die 3'-UTR-Mutante in Kombination mit miR-122 eine um 40 % stärkere Translation aufweist als der Wildtyp. Dieses Ergebnis sollte an sich nicht verwundern, da es mit vielen Erkenntnissen der Literatur übereinstimmt, wonach microRNAs gebunden an ihre Zielsequenzen in der 3'-UTR zu einer Repression der Translation führen [111; 174; 175; 176], wobei die Repression bei gecappten mRNAs allerdings über das Cap vermittelt wird, das bei HCV nicht vorhanden ist.

Auffällig ist jedoch, dass bei HCV der negative Einfluss der Adressierung der miR-122 an die 3'-UTR nur zustande kommt, wenn die Bindungsstellen in der 5'-UTR mit miR-122 gebunden vorliegen. Dies könnte auf eine Interaktion zwischen den miR-122/Ago2-Komplexen der 5'- und 3'-UTR hindeuten. Da eine solche Interaktion jedoch noch nicht genau nachgewiesen werden konnte, bedarf es weiterführender Experimente, um dies zu klären. Eine andere mögliche Erklärung für eine Translationsreduktion könnte auch darin liegen, dass durch die Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die 3'-UTR nicht funktionsfähige Proteine entstehen, welche direkt wieder abgebaut werden. Dazu könnte es kommen, weil der Komplex das Ribosomen daran hindert, die Translation komplett abzuschließen, bzw. weil das Stopp-Codon blockiert ist und die Translation zu lange läuft.

Die Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die *supplemental*-Region konnte in den co-IP-Experimenten nicht unterbunden werden (Abbildung 2.16), dennoch scheint sie einen Effekt auf die Translation zu haben. Dies ist bei der Betrachtung der S3<sub>se</sub>m- und S3<sub>co</sub>m-Konstrukte zu erkennen. Obwohl das S3<sub>su</sub>m-Konstrukt sich größtenteils wie der Wildtyp verhält (was durch die weiterhin mögliche Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes zu erwarten ist), zeigen sich deutliche Unterschiede bei den Daten der S3<sub>se</sub>m- und S3<sub>co</sub>m-Konstrukte, welche sich nur durch die S3<sub>su</sub>m-Sequenz unterscheiden. Während die Translation in dem S3<sub>se</sub>m-Konstrukt im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert ist, weist das S3<sub>co</sub>m-Konstrukt eine sehr starke Translation auf. Eine mögliche Erklärung dafür kann allerdings mit dem momentanen Wissenstand nicht gegeben werden und lässt nur die Vermutung zu, dass die *supplemental*-Region zwar keine entscheidende Rolle bei der Bindung des miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA spielt, aber eine große bei der Translation. Es bedarf weiterer Versuche, um dies abschließend zu klären. Auffällig ist jedoch, dass die Translationseffizienz bei den S1mS2m-Konstrukten prinzipiell höher ist. Dies könnte jedoch durch die von Anika Nieder-Röhrmann generierten Mutationen erklärt werden, bei denen sie ein zusätzliches G zur besseren Bindung der mutierten miR-122 eingefügt hat (Dissertation Anika Nieder-Röhrmann).

### 3.2.4 Weiterführende Versuche

Da im Laufe dieser Arbeit nicht mehr genügend Zeit war, um einige Fragen abschließend zu klären sollten weiterführende Versuche durchgeführt werden.

Jura Henke untersuchte im Laufe ihrer Dissertation den Einfluss der miR-122-Bindungsstellen auf die Translation sowohl von HCV-Reporter-RNAs also auch im vollständigen HCV-Genom. Dabei entdeckte sie, dass es im vollständigen HCV-Genom zu einem verminderten Effekt der miR-122 auf die Translation kam. Ihre Erklärung dafür lag darin, dass das HCV-Genom weitere miR-122-Bindungsstellen in der Protein-kodierenden Sequenz aufweist, welche die miR-122 binden und sie somit den Bindungsstellen in der 5'- und 3'-UTR nicht mehr zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wurden die in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Mutationen in die NS5B-kodierende Region und die 3'-UTR eines Minimalkonstrukt von Lyudmila Shalamova (Dissertation Lyudmila Shalamova) integriert, wodurch sie in weiteren Versuchen in der Lage sein wird deren Einfluss auf die Plus- und Minusstrang-Synthese separat zu untersuchen.

Des Weiteren konnten die Mutationen 5B.2m, 5B.3m und S3<sub>se</sub>m von Gesche Gerresheim in das vollständige HCV-Genom integriert werden, um auch hier den Effekt dieser Stellen genauer untersuchen und somit eine Aussage darüber treffen zu können, welche Rolle diese miR-122-Bindungsstellen im HCV-Vermehrungszyklus spielen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Ursprung
HeLa	Bartenschlager Labor, Heidelberg, Deutschland	Humane Zervixkarzinoma Zellen
Naive Huh7.5	Rice Labor, Rockefeller Universität, US	Humane Hepatokarzinoma Zellen

#### 4.1.2 Bakterien

Bakterienstamm	Firma	Genotyp
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Invitrogen™	F <sup>-</sup> $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>k</sub></i> <sup>+</sup> ) <i>phoA</i> <i>supE44</i> $\lambda$ - <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>
<i>E. coli</i> Top10	Invitrogen™	F- <i>mcrA</i> ( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> ) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>ara</i> $\Delta$ 139 $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ) 7697 <i>galU</i> <i>galk</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>

#### 4.1.3 Puffer

##### 4.1.3.1 Kulturmedien und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Lennox Broth (LB)-Medium	20 g/l	LB-Pulver
	@ 1 l	dH <sub>2</sub> O
	Sterilisation durch Autoklavieren (15 min , 121 °C )	
LB-Agar-Platten	20 g/l	LB-Pulver

---

	2 % (w/v)	Bacto Agar LB-Medium
	@ 400 ml	dH <sub>2</sub> O
	Sterilisation durch Autoklavieren (15 min, 121 °C)	
TFB1	30 mM	Kaliumacetat
	10 mM	CaCl <sub>2</sub>
	50 mM	MnCl <sub>2</sub>
	100 mM	RbCl <sub>2</sub>
	15 % (v/v)	Glycerol
	@ 120 ml	dH <sub>2</sub> O
	Einstellen des pH-Wertes auf pH 5,8 mit 1 M Essigsäure (~ 140 µl ); Sterilfiltrieren	
TFB2	10 mM	MOPS (pH 6,5)
	75 mM	CaCl <sub>2</sub>
	10 mM	RbCl <sub>2</sub>
	15 % (v/v)	Glycerol
	@ 120 ml	dH <sub>2</sub> O
	Einstellen des pH-Wertes auf pH 6,5 mit 1 M KOH (≤ 10 µl); Sterilfiltrieren	
PBS	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	4,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Zellkulturmedium	50 ml	FBS
	5 ml	Penicillin/Streptomycin
	in 500 ml	DMEM
Einfriermedium	10 ml	FBS
	5 ml	DMSO
	@ 50 ml	DMEM

#### 4.1.3.2 Gel Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
10 x TBE (Tris-Borat-EDTA )	108 g	Tris
	55 g	Borsäure
	40 ml	0.5 M EDTA (pH 8,0)
	@ 1 l	ddH <sub>2</sub> O
50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA)	242 g	Tris
	57,1 ml	Essigsäure
	100 ml	0.5 M EDTA (pH 8,0)
	@ 1 l	ddH <sub>2</sub> O

#### 4.1.3.3 Nukleinsäure Probenpuffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
RNA-Probenpuffer (FA-Puffer)	80 %	Formamid
	10 %	Glycerol
	50 mM	EDTA (pH 7,5)
	einige Körner Bromphenolblau und Xylencyanol	
	@ 20 ml	ddH <sub>2</sub> O
	Aufbewahrung bei -20 °C in 2 ml Aliquots	
DNA-Probenpuffer	75 %	Glycerin
	50 mM	EDTA (pH 8,0)
	einige Körner Bromphenoblau und Xylencyanol	
	@ 20 ml	dH <sub>2</sub> O
	Aufbewahrung bei -20 °C in 2 ml Aliquots	

#### 4.1.3.4 co-IP-Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
co-IP-Lysepuffer	25 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	150 mM	KCl
	2 mM	EDTA (pH 7,5)
	0,5 mM	DTT
	0,5 %	NP-40
	@ 250 ml	ddH <sub>2</sub> O
co-IP-Waschpuffer	50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	300 mM	NaCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,05 %	NP-40
	@ 500 ml	ddH <sub>2</sub> O
Proteinase K Puffer	200 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	300 mM	NaCl
	25 mM	EDTA (pH 7,5)
	2 %	SDS
	@ 50 ml	ddH <sub>2</sub> O
Fixierlösung	7,5 %	Essigsäure
	5 %	Ethanol
	@ 1 l	dH <sub>2</sub> O

#### 4.1.3.5 SDS-PAGE Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
30 % Acrylamid-Lösung	Verdünnung von 150 ml Rotiphorese Gel (19:1) mit dH <sub>2</sub> O in einem Endvolumen von 200 ml	
Trenngel-Puffer (pH 8,8)	90,75 g	Tris
	@ 400 ml	dH <sub>2</sub> O
	Einstellen des pH-Wertes auf 8,8 mit HCl; Auffüllen auf 500 ml Gesamtvolumen mit dH <sub>2</sub> O	

Sammelgel-Puffer (pH 6,8)	90,75 g	Tris
	@ 400 ml	dH <sub>2</sub> O
	Einstellen des pH-Wertes auf 6,8 mit HCl;	
	Auffüllen auf 500 ml Gesamtvolumen mit dH <sub>2</sub> O	
10 % SDS (w/v)	5 g	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	@ 50 ml	dH <sub>2</sub> O
10 % APS	0,1 g	Ammoniumpersulfat (APS)
	@ 10 ml	dH <sub>2</sub> O
10 x SDS-Laufpuffer	10 g	SDS
	30 g	Tris
	144 g	Glycin
	@ 1 l	dH <sub>2</sub> O
	Für 1 x SDS Laufpuffer 1:10 mit dH <sub>2</sub> O verdünnen	
4 x SDS-Probenpuffer	20 %	Glycerol
	20 %	β-Mercaptoethanol
	60 %	10 % SDS
	125 mM	Tris
	einige Körner Bromphenolblau	
	@ 25 ml	ddH <sub>2</sub> O

#### 4.1.3.6 Western Blot Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Kathoden-Puffer	3 g	Tris
	@ 800 ml	dH <sub>2</sub> O
	Einstellen des pH-Wertes auf 9,4 mit HCl	
	100 ml	Methanol
	@ 1 l	dH <sub>2</sub> O
Anoden-Puffer I	36,3 g	Tris
	@ 800 ml	dH <sub>2</sub> O
	Einstellen des pH-Wertes auf 10,4 mit HCl	

	100 ml	Methanol
	@ 1 l	dH <sub>2</sub> O
Anoden-Puffer II	3 g	Tris
	@ 800 ml	dH <sub>2</sub> O
	Einstellen des pH-Wertes auf 10,4 mit HCl	
	100 ml	Methanol
	@ 1 l	dH <sub>2</sub> O
10 x TBS	60,5 g	Tris
	87,6 g	NaCl
	@ 800 ml	dH <sub>2</sub> O
	Einstellen des pH-Wertes auf 7,5 mit HCl	
	@ 1 l	dH <sub>2</sub> O
	Für 1 x TBE 1:10 mit dH <sub>2</sub> O verdünnen	
TBST	0,25 % (v/v)	Tween20
	1 l	1 x TBS
Blockierungspuffer	10 % (w/v)	Milchpulver
	100 ml	1 x TBST

#### 4.1.3.7 Elektroporationspuffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Zyтомix	120 mM KCl
	0,15 mM CaCl <sub>2</sub>
	10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,6)
	25 mM HEPES (pH 7,6)
	2 mM EGTA (pH 7,6)
	5 mM MgCl <sub>2</sub>
	@ 475 ml ddH <sub>2</sub> O
	Sterilfiltration; kurz vor Gebrauch mit 2 mM ATP (pH 7,6) und 5 mM Gluthathion (pH 7,6)

#### 4.1.4 Kits

Kit	Firma	Verwendungszweck
SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate	Pierce	Western Blot
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Scientific	Gelextraktion
GeneJet RNA Cleanup and Concentration Micro Kit	Thermo Scientific	RNA-Aufreinigung
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific	Plasmidaufreinigung
GeneJet Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Scientific	Plasmidaufreinigung
Renilla-Jucie Luciferase Assay Firefly“	PJK	Translationsmessung
Beetle-Jucie Luciferase Assay Firefly	PJK	Translationsmessung

#### 4.1.5 Größenmarker

Name	Firma
Hyper Ladder I	Bioline, Lichtenfels 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
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

#### 4.1.6 Antikörper und Magnetpartikel

Name	Firma
goat-anti-PTBP1	Abcam, Cambridge
IgG-POD	Roche, Mannheim
Protein G magnetic beads	New England Biolabs, Frankfurt am Main
rat-anti-Ago2, Klon 11A9	Sigma Aldrich, St. Louis

mouse-anti-FLAG

Sigma Aldrich, St. Louis

#### 4.1.7 Nukleotide

Name	Firma
Capping-Nukleotide (m7GpppG)	Promega, Mannheim
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs )	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Radioaktiv-markiertes $\alpha$ -32P-UTP	Perkin Elmer, Waltham
Ribonucleosidtriphosphate (rNTPs )	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

#### 4.1.8 Plasmide

Die Karten der stärker hervorgehobenen Plasmide befinden sich im Anhang 6.4

Bezeichnung	Eigenschaften	Hergestellt/bezogen von
<b>pUC18_J6-JFH1</b>	T7, 5'-UTR, Plasmid-Sequenz, 3'-UTR	Rice Labor
<b>pGEM-4Z_Fluc_Poly(A)</b>	T7, Fluc, Poly(A)	L. Löw Niepmann Labor
<b>pUC18_J6-JFH1_hRLuc</b>	T7, 5'-UTR_wt, hRLuc, NS5B-Fragment, 3'-UTR_wt	Eurofins
pUC18_J6-JFH1_hRLuc_S1S2_S3 <sub>su</sub> m	T7, 5'-UTR_wt, hRLuc, NS5B-Fragment, S3 <sub>su</sub> m	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_J6-JFH1_hRLuc_S1S2_S3 <sub>se</sub> m	T7, 5'-UTR_wt, hRLuc, NS5B-Fragment, S3 <sub>se</sub> m	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_J6-JFH1_hRLuc_S1S2_S3 <sub>co</sub> m	T7, 5'-UTR_wt, hRLuc, NS5B-Fragment, S3 <sub>co</sub> m	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_J6-JFH1_hRLuc_S1mS2m	T7, 5'-UTR_S1mS2m, hRLuc, NS5B-Fragment, 3'-UTR_wt	A. Nieder-Röhrmann Niepmann Labor
pUC18_J6-JFH1_hRLuc_S1mS2m_S3 <sub>su</sub> m	T7, 5'-UTR_S1mS2m, hRLuc, NS5B-Fragment, S3 <sub>su</sub> m	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_J6-JFH1_hRLuc_S1mS2m_S3 <sub>se</sub> m	T7, 5'-UTR_Sm1S2m, hRLuc, NS5B-Fragment, S3 <sub>se</sub> m	N. Dünnes Niepmann Labor

pUC18_J6-JFH1_hRLuc_S1mS2m_S3 <sub>co</sub> m	T7, 5'-UTR_S1mS2m, hRLuc, NS5B-Fragment, S3 <sub>co</sub> m	N. Dünnes Niepmann Labor
<b>pUC18_J6-JFH1_NS5B-3'-UTR</b>	pUC18 Plasmid Sequenz, NS5B-Sequenz_wt, 3'-UTR_wt	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_J6-JFH1_NS5B-3'-UTR_5B.2m	pUC18 Plasmid Sequenz, NS5B-Sequenz_5B.2m, 3'-UTR_wt	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_J6-JFH1_NS5B-3'-UTR_5B.3m	pUC18 Plasmid Sequenz, NS5B-Sequenz_5B.3m, 3'-UTR_wt	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_J6-JFH1_NS5B-3'-UTR_S3 <sub>su</sub> m	pUC18 Plasmid Sequenz, NS5B-Sequenz_wt, S3 <sub>su</sub> m	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_J6-JFH1_NS5B-3'-UTR_S3 <sub>se</sub> m	pUC18 Plasmid Sequenz, NS5B-Sequenz_wt, S3 <sub>se</sub> m	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_J6-JFH1_NS5B-3'-UTR_S3 <sub>co</sub> m	pUC18 Plasmid Sequenz, NS5B-Sequenz_wt, S3 <sub>co</sub> m	N. Dünnes Niepmann Labor
<b>pUC18_P.s_WT_SLI-II</b>	T7, EMCV IRES_wt, SLI-II, NS3-NS5B, 3'-UTR_wt	L. Shalamova Niepmann Labor
pUC18_P.s_WT_SLI-II_5B.2m	T7, EMCV IRES_wt, SLI-II, NS3-NS5B, 5B.2m	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_P.s_WT_SLI-II_5B.3m	T7, EMCV IRES_wt, SLI-II, NS3-NS5B, 5B.3m	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_P.s_WT_SLI-II_S3 <sub>se</sub> m	T7, EMCV IRES_wt, SLI-II, NS3-NS5B, S3 <sub>se</sub> m	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_P.s_WT_SLI-II_S3 <sub>co</sub> m	T7, EMCV IRES_wt, SLI-II, NS3-NS5B, S3 <sub>co</sub> m	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_P.s_WT_SLI-II_S1mS2m	T7, EMCV IRES_S1mS2m, SLI-II, NS3-NS5B, 3'-UTR_wt	L. Shalamova Niepmann Labor
pUC18_P.s_WT_SLI-II_S1mS2m_5B.2m	T7, EMCV IRES_S1mS2m, SLI-II, NS3-NS5B, 5B.2m	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_P.s_WT_SLI-II_S1mS2m_5B.3m	T7, EMCV IRES_S1mS2m, SLI-II, NS3-NS5B, 5B.3m	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_P.s_WT_SLI-II_S1mS2m_S3 <sub>se</sub> m	T7, EMCV IRES_S1mS2m, SLI-II, NS3-NS5B, S3 <sub>se</sub> m	N. Dünnes Niepmann Labor
pUC18_P.s_WT_SLI-II_S1mS2m_S3 <sub>co</sub> m	T7, EMCV IRES_S1mS2m, SLI-II, NS3-NS5B, S3 <sub>co</sub> m	N. Dünnes Niepmann Labor

## 4.1.9 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers bezogen.

### 4.1.9.1 DNA-Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
QC J6- JFH S1mS2m fwd	CTCACTATAGACTGCCCTAATAGGGGCGAGACTACGCAGTGAATCT ATCCCCTGTGAG
QC J6- JFH S1mS2m rev	CTCACAGGGGATAGATTCCTACTGCGTAGTCTCGCCCCTATTAGGGGCA GTCTATAGTGAG
Rv hRLuc 3'-UTR	GGTCTCTCTGCAGATCATGT
Rv hRLuc	GTGCTGAAGAACGAGCAG
5B.2a fwd	ACAGTCGCATGCGCAGGCTTAATACGACTCACTATAGGGGTGGGAGA CAGCTAGACACACTCCAG
5B.2a rev	CGCTAAGCCATGGAGTCGTTGAATGATCTGAGG
5B.2b fwd	CGCATGCGCAGGCTTAATACGACTCACTATAGGGTGCGTGGGAGACA GCTAGAC
5B.2b rev	TAGGGCTTTTTCAAGTTGTTCTGAG
5B.2c fwd	CGCATGCGCAGGCTTAATACGACTCACTATAGGGCCACTCGCCCGGG CTGCCTGG
5B.2c rev	GGTTCTGGTCCAGGGTGTC
5B.3a fwd	ACAGTCGCATGCGCAGGCTTAATACGACTCACTATAGGGGGCTACTG TCCCAGGG
5B.3a rev	CCTACCCCTACAGAAAGTAGGAGTAGGCAC
5B.3b fwd	CGCATGCGCAGGCTTAATACGACTCACTATAGGGCGGTGAAGACCAA GCTCAAACACTCCATTG
5B.3b rev	CTCTACCGAGCGGGGAGTAGGAAGAGGCC
5B.3c fwd	CGCATGCGCAGGCTTAATACGACTCACTATAGGGTCATCTCCCGTGG AGG
5B.3c rev	GCCTACCCCTACGAAAAGTAGGAGTAGGCCG
S3.a fwd	ACAGTCGCATGCGCAGGCTTAATACGACTCACTATAGGGCCGATGAA CGGGGAGCTAAACACTCCAGGC
S3.a rev	ACTAGTAGTACTTGATCTGCAGAGAGGCC
S3.b fwd	GCAGGCTTAATACGACTCACTATAGGGTCCCCGCTCGGTAGAGCGGC ACACACTAGGTACACTCCATAGCTAAC

S3.b rev	CATGATCTGCAGAGAGACCAGTTACGGCAC
S3.c fwd	CGCATGCGCAGGCTTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGGGGAGA CATATATCACAGC
S3.c rev	CAGGATGGCCTATTGGCCTGGAG
5B.2m fwd	CCCGGGCTGCCTGGGAAACAGTTAGACACAGCCCTATCAATTCATGG CTGGG
5B.2m rev	CCCAGCCATGAATTGATAGGGCTGTGTCTAACTGTTCCAGGCAGCC CGGG
5B.3m fwd	GCGGTGAAGACCAAGCTCAAAGTACACCATTGCCGGAGGCGCGCCT ACTGG
5B.3m rev	CCAGTAGGCGCGCCTCCGGCAATGGTGTGAGTTTGAGCTTGGTCTTC ACCGC
S3 <sub>su</sub> m fwd	CCTACTCCCCGCTGCCTAGAGCGGCACACACTAGGTACTCCATAGC TAAC
S3 <sub>su</sub> m rev	GTTAGCTATGGAGTGTACCTAGTGTGTGCCGCTCTAGGCAGCGGGGA GTAGG
S3 <sub>se</sub> m fwd	CCTACTCCCCGCTCGGTAGAGCGGCACACACTAGGTACTCTGCATAGC TAAC
S3 <sub>se</sub> m rev	GTTAGCTATGCAGAGTACCTAGTGTGTGCCGCTCTACCGAGCGGGGA GTAGG
S3 <sub>co</sub> m fwd	CCTACTCCCCGCTGCCTAGAGCGGCACACACTAGGTACTCTGCATAGC TAAC
S3 <sub>co</sub> m rev	GTTAGCTATGCAGAGTACCTAGTGTGTGCCGCTCTAGGCAGCGGGGA GTAGG
FW pUC18 neu	GCTGGCGAAAGGGGGATGTGC
Fwd HindIII Sfil pUC18-J6-JFH1	TGTGTCAAGCTTGTGGGCCCCGCGGGGCCCGCCGAGATACTACCTGA CCAGAGACCCAACAACGCCAC
pUC18-J6-JFH1 rev	CACACAGGAAACAGCTATGACCATG
S3 <sub>su</sub> m pUC18-J6-JFH1 rev	TATGGAGTGTACCTAGTGTGTGCCGCTCTAGGCAG
S3 <sub>se</sub> m pUC18-J6-JFH1 rev	TATGCAGAGTACCTAGTGTGTGCCGCTCTACCGAG
S3 <sub>co</sub> m pUC18-J6-JFH1 rev	TATGCAGAGTACCTAGTGTGTGCCGCTCTAGGCAG
RV 5'-UTR 363 nt	TGAGGTTTAGGATTTGTGCT

#### 4.1.9.2 RNA-Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
miR-122 mat	5'-@UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG-3'
miR-122*	5'-@AACGCCAUUAUCACACUAAAUA-3'
miR-122 S1m mat	5'-@UGUAGUCUGACAAAGUCGUUUG-3'
miR-122 S1m*	5'-@AACGACUUUAUCAGACUCAUA-3'
miR-122 S2m mat	5'-@UGGAUAGUGACAACUGUGUUUG-3'
miR-122 S2m*	5'-@AACGCAGUUAUCACUAUAAAUA-3'
miR-122 5B.2m mat	5'-@UGCUGUGUGACAAUGGUGUUUG-3'
miR-122 5B.2m*	5'-@AACGCCAUUAUCACACGAAAUA-3'
miR-122 5B.3m mat	5'-@UGGUGUCUGACAAUGGUGUUUG-3'
miR-122 5B.3m*	5'-@AACGCCAUUAUCAGACAAAUA-3'
miR-122 S3 <sub>se</sub> m mat	5'-@UGCAGAGUGACAAUGGUGUUUG-3'
miR-122 S3 <sub>se</sub> m*	5'-@AACGCCAUUAUCACUCUAAAUA-3'
miR-122 S3 <sub>co</sub> m mat	5'-@UGCAGAGUGACAAUGGUGGGUG-3'
miR-122 S3 <sub>co</sub> m*	5'-@CCCGCCAUUAUCACUCUAAAUA-3'

\* Gegenstrang zur Herstellung von microRNA-Duplexen

#### 4.1.10 Enzyme

Name	Firma
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DNase I	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Dpnl	New England Biolabs, Frankfurt am Main
EcoRI-HF	New England Biolabs, Frankfurt am Main
EcoRV-HF	New England Biolabs, Frankfurt am Main
HindIII-HF	New England Biolabs, Frankfurt am Main
One Taq Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Pfu <sub>turbo</sub> high fidelity DNA polymerase	Agilent Technologies, Santa Clara
Proteinase K	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNase A	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Sfil	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Spel	New England Biolabs, Frankfurt am Main

T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T7-RNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main

#### 4.1.11 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma
9 cm Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
Chromatography Papier 3MM Chr (Whatman Paper)	VWR, Darmstadt
Elektroporationsküvetten	Biorad, München
Filterspitzen (10 µl; 20 µl; 200 µl; 1250 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten (96-well)	Sarstedt, Nümbrecht
Nylonmembran, Roti Nylon Plus	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
PVDF Membran Immobilon-P, 0.45 µm	Milipore, Billerica
Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (Falcon: 15 ml; 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme, Kodak X-omat XAR	Eastman Kodak, USA
sterile serologische Pipetten (5 ml; 10 ml; 25 ml; 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> ; 75 cm <sup>2</sup> ; 175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten (6-wells)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht

#### 4.1.12 Chemikalien

Die nicht weiter aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Roche (Mannheim) bezogen.

Name	Firma
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Agar (Bacto)	Difco Labor
Agarose	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ammonium Persulfat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

Bisacrylamidlösung (29:1)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Brompenolblau	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Biozym, Oldendorf
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethanol (96 %, 99 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Formamid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Glycoblu	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Lipofectamine 2000	Life Technologie GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Milchpulver	EDEKA Krenschker, Gießen
Nariumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Nonidet P-40, Biochemica [Ersatzprodukt] (NP-40)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (10,000 U/ml)	Life Technologie GmbH, Darmstadt
Röntgenfilmentwickler und -fixierer	Agfa, Köln
Roti Phenol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 40 (19:1)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe

Trypsin-verdautes Peton	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Tween 20, Sigma Ultra	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Xylencyanolblau	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

#### 4.1.13 Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Avanti JXN-26 Centrifuge, JA-25.50, JA-10	Beckman Coulter
Beckmann J2-21, Rotoren JA 14, JA 20	Beckman Instruments
Bi-Destille, Destamat	Heraeus, Hanau
Blotapparatur, Fastblot B43/44	Biometra, Göttingen
Certomat®H	B. Braun, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubator Serie CB	Binder GmbH, Tuttlingen
Design ARTEFAKT	Industriekultur, Darmstadt
Digitales pH-Meter 644	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Elektrophorese Netzgerät, EPS 500/400	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
Elektroporator, GenePulser Xcell	Biorad, München
Filmkassetten, Cronex Lightning Plus	Du Pont, USA
Geiger-Zähler, LB 124	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
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
Horizontalschüttler 3020	GFL, Burgwedel
Hybridisierungssofen, HB-1000 Hybridiser	UVP, USA
Kippschüttler DuoMax1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Lamin Air HA 2448 BS Sterilbank	Heraeus, Hanau
Membranpumpe Diaphragm Pump	Vacuubrand GmbH + Co, Wertheim
Mixing Block MB-102	Bioer
Multifuge 3 L-R	Heraeus, Hanau

---

Netzgerät EPS 500/400	Pharmacia LBK, Freiburg
Phosphoimager Cyclone®Plus Storage Phosphor System G4321	Perkin Elmer
Pipetboy	Integra
Platteninkubator	Thermo Scientific, Schwerte
Qubit	Invitrogen
SLAB Gel Dryer Midel SE 1160	Hoefer Scientific Instruments, USA
Tecan infinite M200 multimode reader	Tecan, Crailsheim
Thermocycler, TProfessional	Biometra
Thermocycler, T1Thermocycler	Biometra
Tischzentrifuge, Centrifuge 5415C und 5417R	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Beckman Instruments
Wasserbad julabo	Julabo, Seelbach

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 4.2.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien werden 2,5 ml einer Übernachtskultur in 250 ml LB-Medium, versetzt mit 20 mM MgSO<sub>4</sub>, ca. 3 h bei 37 °C inkubiert, bis eine Zelldichte von 0,4-0,6 OD<sub>600</sub> erreicht ist. Anschließend wird die Kultur 5 min bei 2500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 100 ml eiskaltem Transformations-Puffer 1 (TFB1) aufgenommen und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wird das Pellet in 10 ml eiskaltem Transformations-Puffer 2 (TFB2) gelöst und 30 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Bakterien in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -40 °C gelagert.

#### 4.2.1.2 Kultivierung von *E. coli* DH5α und Top 10F'

Die Kultivierung von *E. coli* DH5α und Top 10F' erfolgt entweder auf Agar-Platten oder als Übernachtskultur in LB-Medium.

Bei der Herstellung der Kultiviermedien wird das Antibiotikum Ampicillin (3 µl Amp/ml Medium (50 mg/ml Ausgangslösung)) hinzugefügt. Da die nicht transfizierten *E. coli* Stämme keine β-Lactamase Aktivität besitzen können sie in Anwesenheit von Ampicillin nicht wachsen. Die Selektion der gewünschten Klone erfolgt nun aufgrund einer Ampicillin-Resistenz, welche alle verwendeten Plasmide mitbringen.

#### 4.2.1.3 Übernachtskultur im kleinen Maßstab

Für die Übernachtskultur im kleinen Maßstab werden 5 ml LB-Medium mit Ampicillin versetzt. Mit einer Pipettenspitze wird eine Einzelkolonie von einer Agar-Platte gepickt und in das Medium überführt. Die Bakterien werden anschließend auf einem Schüttelinkubator bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 170 rpm über Nacht inkubiert.

#### 4.2.1.4 Übernachtskultur im großen Maßstab

Für die Übernachtskultur im großen Maßstab werden 250 ml LB-Medium mit Ampicillin und einem 1/10000 einer Übernachtskultur im kleinen Maßstab (Kapitel 4.2.1.3) versetzt. Die Bakterien werden anschließend auf einem Schüttelinkubator bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 170 rpm über Nacht inkubiert.

#### 4.2.1.5 Transformation von Plasmiden in chemisch-kompetente Bakterien

Die Transformation dient zur schnellen und effizienten Vermehrung gewünschter Plasmid-DNA in Bakterienzellen.

Die chemisch-kompetenten Bakterienzellen werden für 10 min auf Eis aufgetaut. Zu 100 µl Bakterienzellen wird 5 µl Plasmid-DNA pipettiert und gemischt. Als Positivkontrolle dient ein 100 µl Ansatz mit 25 pg pUC18-Plasmid. Die Ansätze werden für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C und eine 2 min Inkubation auf Eis. Damit sich die Bakterien von diesem Stress erholen können, werden 900 µl LB-Medium zu den Ansätzen gegeben und diese für 1 h bei 37 °C und 170 rpm inkubiert. Danach erfolgt eine 2 min Zentrifugation bei 1500 x g, wonach 80 % des Mediums verworfen werden. Das Pellet wird in den restlichen 20 % Medium resuspendiert und auf Selektiv-Agar-Platten ausgestrichen. Diese werden dann bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### 4.2.2 Zellkultur

Alle Arbeitsschritte mit eukaryotischen Zellen werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Vor dem Gebrauch werden alle Lösungen auf 37 °C erwärmt und jeder Gegenstand mit 70 % Ethanol desinfiziert. Für das Arbeiten werden nur sterile Pipetten und Pipettenspitzen, sterile Puffer und Medien verwendet.

##### 4.2.2.1 Auftauen eukaryotischer Zellen

Die in Flüssigstickstoff eingefrorenen Zellen werden nach dem Auftauen bei 37 °C im Wasserbad in eine 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit vorgewärmten Zellkulturmedium (DMEM, 10 % FBS und 1 % Antibiotika (Penicillin/Streptomycin; 10,000 U/ml)) überführt und inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Nach ca. 5 h erfolgt ein Medium-Wechsel, um abgestorbene Zellen und das toxische DMSO zu entfernen.

##### 4.2.2.2 Einfrieren eukaryotischer Zellen

Zum Einfrieren werden Zellen einer möglichst frühen Passage verwendet. Sind diese zu 80 % konfluent, werden sie mit PBS gewaschen, mit 1 x Trypsin-EDTA trypsinisiert und in Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wird in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 550 x g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 1/5 Volumen eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen in Kryo-Röhrchen aliquotiert und zunächst ü.N. in einem Isopropanoltank bei -80 °C gelagert, bevor sie in einen Stickstofftank überführt werden. So können sie bis zu mehreren Jahren aufbewahrt werden.

#### 4.2.2.3 Kultivierung adhärenter eukaryotischer Zellen

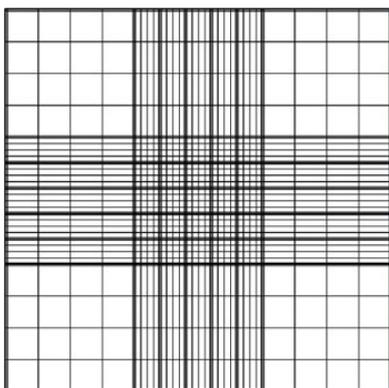
Nach dem Auftauen werden die Zellen für den weiteren Gebrauch fortwährend in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Medium wird Zellkulturmedium verwendet. Erreichen die Zellen eine Konfluenz von 80–90 %, werden sie passagiert oder für Versuche entsprechend ausgesät.

#### 4.2.2.4 Passagieren und Aussäen adhärenter eukaryotischer Zellen

Um ein konstantes Wachstum der Zellen zu gewährleisten und somit ein Absterben zu verhindern, werden die Zellen bei einer Konfluenz von 80–90 % auf neue Zellkulturflaschen, Platten oder Schalen passagiert. Dazu wird das alte Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 x Trypsin-EDTA (für 75 cm<sup>2</sup> 3 ml, für 175 cm<sup>2</sup> 7 ml) solange im Brutschrank inkubiert, bis sie sich vollständig von dem Flaschenboden gelöst haben. Anschließend werden sie in frischem Zellkulturmedium (für 75 cm<sup>2</sup> 7 ml, für 175 cm<sup>2</sup> 13 ml) aufgenommen und in gewünschter Verdünnung auf neue Zellkulturgefäße mit vorgelegtem Zellkulturmedium aufgeteilt. Für experimentelle Zwecke werden die Zellen zunächst in einer Neubauer-Zählkammer gezählt, wodurch das Aussäen einer bestimmten Zellanzahl ermöglicht wird.

#### 4.2.2.5 Zählen eukaryotischer Zellen

Um die genaue Anzahl eukaryotischer Zellen in einer Zellsuspension zu ermitteln, werden diese in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zählkammer hat eine Tiefe von 0,1 mm und ist in Quadrate verschiedener Größe unterteilt. Für die durchgeführten Experimente werden die vier äußeren Quadrate (mit je einem Volumen von 0,1 µl) gezählt und aus den Werten ein Mittelwert gebildet. Dieser wird mit 10<sup>4</sup> multipliziert um die Zellzahl pro ml zu erhalten.



**Abbildung 4.1: Neubauer-Zählkammer**

Die Zählkammer hat eine Tiefe von 0,1 mm und ist in Quadrate verschiedener Größe unterteilt. Die vier äußeren Quadrate (mit je einem Volumen von 0,1 µl) werden gezählt. Der Mittelwert wird mit 10<sup>4</sup> multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

(©LO Labor Optik)

## 4.2.2.6 Transfektion eukaryotischer Zellen

### 4.2.2.6.1 Lipofectamine 2000

Lipofectamine 2000 (Invitrogen) enthält Lipidpartikel, welche mit der zu transfizierenden RNA Komplexe bilden und so von den Zellen über Endozytose aufgenommen werden können. Diese Transfektionsmethode eignet sich besonders gut für das Transfizieren von Zellen mit kleinen RNA-Molekülen und wird in dieser Arbeit bei der co-IP (Kapitel 4.2.4.1) eingesetzt.

Es werden zunächst zwei separate Proben vorbereitet. Eine Probe enthält das zu transfizierende RNA/miR-Gemisch und die andere 1:3 Lipofectamine 2000 ( $\mu\text{g RNA} : \mu\text{l Lipofectamine 2000}$ ), wobei beides in 500  $\mu\text{l}$  DMEM ohne Zusätze gelöst wird. Nach einer 5 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) werden die beiden Proben gemischt und für weitere 20 min inkubiert. In dieser Zeit werden die am Vortag in 9 cm Zellkulturschalen ausgesäten Zellen mit PBS gewaschen und 4 ml frisches DMEM dazugegeben. Abschließend wird der 1 ml Transfektionsansatz zu den Zellen hinzugefügt und diese bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 6 h in den Brutschrank gestellt.

### 4.2.2.6.2 Elektroporation

Die Elektroporation wird für die Transfektion von Zellen des Luciferase-Experiments benutzt.

Hierzu werden Zellen mit 4 ml 1 x Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen. In einem Reaktionsgefäß werden 10  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau gemischt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt (Kapitel 4.2.2.5). Die auf eine Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/Schale eingestellte Suspension wird für 5 min bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit der gleichen Menge PBS gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wird das Pellet in einer bestimmten Menge Zytomix (je nach Anzahl der Proben) gelöst. Je 400  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension werden mit der Nukleinsäure gemischt und in eine Elektroporationsküvette (4 mm Durchmesser) überführt. Die Elektroporation erfolgt in einer 4 mm Küvette mit einem Stromstoß von 240 V für 20 ms. Der Elektroporationsansatz wird in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 12 ml DMEM pipettiert und vollständig gelöst. Von diesem Ansatz werden 2 ml in eine Vertiefung einer 6-well Platte gegeben und die Platten im Brutschrank 6 h inkubiert.

## 4.2.3 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.3.1 Plasmidisolierung aus *E. coli* Zellen (Mini-bzw. Maxipräparationen)

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen werden zunächst Übernachtskulturen, 5 ml im kleinen Maßstab (Kapitel 4.2.1.3) oder 250 ml im großen Maßstab (Kapitel 4.2.1.4), mit Ampicillin

versetztem LB-Medium angesetzt. Anschließend werden diese mit den Kits „GeneJet Plasmid Miniprep/Maxiprep Kit“ nach dem Prinzip der alkalischen Lyse und nach Angaben des Herstellers extrahiert.

#### 4.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

##### 4.2.3.2.1 Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode, um spezifische Bereiche eines DNA-Abschnitts *in vitro* zu amplifizieren. Für die PCRs werden die Thermocycler „TProfessional“ und „T1Thermocycler“ von Biometra verwendet.

Tabelle 4.1: Standard-PCR Programm

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	
Initiale Denaturierung	94	5:00	
Denaturierung	94	1:00	
Hybridisierung der Primer	nach Primer T <sub>m</sub>	0:30	30 Zyklen
Elongation	68	1:00 pro kb	
Finale Elongation	68	5:00	

In einem Standard-Reaktionsansatz werden folgende Komponenten gemischt:

Tabelle 4.2: Standard-PCR Reaktionsansatz

Bestandteile	Endkonzentration
OneTaq Polymerase	0,625 U
OneTaq Polymerase Puffer	1 x
dNTPs	0,25 mM
<i>forward</i> Primer	0,25 pmol/μl
<i>reverse</i> Primer	0,25 pmol/μl
DNA Template	25 ng/μl
ddH <sub>2</sub> O	x
Volumen	100 μl

#### 4.2.3.2.2 *In vitro*-Mutagenese-PCR

Die *in vitro*-Mutagenese wird verwendet, um über spezifische Primer Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen in die Plasmid-DNA einzufügen. Diese Methode basiert auf dem „QuickChange mutagenesis protocol“ von Stratagene.

Die Mutagenese beruht auf der Durchführung einer PCR mit zwei komplementären Primern, welche beide die gewünschte Mutation enthalten. Dabei sollten die Primer eine Länge von 25–45 Nukleotiden haben und eine Schmelztemperatur von über 78 °C. Die einzubringende Mutation sollte in der Mitte der Primer liegen und von jeweils mindestens 10 korrekt paarenden Nukleotiden flankiert sein.

In der ersten Amplifikationsrunde paaren die Primer an die Plasmid-DNA unter Ausbildung einer Schleife an der Stelle, an der sich die Mutation befindet. Dadurch kommt es zur Synthese des mutierten DNA-Strangs. In den nächsten PCR Runden wird der neue Strang exponentiell amplifiziert. Anschließend wird der Ansatz mit der Endonuklease DpnI für 2 h bei 37 °C verdaut.

DpnI erkennt spezifisch methylierte DNA, weshalb es verwendet wird, um den parenteralen, aus *E. coli* isolierten und somit durch die Dam-Methylase methylierten DNA-Strang abzubauen, wohingegen die neu synthetisierten DNA-Stränge nicht methyliert vorliegen und somit nicht abgebaut werden.

Ein Teil sowohl des verdauten als auch unverdauten PCR-Produkts wird auf ein Agarosegel aufgetragen, um anhand des spezifischen Bandenmusters eine erfolgreiche PCR nachzuweisen. Die mutierte DNA wird in DH5 $\alpha$  transformiert (Kapitel 4.2.1.5).

**Tabelle 4.3: Mutagenese-PCR Programm**

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	
Initiale Denaturierung	99	3:00	
Pause für Polymerasezugabe	90	2:00	
Denaturierung 1	92	0:30	
Hybridisierung Primer 1	nach Primer $T_m$	0:45	10 Zyklen
Elongation 1	68	2:00 pro kb	
Denaturierung 2	92	0:30	
Hybridisierung Primer 2	nach Primer $T_m$	0:45	20 Zyklen
Elongation 2	72	1:00 pro kb	
Finale Elongation	72	10:00	

### 4.2.3.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wird angewendet, um sowohl DNA- als auch RNA-Moleküle, welche aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats eine negative Ladung aufweisen, in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufzutrennen. Dabei wandern größere Fragmente langsamer durch die Gelmatrix als kleinere. Durch das Mitführen eines Standards kann sowohl die Größe der Fragmente als auch die Konzentration abgeschätzt werden.

#### 4.2.3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente werden 1–3 % Agarosegele in den dafür vorgesehenen Gelapparaturen gegossen. Die Agarose wird dazu in 1 x TAE Puffer gelöst, welcher anschließend auch als Laufpuffer verwendet wird. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel werden diese 6:1 mit DNA Loading Dye versetzt, um die Dichte zu erhöhen und damit ein Absinken in die Geltasche zu ermöglichen. Außerdem kann durch die im Loading Dye enthaltenen Farbstoffe, Bromphenoblau (300 bp) und Xylencyanol (4 kb), die Lauffront beobachtet werden und somit je nach Größe der Fragment der Vorgang gestoppt werden. Die angelegte Spannung beträgt 100–140 V bei einer Dauer von 45–90 min. Durch die Inkubation des Gels in Ethidiumbromid (1:10000), welches in Nukleinsäuren interkaliert und dann stark fluoresziert, können die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

#### 4.2.3.3.2 Reinigung von DNA bzw. RNA über präparative Agarosegele

Die Reinigung von DNA bzw. RNA aus einem präparativem Agarosegel wird verwendet, um DNA- bzw. RNA-Fragmente definierter Größe und Vektoren nach einem Restriktionsverdau (Kapitel 4.2.3.10) oder PCR-Fragmente (Kapitel 4.2.3.2) zu isolieren und zu reinigen. Die Elektrophorese erfolgt wie unter Kapitel 4.2.3.3 beschrieben, allerdings wird nach der Ethidiumbromid-Färbung das Gel auf eine Glasplatte gelegt und unter UV-Licht die entsprechende Bande mit einem Skalpell zügig ausgeschnitten. Die DNA- bzw. RNA-Reinigung erfolgt mit dem Kit „GeneJet Gel Extraction Kit“ (Thermo Scientific).

#### 4.2.3.3.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um eine Aussage über die Qualität von radioaktiv-markierter RNA nach *in vitro*-Transkription treffen zu können, wird eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt, welche ebenso

dazu dient, den Einbau radioaktiv-markierter Nukleotide abzuschätzen und die Proben nach erfolgter co-IP (Kapitel 4.2.4.1) aufzutrennen.

**Tabelle 4.4: Zusammensetzung eines denaturierenden Polyacrylamidgels**

<b>Bestandteile</b>	<b>Endkonzentration</b>
TBE	1 x
Polyacrylamid	6 %
Harnstoff	7 M
Ammoniumpersulfat (APS)	0,1 % (w/v)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	0,1 % (v/v)

Die RNA wird mit denaturierendem RNA Probenpuffer (FA-Puffer) 1:3 gemischt und auf ein 6 % Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in 1 x TBE-Puffer bei 100–120 V. Bei der *in vitro*-Transkription wird die Spannung gestoppt sobald die Bromphenolblau Bande die Mitte des Gels erreicht hat. Dies gewährleistet, dass sich die freien radioaktiv-markierten Nukleotide noch im Gel befinden und zur Abschätzung des Einbaus herangezogen werden können. Das Gel mit den co-IP-Proben und der Input-Kontrolle läuft bis die Xylencyanol Band den unteren Rand der Gelapparatur erreicht hat. Anschließend wird das Gel mit Frischhaltefolie bedeckt und die RNA mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Um die Proben für eine längere Expositionsdauer zu fixieren, wie es bei den co-IP-Proben nötig ist, werden die Gele auf Filterpapier überführt, für 15 min mit einer Fixierlösung (7,5 % Essigsäure und 5 % Ethanol) inkubiert, das Gel 2 x 10 min mit Wasser gespült und für 2 h bei 80 °C auf einem Gelrockner getrocknet. Die Auswertung erfolgt mit einem Phosphoimager.

#### **4.2.3.4 Konzentrationsbestimmung mittels Qubit®**

Die Konzentrationsbestimmung der DNA/RNA erfolgt mittels eines Qubit® Fluorometers. Der verwendete, nach den Herstellerangaben für DNA und RNA spezifische Fluoreszenzfarbstoff emittiert nur dann Licht, wenn er an sein Zielmolekül gebunden vorliegt, womit die Konzentration proportional zum gemessenen Licht ist.

Die Messungen erfolgten nach Herstellerangaben.

#### 4.2.3.5 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Mutation wird die Plasmid-DNA nach Reinigung sequenziert. Dazu werden 100 ng Plasmid-DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit ddH<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt.

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip von Sanger [177] und wird bei der Firma SeqLab durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgt mit Hilfe des BioEdit-Programms. Die Übereinstimmung der einzelnen Basen mit der Sequenz erfolgt über ein *Alignment* an die, in CloneManager erstellten Plasmidsequenzen.

#### 4.2.3.6 Proteinase K-Verdau

Der Proteinase K-Verdau dient zur Entfernung von DNA-bindenden-Proteinen und RNasen aus einer Nukleinsäurelösung. Daher wird die Template-DNA für die *in vitro-Transkription* vor Gebrauch mit 250 µl Proteinase K-Puffer und 8 U Proteinase K für 15 min bei 65 °C inkubiert.

Anschließend wird eine Phenol/Chloroform-Extraktion (Kapitel 4.2.3.7) und Ethanol-Präzipitation (Kapitel 4.2.3.8) durchgeführt.

#### 4.2.3.7 Phenol-Chloroform-Extraktion

Diese Methode dient dazu, unerwünschte Proteinbestandteile aus einer Nukleinsäurelösung zu entfernen. Durch die Zugabe von 1 Vol. Phenol und anschließendem Vortexen werden Proteine denaturiert und befinden sich nach anschließender 2 min Zentrifugation in der unteren organischen Phase, während die DNA oder RNA in der oberen wässrigen Phase gelöst vorliegt. Diese Phase wird in ein Reaktionsgefäß überführt und mit einem Vol. 1:1 Phenol/Chloroform gemischt. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt für 2 min, und die obere Phase wird erneut mit 1 Vol. Chloroform gevortext und für 2 min zentrifugiert. Die in der oberen Phase enthaltene Nukleinsäure wird mit Hilfe von Ethanol gefällt (Kapitel 4.2.3.8).

#### 4.2.3.8 Ethanol-Präzipitation

Die Präzipitation dient zur Aufkonzentrierung und Reinigung von Nukleinsäurelösungen.

Die Proben werden mit dem 2,5 x Vol. 99 % Ethanol und 1/10 Vol. 3 M Natriumacetatlösung gemischt und bei -20 °C über Nacht präzipitiert. Nach der Inkubation werden die Proben bei 4 °C für 30 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Das DNA-Pellet wird zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und bei 39 °C im Heizblock getrocknet. Anschließend wird das Pellet in einem geeigneten Volumen ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 4.2.3.9 DNase I-Verdau

Zur Entfernung der DNA aus einem *in vitro*-Transkriptionsansatz werden 12 U DNase I und die entsprechende Menge DNase I Puffer (10 x) zum Ansatz hinzugegeben und für 60 min bei 37 °C inkubiert.

#### 4.2.3.10 Restriktionsverdau

Bei dem Restriktionsverdau werden Plasmide oder PCR-Produkte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen an spezifischen Stellen gespalten. Durch diese Spaltung entstehen passende Enden von DNA-Fragmenten und Vektoren, so dass diese in einem Ligationsansatz (Kapitel 4.2.3.11) zusammengefügt werden oder bei einer *in vitro*-Transkription (Kapitel 4.2.3.13) eingesetzt werden können.

Des Weiteren kann ein Restriktionsverdau herangezogen werden, um nach einer Ligation (Kapitel 4.2.3.11) den Erfolg dieser zu bestätigen.

#### 4.2.3.11 Ligation von DNA-Molekülen

Für die Ligation von gereinigten DNA-Molekülen (Insert) in einen Vektor wird die Bakteriophagen T4-DNA-Ligase verwendet. Ein 20 µl Ligationsansatz enthält 25 ng des Vektors. Die Menge an benötigtem Insert wird wie folgt berechnet:

$$\text{Menge an Insert (ng)} = \frac{4 \times (\text{Menge an Vektor (ng)} \times \text{Länge des Inserts (bp)})}{\text{Länge des Vektors (bp)}}$$

Des Weiteren enthält der Ligationsansatz 400 U der T4-DNA-Ligase und 1 x Ligase-Reaktionspuffer.

Die Ligation erfolgt bei 16 °C über Nacht. Am darauf folgenden Tag wird die T4-DNA-Ligase bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert, bevor der Ligationsansatz in Bakterienzellen transformiert (Kapitel 4.2.1.5) wird.

#### 4.2.3.12 Dephosphorylierung von Plasmiden

Zur Verhinderung einer Rückligation des linearisierten Plasmids wird das Fragment mit 50 U *Shrimp* Alkaline Phosphatase (SAP) behandelt, was zu einer Dephosphorylierung der 5'-Enden führt. Die Inkubation beträgt 30 min bei 37 °C, und die anschließende Inaktivierung der SAP wird für 15 min bei 65 °C vorgenommen.

#### 4.2.3.13 *In vitro*-Transkription

Die Synthese von RNA erfolgt von PCR-Produkten (Kapitel 4.2.3.2) oder von Vektoren, welche durch einen Restriktionsverdau (Kapitel 4.2.3.10) linearisiert wurden. Diese DNA-Templates enthalten den für die Transkription erforderlichen T7-Promotor.

**Tabelle 4.5: Standard-Transkriptionsansatz**

<b>Bestandteile</b>	<b>Endkonzentration</b>
Transkriptionspuffer	1 x
DTT	10 mM
rNTPs	0,5 mM
DNA-Template	variabel
T7-RNA-Polymerase	0,1 U/ $\mu$ l

Der Ansatz wird für 90 min bei 37 °C im Wasserbad (T7-Promotor) inkubiert. Die Qualität der entstandenen RNA wird auf einem Agarosegel kontrolliert (Kapitel 4.2.3.3.1) und die Menge mit dem „Qubit-Fluorometer“ (Kapitel 4.2.3.4) gemessen.

#### 4.2.3.14 *In vitro*-Transkription radioaktiv-markierter RNA

Die für die Detektion von RNA-Protein-Komplexen verwendete RNA wird während der Transkription mit radioaktiv-markiertem [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-rUTP Nukleotide markiert. In dieser Arbeit wurde für die Synthese radioaktiv-markierter RNA ausschließlich PCR-Produkt mit einem T7-Promotor als DNA-Template verwendet.

**Tabelle 4.6: Transkriptionsansatz radioaktiv-markierter RNA**

<b>Bestandteile</b>	<b>Endkonzentration</b>
Transkriptionspuffer	1 x
DTT	10 mM
rNTPs (A, C, G)	0,5 mM jeweils
rUTP	variabel
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-rUTP	0,5 mM
DNA-Template	variabel
T7-RNA-Polymerase	0,1 U/ $\mu$ l

#### 4.2.3.15 RNA-Reinigung

Da einige Bestandteile der Transkription wie Enzyme, Reste von DNA und freie Nukleotide die Folgereaktionen stören können, wird die RNA vor dem weiteren Gebrauch mit dem Kit „GeneJet RNA Cleanup and Concentration Micro Kit“ nach Angaben des Herstellers gereinigt.

#### 4.2.3.16 Synthese von RNA mit 5'-Cap-Nukleotide

Die Synthese des 5'-Cap und des 3'-Poly(A)-Schwanzes an eine RNA ist notwendig, um Reporter-RNAs herzustellen, welche eukaryotischen mRNAs entsprechen. Dazu wird zunächst das Ausgangsplasmid pGEM-4Z FLuc Poly-A, welches einen 3'-Poly(A)-Schwanz besitzt, mit SpeI für 2 h bei 37 °C verdaut, um ein definiertes 3'-Ende zu erhalten. Anschließend erfolgt eine *Capping*-Transkription, bei der eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe an das 5'-Ende der RNA angehängt wird. Dabei wird in einer Standard *in vitro*-Transkriptionsreaktion (Kapitel 4.2.3.13) die Konzentration des rGTP auf 2,5 mM herabgesetzt und ein *Capping*-Nukleotide ( $m^7G5'ppp5'G$ ) mit einer Endkonzentration von 500  $\mu$ M hinzugefügt. Dabei wird das nicht methylierte G von der RNA-Polymerase als erstes Nukleotide in die RNA eingebaut, so dass die resultierende RNA an ihrem 5'-Ende ein  $m^7Gppp$ -Cap trägt. Nach erfolgter Transkription wird ein DNase I Verdau (Kapitel 4.2.3.9) durchgeführt und anschließend die Proben mit dem „GeneJet RNA Cleanup and Concentration Micro Kit“ gereinigt.

#### 4.2.3.17 Präparation von duplex-microRNAs

Für die Transfektion von eukaryotischen Zellen (Kapitel 4.2.2.6) werden doppelsträngige microRNAs benötigt. Um diese Duplexe herzustellen, werden äquimolare Mengen einzelsträngiger, reifer microRNA (miR mat) mit dem einzelsträngigen, komplementären Gegenstrang (miR\*) gemischt und in einem Thermocycler hybridisiert. Die Hybridisierung beginnt bei 90 °C, dann wird die Temperatur um 1 °C pro min gesenkt bis zu einer Temperatur von 4 °C. Danach werden die Proben bei -20 °C gelagert.

### 4.2.4 Proteinbiochemische Methode

#### 4.2.4.1 Argonaute-Protein spezifische RNA co-Immunopräzipitation (co-IP)

Die Methode wird angewendet, um die Interaktion von Proteinen der Argonaute (Ago2)-Familie mit Teilen der HCV-RNA in An- und Abwesenheit von miR-122 zu untersuchen. Dazu werden radioaktiv-markierte HCV-RNA Fragmente in Zellen transfomiert und Magnetpartikel mit Ago2-Antikörpern versehen. Kommt es zu einer Interaktion zwischen der HCV-RNA und den

Ago2-Proteinen, kann mit Hilfe eines Magneten der Ago2/RNA-Komplex aus dem Zelllysate isoliert werden und die Bindung nach einer PAA-Gelelektrophorese (Kapitel 4.2.3.3) mit dem Phosphoimager detektiert werden.

Als erstes werden pro Ansatz 100  $\mu$ l der Magnetpartikel mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen und anschließend in 1000  $\mu$ l PBS resuspendiert. Nach dem Waschen werden spezifische Antikörper zu den Magnetpartikeln gegeben und diese bei 4 °C über Nacht auf einem Drehrad inkubiert, wobei der Flag-Antikörper als Negativkontrolle verwendet wird, da das Flag-Epitop natürlicherweise nicht in der Zelle vorkommt.

**Tabelle 4.7: co-IP-Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Menge (<math>\mu</math>l) pro 100 <math>\mu</math>l Magnetpartikel</b>	<b>Konzentration</b>
rat-anti-Ago2 clone 11A9	5 $\mu$ l	1,5 mg/ml
mouse-anti-FLAG	2 $\mu$ l	3,8 mg/ml

Als nächstes werden 80–90 % konfluente Zellen in 9 cm Schalen jeweils mit 3  $\mu$ g radioaktiv-markierter RNA und 3  $\mu$ g miR-122 oder miR-122 Mutanten transfiziert. 10  $\mu$ l des HCV-RNA Transkripts wird aliquotiert und dient später als interner Größenmarker. 6 h nach der Transfektion werden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und für 30 min bei 4 °C mit 1 ml co-IP-Lysispuffer lysiert. Anschließend wird das Lysat in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 30 min bei 4 °C und 17000 x g zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. In der Zwischenzeit werden die Magnetpartikel einmal mit 1 ml co-IP-Waschpuffer gewaschen und danach in 500  $\mu$ l PBS gelöst. 10 % des Lysats wird für die Input-Kontrolle entnommen, die restlichen 90 % auf die Magnetpartikel gegeben und weitere 3 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Nach der Zeit werden die Magnetpartikel auf ein magnetisches Rack gestellt, der Überstand wird verworfen und die Magnetpartikel 4 x mit 1 ml co-IP-Waschpuffer gewaschen, bevor sie in 1 ml PBS resuspendiert werden. Um die Effizienz der Ago2-Bindung in einem Western Blot nachzuweisen, werden 10 % der Lösung entnommen, ehe das PBS wieder entfernt wird. 250  $\mu$ l Proteinase K Puffer und 10  $\mu$ l Proteinase K wird zu den Magnetpartikeln und der Input-Kontrolle gegeben und für 15 min bei 65 °C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Die 10  $\mu$ l Transkript werden mit 250  $\mu$ l PBS aufgefüllt. Nach der Inkubation werden den Magnetpartikeln, Input-Proben und dem Transkript 300  $\mu$ l Phenol zugegeben, gevortext und anschließend für 10 min bei 4 °C und 17000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 300  $\mu$ l Chloroform gemischt, bevor die Proben erneut für 10 min bei 4 °C und 17000 x g zentrifugiert werden. Die obere Phase wird entnommen und die RNA mit Ethanol über Nacht präzipitiert (Kapitel 4.2.3.8).

Am nächsten Tag werden die co-IP-Proben in 30 µl und die Input-Proben bzw. Transkript in 100 µl RNA-Probenpuffer gelöst. Von den jeweiligen Proben werden jeweils 30 µl auf einem denaturierenden Polyacrylamid Gel (Kapitel 4.2.3.3.3) analysiert. Es ist darauf zu achten, dass die co-IP-Proben separat zu den Input-Proben aufzutragen und das Transkript vor Gebrauch 1:500 verdünnt wird.

#### 4.2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wird verwendet, um Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Dazu werden Gele gegossen welche aus einem 5 % Sammelgel und einem 10 % Trenngel bestehen. Die einzelnen Komponenten werden wie folgt zusammen pipettiert:

**Tabelle 4.8: SDS-Polyacrylamidgel**

Bestandteile	Trenngel	Sammelgel
	10 %	5 %
H <sub>2</sub> O	1,9 ml	2,8 ml
30 % Bisacryl (19:1)	1,7 ml	660 µl
1,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	500 µl
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,3 ml	-
SDS 10 %	50 µl	40 µl
APS 10 %	100 µl	40 µl
TEMED	10 µl	4 µl

Nach Zugabe von TEMED und APS beginnt die Polymerisation. Zunächst wird das Trenngel zwischen die beiden Glasplatten gegossen und mit 60 % Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wird das Isopropanol entfernt, das Sammelgel bis zum Rand aufgetragen und der Kamm eingefügt. Nachdem das Gel auspolymerisiert ist, wird es in eine Elektrophoresekammer eingespannt, welche mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt ist. Die Proben werden vor dem Auftragen 1:1 mit 2 x Lämmli-Puffer versetzt und ebenso wie der Protein-Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder (NEB Bio Labs)) 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Elektrophorese wird mit einer Spannung von 100 V gestartet. Nachdem die Proteinbande geschärft an der Grenze zum Trenngel zu erkennen ist, wird die Spannung auf 120 V erhöht. Nach der Auftrennung der Proteine wird ein Western Blot (Kapitel 4.2.4.3) durchgeführt.

#### 4.2.4.3 Western Blot

Der Western Blot wird verwendet, um spezifische Proteine über Antikörper-Bindung nachzuweisen. Zunächst bindet der primäre Antikörper an das zu identifizierende Protein. Der sekundäre Antikörper ist kovalent mit einer Peroxidase gekoppelt und bindet anschließend spezifisch an den Fc-Teil des primären Antikörpers. Die Peroxidase oxidiert dann das zur Detektion verwendete Substrat wodurch eine Chemilumineszenz-Reaktion ausgelöst wird, welche mit X-Ray Filmen sichtbar gemacht werden kann.

Zunächst werden die Proteine über ein SDS-Gel (Kapitel 4.2.4.2) aufgetrennt und anschließend mittels halbtrockenem (engl. *semi-dry*) Elektrotransfer auf eine Polyvinylidenfluoride (PVDF) Membran übertragen. Vor Gebrauch wird die ca. 9 x 6 cm große PVDF Membran 1 min in 100 % Methanol aktiviert. Der Aufbau für den Elektrotransfer setzt sich zusammen aus: drei Whatman Filterpapieren getränkt in Anoden-Puffer I, sowie drei Whatman Filterpapieren getränkt in Anoden-Puffer II, der Membran, dem SDS-Gel und abschließend drei Whatman Filterpapieren getränkt in Kathoden-Puffer. Der Transfer erfolgt bei 43 mA pro Membran für 90 min. Anschließend wird die Membran in TBST mit 10 % Trockenmilchpulver (Blockierungslösung) unter ständigem Schütteln bei 4 °C über Nacht geblockt.

Am nächsten Tag wird die Blockierungslösung verworfen und die Membran 1 h bei RT unter konstantem Schütteln mit dem primären Antikörper (1: 50 verdünnt) in der Blockierungslösung inkubiert. Danach wird die Membran 3 x 10 min mit TBST gewaschen und für eine weitere Stunde mit dem sekundären Antikörper 1:20000 verdünnt in der Blockierungslösung inkubiert. Zum Schluss wird die Membran 3 x 10 min mit TBST und weitere 2 x 10 min mit TBS gewaschen. Das „SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrat“ von Pierce wird nach Herstellerangaben auf die Membran gegeben und nach 5 min Inkubation kann die Chemilumineszenz mit einem X-Ray Film detektiert werden.

#### 4.2.4.4 Nachweis der Translationseffizienz (Luciferase-Assay)

Um den Einfluss der miR-122 auf die Translationseffizienz von RNA-Reporter-Konstrukten nachzuweisen, wird ein Luciferase-Assay durchgeführt, welcher auf dem Prinzip der Oxidation von D-Luziferin durch die *Firefly*-Luciferase bzw. von Coelenterazin durch die *Renilla*-Luciferase beruht.

Durch diese Oxidation kommt es zu einer Emission von Licht, welches bei einer Wellenlänge von 560 nm in einem Luminometer detektiert werden kann. Die Intensität des gemessenen Lichts ist direkt proportional zu der Anzahl gebildeter Luciferase-Moleküle und somit ein Maß für die Translationseffizienz der entsprechenden RNA-Reporter-Konstrukte.

---

Für die Durchführung werden 4 µg HCV-RNA-Reporter-Konstrukten, 1 µg Cap-FLuc-Konstrukte und 3 µg bestimmten miR-122-Varianten gemischt, anschließend durch Elektroporation in HeLa-Zellen transfiziert (Kapitel 4.2.2.6.2) und für 6 h in 6-well Platten inkubiert. Nach der Zeit werden die Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen und dann für 15 min mit 500 µl Lysepuffer lysiert. Das Lysat wird in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

Für die Luciferase-Messung wird das „Renilla-Jucie Luciferase Assay Firefly“ Kit der Fa. PJK verwendet sowie 90 µl des Zelllysates. Um die Messung anschließend normalisieren zu können wird jede Probe zusätzlich mit dem „Beetle-Jucie Luciferase Assay Firefly“ Kit gemessen.

## 5 Literaturverzeichnis

- [1] PHILIPPE, N. ; LEGENDRE, M. ; DOUTRE, G. ; COUTE, Y. ; POIROT, O. ; LESCOT, M. ; ARSLAN, D. ; SELTZER, V. ; BERTAUX, L. ; BRULEY, C. ; GARIN, J. ; CLAVERIE, J.-M. ; ABERGEL, C.: *Pandoraviruses : Amoeba Viruses with Genomes Up to 2.5 Mb Reaching That of Parasitic Eukaryotes* (2013). 341(6143)281–86
- [2] CHOO, Q. L. ; KUO, G. ; WEINER, A. J. ; OVERBY, L. R. ; BRADLEY, D. W. ; HOUGHTON, M.: *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome* (1989). *Science*. 244(4902)359–62
- [3] MUERHOFF, A. S. ; LEARY, T. P. ; SIMONS, J. N. ; PILOT-MATIAS, T. J. ; DAWSON, G. J. ; ERKER, J. C. ; CHALMERS, M. L. ; SCHLAUDER, G. G. ; DESAI, S. M. ; MUSHAHWAR, I. K.: *Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis* (1995). *J Virol*. 69(9)5621–30
- [4] STAPLETON, Jack T. ; FOUNG, Steven ; MUERHOFF, A. Scott ; BUKH, Jens ; SIMMONDS, Peter: *The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae* (2011). *J Gen Virol*. 92(Pt 2)233–46
- [5] FAUQUET, Claude M. ; MAYO, M. A. ; MANILOFF, J. ; DESSELBERGER, U. ; BALL, L. A.: *Virus Taxonomy : Classification and nomenclature of viruses*. 2nd ed. Burlington : Elsevier, 2005 (Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses v.8)
- [6] SMITH, Donald B. ; BUKH, Jens ; KUIKEN, Carla ; MUERHOFF, A. Scott ; RICE, Charles M. ; STAPLETON, Jack T. ; SIMMONDS, Peter: *Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource* (2014). *Hepatology*. 59(1)318–27
- [7] SIMMONDS, P.: *Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus - 15 years on* (2004). 85(11)3173–88
- [8] MIHM, Sabine: *Hepatitis C virus, diabetes and steatosis: clinical evidence in favor of a linkage and role of genotypes* (2010). *Dig Dis*. 28(1)280–84
- [9] ANTAKI, Nabil ; CRAXI, Antonio ; KAMAL, Sanaa ; MOUCARI, Rami ; VAN DER MERWE, Schalk ; HAFFAR, Samir ; GADANO, Adrian ; ZEIN, Nizar ; LAI, Ching Lung ; PAWLITSKY, Jean-Michel ; HEATHCOTE, E. Jenny ; DUSHEIKO, Geoffrey ; MARCELLIN, Patrick: *The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report* (2010). *Liver Int*. 30(3)342–55
- [10] **WHOWHO**
- [11] MÜLLER, R.: *The natural history of hepatitis C: clinical experiences* (1996). *J Hepatol*. 24(2 Suppl)52–54
- [12] SARRAZIN, C. ; BERG, T. ; BUGGISCH, P. ; DOLLINGER, M. M. ; HINRICHSSEN, H. ; HOFER, H. ; HÜPPE, D. ; MANNS, M. P. ; MAUSS, S. ; PETERSEN, J. ; SIMON, K-G ; VAN THIEL, I. ; WEDEMAYER, H. ; ZEUZEM, S.: *Aktuelle Empfehlung zur Therapie der chronischen Hepatitis C* (2015). *Z Gastroenterol*. 53(4)320–34
- [13] HE, L. F. ; ALLING, D. ; POPKIN, T. ; SHAPIRO, M. ; ALTER, H. J. ; PURCELL, R. H.: *Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration* (1987). *J Infect Dis*. 156(4)636–40

- [14] PENIN, François ; DUBUISSON, Jean ; REY, Felix A. ; MORADPOUR, Darius ; PAWLOTSKY, Jean-Michel: *Structural biology of hepatitis C virus (2004)*. Hepatology. 39(1)5–19
- [15] ANDRÉ, P. ; KOMURIAN-PRADEL, F. ; DEFORGES, S. ; PERRET, M. ; BERLAND, J. L. ; SODOYER, M. ; POL, S. ; BRÉCHOT, C. ; PARANHOS-BACCALÀ, G. ; LOTTEAU, V.: *Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles (2002)*. J Virol. 76(14)6919–28
- [16] NIELSEN, Søren U. ; BASSENDINE, Margaret F. ; BURT, Alastair D. ; MARTIN, Caroline ; PUMEECHOCKCHAI, Wanna ; TOMS, Geoffrey L.: *Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients (2006)*. J Virol. 80(5)2418–28
- [17] THOMSEN, R. ; BONK, S. ; PROPFE, C. ; HEERMANN, K. H. ; KÖCHEL, H. G. ; UY, A.: *Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein (1992)*. Med Microbiol Immunol. 181(5)293–300
- [18] DREUX, Marlène ; PIETSCHMANN, Thomas ; GRANIER, Christelle ; VOISSET, Cécile ; RICARD-BLUM, Sylvie ; MANGEOT, Philippe-Emmanuel ; KECK, Zhenyong ; FOUNG, Steven ; VU-DAC, Ngoc ; DUBUISSON, Jean ; BARTENSCHLAGER, Ralf ; LAVILLETTE, Dimitri ; COSSET, Francois-Loïc: *High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI (2006)*. J Biol Chem. 281(27)18285–95
- [19] BARTENSCHLAGER, Ralf ; FRESE, Michael ; PIETSCHMANN, Thomas: *Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence (2004)*. Adv Virus Res. 63)71–180
- [20] APPEL, Nicole ; SCHALLER, Torsten ; PENIN, Francois ; BARTENSCHLAGER, Ralf: *From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication (2006)*. J Biol Chem. 281(15)9833–36
- [21] MORADPOUR, Darius ; PENIN, François ; RICE, Charles M.: *Replication of hepatitis C virus (2007)*. Nat Rev Microbiol. 5(6)453–63
- [22] LIU, Ying ; WIMMER, Eckard ; PAUL, Aniko V.: *Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses (2009)*. Biochim Biophys Acta. 1789(9-10)495–517
- [23] YASUI, K. ; WAKITA, T. ; TSUKIYAMA-KOHARA, K. ; FUNAHASHI, S. I. ; ICHIKAWA, M. ; KAJITA, T. ; MORADPOUR, D. ; WANDS, J. R. ; KOHARA, M.: *The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein (1998)*. J Virol. 72(7)6048–55
- [24] BOULANT, Steve ; BECCHI, Michel ; PENIN, François ; LAVERGNE, Jean-Pierre: *Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b (2003)*. J Biol Chem. 278(46)45785–92
- [25] DELEERSNYDER, V. ; PILLEZ, A. ; WYCHOWSKI, C. ; BLIGHT, K. ; XU, J. ; HAHN, Y. S. ; RICE, C. M. ; DUBUISSON, J.: *Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes (1997)*. J Virol. 71(1)697–704
- [26] FLINT, M. ; MCKEATING, J. A.: *The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection (2000)*. Rev Med Virol. 10(2)101–17
- [27] ROSA, D. ; CAMPAGNOLI, S. ; MORETTO, C. ; GUENZI, E. ; COUSENS, L. ; CHIN, M. ; DONG, C. ; WEINER, A. J. ; LAU, J. Y. ; CHOO, Q. L. ; CHIEN, D. ; PILERI, P. ; HOUGHTON, M. ; ABRIGNANI, S.: *A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells (1996)*. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(5)1759–63

- [28] **CARRÈRE-KREMER, Séverine ; MONTPELLIER-PALA, Claire ; COCQUEREL, Laurence ; WYCHOWSKI, Czeslaw ; PENIN, François ; DUBUISSON, Jean:** *Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus (2002).* J Virol. 76(8)3720–30
- [29] **GRIFFIN, Stephen D. C. ; BEALES, Lucy P. ; CLARKE, Dean S. ; WORSFOLD, Oliver ; EVANS, Stephen D. ; JAEGER, Joachim ; HARRIS, Mark P. G. ; ROWLANDS, David J.:** *The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine (2003).* FEBS Lett. 535(1-3)34–38
- [30] **MADAN, Vanesa ; BARTENSCHLAGER, Ralf:** *Structural and Functional Properties of the Hepatitis C Virus p7 Viroporin (2015).* Viruses. 7(8)4461–81
- [31] **FRANCK, Nathalie ; LE SEYEC, Jacques ; GUGUEN-GUILLOUZO, Christiane ; ERDTMANN, Lars:** *Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome (2005).* J Virol. 79(5)2700–08
- [32] **BARTENSCHLAGER, R.:** *The NS3/4A proteinase of the hepatitis C virus: unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy (1999).* J Viral Hepat. 6(3)165–81
- [33] **GWACK, Y. ; KIM, D. W. ; HAN, J. H. ; CHOE, J.:** *DNA helicase activity of the hepatitis C virus nonstructural protein 3 (1997).* Eur J Biochem. 250(1)47–54
- [34] **EGGER, Denise ; WÖLK, Benno ; GOSERT, Rainer ; BIANCHI, Leonardo ; BLUM, Hubert E. ; MORADPOUR, Darius ; BIENZ, Kurt:** *Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex (2002).* J Virol. 76(12)5974–84
- [35] **GRETTON, Sarah N. ; TAYLOR, Annette I. ; McLAUCHLAN, John:** *Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci (2005).* J Gen Virol. 86(Pt 5)1415–21
- [36] **PENIN, François ; BRASS, Volker ; APPEL, Nicole ; RAMBOARINA, Stephanie ; MONTSERRET, Roland ; FICHEUX, Damien ; BLUM, Hubert E. ; BARTENSCHLAGER, Ralf ; MORADPOUR, Darius:** *Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A (2004).* J Biol Chem. 279(39)40835–43
- [37] **APPEL, Nicole ; ZAYAS, Margarita ; MILLER, Sven ; KRIJNSE-LOCKER, Jacomine ; SCHALLER, Torsten ; FRIEBE, Peter ; KALLIS, Stephanie ; ENGEL, Ulrike ; BARTENSCHLAGER, Ralf:** *Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly (2008).* PLoS Pathog. 4(3)e1000035
- [38] **BEHRENS, S. E. ; TOMEI, L. ; FRANCESCO, R. de:** *Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus (1996).* EMBO J. 15(1)12–22
- [39] **TSUKIYAMA-KOHARA, K. ; IIZUKA, N. ; KOHARA, M. ; NOMOTO, A.:** *Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA (1992).* J Virol. 66(3)1476–83
- [40] **FRIEBE, P. ; LOHMANN, V. ; KRIEGER, N. ; BARTENSCHLAGER, R.:** *Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication (2001).* J Virol. 75(24)12047–57
- [41] **BROWN, E. A. ; ZHANG, H. ; PING, L. H. ; LEMON, S. M.:** *Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs (1992).* Nucleic Acids Res. 20(19)5041-45

- [42] **WANG, C. ; SARNOW, P. ; SIDDIQUI, A.:** *Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism (1993).* J Virol. 67(6)3338–44
- [43] **HONDA, M. ; BEARD, M. R. ; PING, L. H. ; LEMON, S. M.:** *A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation (1999).* J Virol. 73(2)1165–74
- [44] **PESTOVA, T. V. ; SHATSKY, I. N. ; FLETCHER, S. P. ; JACKSON, R. J. ; HELLEN, C. U.:** *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 (1998).* Genes Dev. 12(1)67–83
- [45] **KOLUPAEVA, V. G. ; PESTOVA, T. V. ; HELLEN, C. U.:** *An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus (2000).* J Virol. 74(14)6242–50
- [46] **SPAHN, C. M. ; KIEFT, J. S. ; GRASSUCCI, R. A. ; PENCZEK, P. A. ; ZHOU, K. ; DOUDNA, J. A. ; FRANK, J.:** *Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit (2001).* Science. 291(5510)1959–62
- [47] **FRASER, Christopher S. ; DOUDNA, Jennifer A.:** *Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation (2007).* Nat Rev Microbiol. 5(1)29–38
- [48] **FRICKE, Markus ; DÜNNES, Nadia ; ZAYAS, Margarita ; BARTENSCHLAGER, Ralf ; NIEPMANN, Michael ; MARZ, Manja:** *Conserved RNA secondary structures and long-range interactions in hepatitis C viruses (2015).* RNA. 21(7)1219–32
- [49] **FRIEBE, Peter ; BARTENSCHLAGER, Ralf:** *Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication (2002).* J Virol. 76(11)5326–38
- [50] **SONG, Yutong ; FRIEBE, Peter ; TZIMA, Eleni ; JÜNEMANN, Christiane ; BARTENSCHLAGER, Ralf ; NIEPMANN, Michael:** *The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site (2006).* J Virol. 80(23)11579–88
- [51] **BRADRIK, Shelton S. ; WALTERS, Robert W. ; GROMEIER, Matthias:** *The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase (2006).* Nucleic Acids Res. 34(4)1293–303
- [52] **BUNG, C. ; BOCHKAEVA, Z. ; TERENCE, I. ; ZINOVKIN, R. ; SHATSKY, I. N. ; NIEPMANN, M.:** *Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation (2010).* FEBS Lett. 584(4)837–42
- [53] **LOHMANN, Volker:** *Hepatitis C virus RNA replication (2013).* Curr Top Microbiol Immunol. 369)167–98
- [54] **PLOSS, Alexander ; RICE, Charles M.:** *Towards a small animal model for hepatitis C (2009).* EMBO Rep. 10(11)1220–27
- [55] **ZEISEL, Mirjam B. ; FELMLEE, Daniel J. ; BAUMERT, Thomas F.:** *Hepatitis C virus entry (2013).* Curr Top Microbiol Immunol. 369)87–112
- [56] **EVANS, Matthew J. ; HAHN, Thomas von ; TSCHERNE, Donna M. ; SYDER, Andrew J. ; PANIS, Maryline ; WÖLK, Benno ; HATZIOANNOU, Theodora ; MCKEATING, Jane A. ; BIENIASZ, Paul D. ; RICE, Charles M.:** *Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry (2007).* Nature. 446(7137)801–05

- [57] LIU, Shufeng ; YANG, Wei ; LE SHEN ; TURNER, Jerrold R. ; COYNE, Carolyn B. ; WANG, Tianyi: *Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection (2009)*. J Virol. 83(4)2011–14
- [58] BURLONE, Michela E. ; BUDKOWSKA, Agata: *Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors (2009)*. J Gen Virol. 90(Pt 5)1055–70
- [59] BLANCHARD, E. ; BELOUZARD, S. ; GOUESLAIN, L. ; WAKITA, T. ; DUBUISSON, J. ; WYCHOWSKI, C. ; ROUILLE, Y.: *Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis (2006)*. J Virol. 80(14)6964–72
- [60] HSU, Mayla ; ZHANG, Jie ; FLINT, Mike ; LOGVINOFF, Carine ; CHENG-MAYER, Cecilia ; RICE, Charles M. ; MCKEATING, Jane A.: *Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles (2003)*. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(12)7271–76
- [61] GARRY, Robert F. ; DASH, Srikanta: *Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins (2003)*. Virology. 307(2)255–65
- [62] BARTENSCHLAGER, Ralf ; COSSET, Francois-Loic ; LOHMANN, Volker: *Hepatitis C virus replication cycle (2010)*. J Hepatol. 53(3)583–85
- [63] GOSERT, Rainer ; EGGER, Denise ; LOHMANN, Volker ; BARTENSCHLAGER, Ralf ; BLUM, Hubert E. ; BIENZ, Kurt ; MORADPOUR, Darius: *Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons (2003)*. J Virol. 77(9)5487–92
- [64] BARTENSCHLAGER, R. ; LOHMANN, V.: *Replication of hepatitis C virus (2000)*. J Gen Virol. 81(Pt 7)1631–48
- [65] BARBA, G. ; HARPER, F. ; HARADA, T. ; KOHARA, M. ; GOULINET, S. ; MATSUURA, Y. ; EDER, G. ; SCHAFF, Z. ; CHAPMAN, M. J. ; MIYAMURA, T. ; BRÉCHOT, C.: *Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets (1997)*. Proc Natl Acad Sci U S A. 94(4)1200–05
- [66] MCLAUCHLAN, John ; LEMBERG, Marius K. ; HOPE, Graham ; MARTOGLIO, Bruno: *Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets (2002)*. EMBO J. 21(15)3980–88
- [67] ARIUMI, Yasuo ; KUROKI, Misao ; MAKI, Masatoshi ; IKEDA, Masanori ; DANKO, Hiromichi ; WAKITA, Takaji ; KATO, Nobuyuki: *The ESCRT system is required for hepatitis C virus production (2011)*. PLoS ONE. 6(1)e14517
- [68] CORLESS, Lynsey ; CRUMP, Colin M. ; GRIFFIN, Stephen D. C. ; HARRIS, Mark: *Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles (2010)*. J Gen Virol. 91(Pt 2)362–72
- [69] GASTAMINZA, Pablo ; CHENG, Guofeng ; WIELAND, Stefan ; ZHONG, Jin ; LIAO, Wei ; CHISARI, Francis V.: *Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion (2008)*. J Virol. 82(5)2120–29
- [70] MAJUMDAR, Romit ; BANDYOPADHYAY, Amitabha ; MAITRA, Umadas: *Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex (2003)*. J Biol Chem. 278(8)6580–87

- [71] MAITRA, U. ; STRINGER, E. A. ; CHAUDHURI, A.: *Initiation factors in protein biosynthesis (1982)*. Annu Rev Biochem. 51)869–900
- [72] DAS, S. ; GHOSH, R. ; MAITRA, U.: *Eukaryotic translation initiation factor 5 functions as a GTPase-activating protein (2001)*. J Biol Chem. 276(9)6720–26
- [73] GINGRAS, A. C. ; RAUGHT, B. ; SONENBERG, N.: *eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation (1999)*. Annu Rev Biochem. 68)913–63
- [74] JACKSON, Richard J. ; HELLEN, Christopher U. T. ; PESTOVA, Tatyana V.: *The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation (2010)*. Nat Rev Mol Cell Biol. 11(2)113–27
- [75] MARINTCHEV, Assen ; EDMONDS, Katherine A. ; MARINTCHEVA, Boriana ; HENDRICKSON, Elthea ; OBERER, Monika ; SUZUKI, Chikako ; HERDY, Barbara ; SONENBERG, Nahum ; WAGNER, Gerhard: *Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation (2009)*. Cell. 136(3)447–60
- [76] PESTOVA, Tatyana V. ; KOLUPAEVA, Victoria G.: *The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection (2002)*. Genes Dev. 16(22)2906–22
- [77] PAULIN, F. E. ; CAMPBELL, L. E. ; O'BRIEN, K. ; LOUGHLIN, J. ; PROUD, C. G.: *Eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) acts as a classical GTPase-activator protein (2001)*. Curr Biol. 11(1)55-59
- [78] UNBEHAUN, Anett ; BORUKHOV, Sergei I. ; HELLEN, Christopher U. T. ; PESTOVA, Tatyana V.: *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 (2004)*. Genes Dev. 18(24)3078–93
- [79] CRAIG, A. W. ; HAGHIGHAT, A. ; YU, A. T. ; SONENBERG, N.: *Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation (1998)*. Nature. 392(6675)520–23
- [80] ELISEEVA, I. A. ; LYABIN, D. N. ; OVCHINNIKOV, L. P.: *Poly(A)-binding proteins : Structure, domain organization, and activity regulation (2013)*. 78(13)1377–91
- [81] JANG, S. K. ; KRÄUSSLICH, H. G. ; NICKLIN, M. J. ; DUKE, G. M. ; PALMENBERG, A. C. ; WIMMER, E.: *A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation (1988)*. J Virol. 62(8)2636–43
- [82] PELLETIER, J. ; SONENBERG, N.: *Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA (1988)*. Nature. 334(6180)320–25
- [83] JANG, Sung Key: *Internal initiation: IRES elements of picornaviruses and hepatitis c virus (2006)*. Virus Res. 119(1)2–15
- [84] NIEPMANN, Michael: *Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus (2009)*. Biochim Biophys Acta. 1789(9-10)529–41
- [85] KIEFT, J. S. ; ZHOU, K. ; JUBIN, R. ; DOUDNA, J. A.: *Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA (2001)*. RNA. 7(2)194–206
- [86] BERRY, Katherine E. ; WAGHRAY, Shruti ; MORTIMER, Stefanie A. ; BAI, Yun ; DOUDNA, Jennifer A.: *Crystal structure of the HCV IRES central domain reveals strategy for start-codon positioning (2011)*. Structure. 19(10)1456–66

- [87] **SIZOVA, D. V. ; KOLUPAEVA, V. G. ; PESTOVA, T. V. ; SHATSKY, I. N. ; HELLEN, C. U.:** *Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs (1998).* J Virol. 72(6)4775–82
- [88] **PISAREV, Andrey V. ; SHIROKIKH, Nikolay E. ; HELLEN, Christopher U. T.:** *Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites (2005).* C R Biol. 328(7)589–605
- [89] **WEINLICH, Susan ; HÜTTELMAIER, Stefan ; SCHIERHORN, Angelika ; BEHRENS, Sven-Erik ; OSTARECK-LEDERER, Antje ; OSTARECK, Dirk H.:** *IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR (2009).* RNA. 15(8)1528–42
- [90] **KENAN, Daniel J. ; QUERY, Charles C. ; KEENE, Jack D.:** *RNA recognition : Towards identifying determinants of specificity (1991).* 16)214–20
- [91] **MAKEYEV, Aleksandr V. ; LIEBHABER, Stephen A.:** *The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms (2002).* RNA. 8(3)265–78
- [92] **MARTINO, Luigi ; PENNELL, Simon ; KELLY, Geoff ; BUI, Tam T. T. ; KOTIK-KOGAN, Olga ; SMERDON, Stephen J. ; DRAKE, Alex F. ; CURRY, Stephen ; CONTE, Maria R.:** *Analysis of the interaction with the hepatitis C virus mRNA reveals an alternative mode of RNA recognition by the human La protein (2012).* Nucleic Acids Res. 40(3)1381–94
- [93] **MARAIA, Richard J. ; LAMICHHANE, Tek N.:** *3' processing of eukaryotic precursor tRNAs (2011).* Wiley Interdiscip Rev RNA. 2(3)362–75
- [94] **PARK, Hong-Gyu ; YOON, Ji-Young ; CHOI, Miyoung:** *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D/AUF1 interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (2007).* J Biosci. 32(7)1263–72
- [95] **MOURELATOS, Z. ; ABEL, L. ; YONG, J. ; KATAOKA, N. ; DREYFUSS, G.:** *SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins (2001).* EMBO J. 20(19)5443–52
- [96] **PARK, Sung Mi ; PAEK, Ki Young ; HONG, Ka Young ; JANG, Christopher J. ; CHO, Sungchan ; PARK, Ji Hoon ; KIM, Jong Heon ; JAN, Eric ; JANG, Sung Key:** *Translation-competent 48S complex formation on HCV IRES requires the RNA-binding protein NSAP1 (2011).* Nucleic Acids Res. 39(17)7791–802
- [97] **NIEPMANN, Michael:** *Hepatitis C virus RNA translation (2013).* Curr Top Microbiol Immunol. 369)143–66
- [98] **JOPLING, Catherine L. ; Yi, Minkyung ; LANCASTER, Alissa M. ; LEMON, Stanley M. ; SARNOW, Peter:** *Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA (2005).* Science. 309(5740)1577–81
- [99] **HENKE, Jura Inga ; GOERGEN, Dagmar ; ZHENG, Junfeng ; SONG, Yutong ; SCHÜTTLER, Christian G. ; FEHR, Carmen ; JÜNEMANN, Christiane ; NIEPMANN, Michael:** *microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA (2008).* EMBO J. 27(24)3300–10
- [100] **WILSON, Joyce A. ; ZHANG, Chao ; HUYS, Adam ; RICHARDSON, Christopher D.:** *Human Ago2 is required for efficient microRNA 122 regulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation (2011).* J Virol. 85(5)2342–50
- [101] **FABIAN, Marc Robert ; SONENBERG, Nahum ; FILIPOWICZ, Witold:** *Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs (2010).* Annu Rev Biochem. 79)351–79

- [102] **BARTEL, David P.:** *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions* (2009). *Cell*. 136(2)215–33
- [103] **SCHIRLE, Nicole T. ; SHEU-GRUTTADAURIA, Jessica ; MACRAE, Ian J.:** *Structural basis for microRNA targeting* (2014). *Science*. 346(6209)608–13
- [104] **ØROM, Ulf Andersson ; LUND, Anders H.:** *Experimental identification of microRNA targets* (2010). *Gene*. 451(1-2)1–5
- [105] **HELWAK, Aleksandra ; KUDLA, Grzegorz ; DUDNAKOVA, Tatiana ; TOLLERVEY, David:** *Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding* (2013). *Cell*. 153(3)654–65
- [106] **EICHHORN, Stephen W. ; GUO, Huili ; MCGEARY, Sean E. ; RODRIGUEZ-MIAS, Ricard A. ; SHIN, Chanseok ; BAEK, Daehyun ; HSU, Shu-Hao ; GHOSHAL, Kalpana ; VILLÉN, Judit ; BARTEL, David P.:** *mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues* (2014). *Mol Cell*. 56(1)104–15
- [107] **PETRI, Sebastian ; DUECK, Anne ; LEHMANN, Gerhard ; PUTZ, Nicholas ; RÜDEL, Sabine ; KREMMER, Elisabeth ; MEISTER, Gunter:** *Increased siRNA duplex stability correlates with reduced off-target and elevated on-target effects* (2011). *RNA*. 17(4)737–49
- [108] **CAI, Xuezhong ; HAGEDORN, Curt H. ; CULLEN, Bryan R.:** *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs* (2004). *RNA*. 10(12)1957–66
- [109] **LEE, Yoontae ; JEON, Kipyong ; LEE, Jun-Tae ; KIM, Sunyoung ; KIM, V. Narry:** *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization* (2002). *EMBO J*. 21(17)4663–70
- [110] **WINTER, Julia ; JUNG, Stephanie ; KELLER, Sarina ; GREGORY, Richard I. ; DIEDERICH, Sven:** *Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation* (2009). *Nat Cell Biol*. 11(3)228–34
- [111] **FILIPOWICZ, Witold ; BHATTACHARYYA, Suwendra N. ; SONENBERG, Nahum:** *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* (2008). *Nat Rev Genet*. 9(2)102–14
- [112] **BUSHATI, Natascha ; COHEN, Stephen M.:** *microRNA functions* (2007). *Annu Rev Cell Dev Biol*. 23)175–205
- [113] **DU, Tingting ; ZAMORE, Phillip D.:** *microPrimer: the biogenesis and function of microRNA* (2005). *Development*. 132(21)4645–52
- [114] **DENLI, Ahmet M. ; TOPS, Bastiaan B. J. ; PLASTERK, Ronald H. A. ; KETTING, René F. ; HANNON, Gregory J.:** *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex* (2004). *Nature*. 432(7014)231–35
- [115] **GREGORY, Richard I. ; YAN, Kai-Ping ; AMUTHAN, Govindasamy ; CHENDRIMADA, Thimmaiah ; DORATOTAJ, Behzad ; COOCH, Neil ; SHIEKHATTAR, Ramin:** *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs* (2004). *Nature*. 432(7014)235–40
- [116] **BOHNSACK, Markus T. ; CZAPLINSKI, Kevin ; GORLICH, Dirk:** *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs* (2004). *RNA*. 10(2)185–91
- [117] **ZENG, Yan ; YI, Rui ; CULLEN, Bryan R.:** *Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha* (2005). *EMBO J*. 24(1)138–48

- [118] LUND, Elsebet ; GÜTTINGER, Stephan ; CALADO, Angelo ; DAHLBERG, James E. ; KUTAY, Ulrike: *Nuclear export of microRNA precursors (2004)*. Science. 303(5654)95–98
- [119] CHENDRIMADA, Thimmaiah P. ; GREGORY, Richard I. ; KUMARASWAMY, Easwari ; NORMAN, Jessica ; COOCH, Neil ; NISHIKURA, Kazuko ; SHIEKHATTAR, Ramin: *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing (2005)*. Nature. 436(7051)740–44
- [120] RAND, Tim A. ; PETERSEN, Sean ; DU, Fenghe ; WANG, Xiaodong: *Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation (2005)*. Cell. 123(4)621–29
- [121] SCHWARZ, Dianne S. ; HUTVÁGNER, György ; DU, Tingting ; XU, Zuoshang ; ARONIN, Neil ; ZAMORE, Phillip D.: *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex (2003)*. Cell. 115(2)199–208
- [122] SONG, Ji-Joon ; SMITH, Stephanie K. ; HANNON, Gregory J. ; JOSHUA-TOR, Leemor: *Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity (2004)*. Science. 305(5689)1434–37
- [123] LINGEL, Andreas ; SIMON, Bernd ; IZAURRALDE, Elisa ; SATTLER, Michael: *Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain (2004)*. Nat Struct Mol Biol. 11(6)576–77
- [124] PARKER, James S. ; ROE, S. Mark ; BARFORD, David: *Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex (2005)*. Nature. 434(7033)663–66
- [125] CZECH, Benjamin ; HANNON, Gregory J.: *Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes (2011)*. Nat Rev Genet. 12(1)19–31
- [126] LIU, Jidong ; VALENCIA-SANCHEZ, Marco Antonio ; HANNON, Gregory J. ; PARKER, Roy: *MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies (2005)*. Nat Cell Biol. 7(7)719–23
- [127] BRÜMMER, Anneke ; HAUSSER, Jean: *MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation (2014)*. Bioessays. 36(6)617–26
- [128] CHANG, Jinhong ; NICOLAS, Emmanuelle ; MARKS, Debora ; SANDER, Chris ; LERRO, Anthony ; BUENDIA, Marie Annick ; XU, Chunxiao ; MASON, William S. ; MOLOSHOK, Thomas ; BORT, Roque ; ZARET, Kenneth S. ; TAYLOR, John M.: *miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1 (2004)*. RNA Biol. 1(2)106–13
- [129] KRÜTZFELDT, Jan ; RAJEWSKY, Nikolaus ; BRAICH, Ravi ; RAJEEV, Kallanthottathil G. ; TUSCHL, Thomas ; MANOHARAN, Muthiah ; STOFFEL, Markus: *Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs' (2005)*. Nature. 438(7068)685–89
- [130] CASTOLDI, Mirco ; VUJIC SPASIC, Maja ; ALTAMURA, Sandro ; ELMÉN, Joacim ; LINDOW, Morten ; KISS, Judit ; STOLTE, Jens ; SPARLA, Richard ; D'ALESSANDRO, Lorenza A. ; KLINGMÜLLER, Ursula ; FLEMING, Robert E. ; LONGERICH, Thomas ; GRÖNE, Hermann J. ; BENES, Vladimir ; KAUPPINEN, Sakari ; HENTZE, Matthias W. ; MUCKENTHALER, Martina U.: *The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice (2011)*. J Clin Invest. 121(4)1386–96
- [131] BURCHARD, Julja ; ZHANG, Chunsheng ; LIU, Angela M. ; POON, Ronnie T. P. ; LEE, Nikki P. Y. ; WONG, Kwong-Fai ; SHAM, Pak C. ; LAM, Brian Y. ; FERGUSON, Mark D. ; TOKIWA, George ; SMITH, Ryan ; LEESON, Brendan ; BEARD, Rebecca ; LAMB, John R. ; LIM, Lee ; MAO, Mao ; DAI, Hongyue ; LUK, John M.: *microRNA-122 as a regulator of mitochondrial metabolic gene network in hepatocellular carcinoma (2010)*. 6

- [132] HSU, Shu-Hao ; WANG, Bo ; KOTA, Janaiah ; YU, Jianhua ; COSTINEAN, Stefan ; KUTAY, Huban ; YU, Lianbo ; BAI, Shoumei ; LA PERLE, Krista ; CHIVUKULA, Raghu R. ; MAO, Hsiaoyin ; WEI, Min ; CLARK, K. Reed ; MENDELL, Jerry R. ; CALIGIURI, Michael A. ; JACOB, Samson T. ; MENDELL, Joshua T. ; GHOSHAL, Kalpana: *Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver* (2012). *J Clin Invest.* 122(8)2871–83
- [133] TSAI, Wei-Chih ; HSU, Sheng-Da ; HSU, Chu-Sui ; LAI, Tsung-Ching ; CHEN, Shu-Jen ; SHEN, Roger ; HUANG, Yi ; CHEN, Hua-Chien ; LEE, Chien-Hsin ; TSAI, Ting-Fen ; HSU, Ming-Ta ; WU, Jaw-Ching ; HUANG, Hsien-Da ; SHIAO, Ming-Shi ; HSIAO, Michael ; TSOU, Ann-Ping: *MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis* (2012). *J Clin Invest.* 122(8)2884–97
- [134] JOPLING, Catherine: *Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function* (2012). *RNA Biol.* 9(2)137–42
- [135] CONRAD, K. Dominik ; GIERING, Florian ; ERFURTH, Corinna ; NEUMANN, Angelina ; FEHR, Carmen ; MEISTER, Gunter ; NIEPMANN, Michael: *MicroRNA-122 dependent binding of Ago2 protein to hepatitis C virus RNA is associated with enhanced RNA stability and translation stimulation* (2013). *PLoS ONE.* 8(2)e56272
- [136] SHIMAKAMI, Tetsuro ; YAMANE, Daisuke ; JANGRA, Rohit K. ; KEMPF, Brian J. ; SPANIEL, Carolyn ; BARTON, David J. ; LEMON, Stanley M.: *Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex* (2012). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(3)941–46
- [137] SHIMAKAMI, Tetsuro ; YAMANE, Daisuke ; WELSCH, Christoph ; HENSLEY, Lucinda ; JANGRA, Rohit K. ; LEMON, Stanley M.: *Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus* (2012). *J Virol.* 86(13)7372–83
- [138] LI, You ; MASAKI, Takahiro ; YAMANE, Daisuke ; MCGIVERN, David R. ; LEMON, Stanley M.: *Competing and noncompeting activities of miR-122 and the 5' exonuclease Xrn1 in regulation of hepatitis C virus replication* (2013). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(5)1881–86
- [139] SEDANO, Cecilia D. ; SARNOW, Peter: *Hepatitis C virus subverts liver-specific miR-122 to protect the viral genome from exoribonuclease Xrn2* (2014). *Cell Host Microbe.* 16(2)257–64
- [140] JANGRA, Rohit K. ; YI, Minkyung ; LEMON, Stanley M.: *Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122* (2010). *J Virol.* 84(13)6615–25
- [141] ROBERTS, Ashley P. E. ; LEWIS, Andrew P. ; JOPLING, Catherine L.: *miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components* (2011). *Nucleic Acids Res.* 39(17)7716–29
- [142] GOERGEN, Dagmar ; NIEPMANN, Michael: *Stimulation of Hepatitis C Virus RNA translation by microRNA-122 occurs under different conditions in vivo and in vitro* (2012). *Virus Res.* 167(2)343–52
- [143] FEHR, Carmen ; CONRAD, K. Dominik ; NIEPMANN, Michael: *Differential stimulation of hepatitis C virus RNA translation by microRNA-122 in different cell cycle phases* (2012). *Cell Cycle.* 11(2)277–85
- [144] MACHLIN, Erica S. ; SARNOW, Peter ; SAGAN, Selena M.: *Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex* (2011). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(8)3193–98

- [145] **NASHERI, Neda ; SINGARAVELU, Ragunath ; GOODMURPHY, Matthew ; LYN, Rodney K. ; PEZACKI, John Paul:** *Competing roles of microRNA-122 recognition elements in hepatitis C virus RNA* (2011). *Virology*. 410(2)336–44
- [146] **LUNA, Joseph M. ; SCHEEL, Troels K. H. ; DANINO, Tal ; SHAW, Katharina S. ; MELE, Aldo ; FAK, John J. ; NISHIUCHI, Eiko ; TAKACS, Constantin N. ; CATANESE, Maria Teresa ; JONG, Ype P. de ; JACOBSON, Ira M. ; RICE, Charles M. ; DARNELL, Robert B.:** *Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122* (2015). *Cell*. 160(6)1099–110
- [147] **LEWIS, Benjamin P. ; BURGE, Christopher B. ; BARTEL, David P.:** *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets* (2005). *Cell*. 120(1)15–20
- [148] **RÜDEL, Sabine ; FLATLEY, Andrew ; WEINMANN, Lasse ; KREMMER, Elisabeth ; MEISTER, Gunter:** *A multifunctional human Argonaute2-specific monoclonal antibody* (2008). *RNA*. 14(6)1244–53
- [149] **ZEIN, N. N.:** *Clinical significance of hepatitis C virus genotypes* (2000). *Clin Microbiol Rev*. 13(2)223–35
- [150] **LEONTIS, Neocles B. ; STOMBAUGH, Jesse ; WESTHOF, Eric:** *The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices* (2002). *Nucleic Acids Res*. 30(16)3497–531
- [151] **IMBERT, Isabelle ; DIMITROVA, Maria ; KIEN, Francois ; KIENY, Marie Paule ; SCHUSTER, Catherine:** *Hepatitis C virus IRES efficiency is unaffected by the genomic RNA 3'NTR even in the presence of viral structural or non-structural proteins* (2003). *J Gen Virol*. 84(Pt 6)1549–57
- [152] **MURAKAMI, K. ; ABE, M. ; KAGEYAMA, T. ; KAMOSHITA, N. ; NOMOTO, A.:** *Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA* (2001). *Arch Virol*. 146(4)729–41
- [153] **KERTESZ, Michael ; IOVINO, Nicola ; UNNERSTALL, Ulrich ; GAUL, Ulrike ; SEGAL, Eran:** *The role of site accessibility in microRNA target recognition* (2007). *Nat Genet*. 39(10)1278–84
- [154] **HOFACKER, Ivo L.:** *How microRNAs choose their targets* (2007). *Nat Genet*. 39(10)1191–92
- [155] **OBERNOSTERER, Gregor ; TAFER, Hakim ; MARTINEZ, Javier:** *Target site effects in the RNA interference and microRNA pathways* (2008). *Biochem Soc Trans*. 36(Pt 6)1216–19
- [156] **MARÍN, Ray M. ; VANÍČEK, Jirí:** *Efficient use of accessibility in microRNA target prediction* (2011). *Nucleic Acids Res*. 39(1)19–29
- [157] **LIU, Chaochun ; MALLICK, Bibekanand ; LONG, Dang ; RENNIE, William A. ; WOLENC, Adam ; CARMACK, C. Steven ; DING, Ye:** *CLIP-based prediction of mammalian microRNA binding sites* (2013). *Nucleic Acids Res*. 41(14)e138
- [158] **LONG, Dang ; LEE, Rosalind ; WILLIAMS, Peter ; CHAN, Chi Yu ; AMBROS, Victor ; DING, Ye:** *Potent effect of target structure on microRNA function* (2007). *Nat Struct Mol Biol*. 14(4)287–94
- [159] **MARÍN, Ray M. ; VOELLMY, Franziska ; ERLACH, Thibaud von ; VANÍČEK, Jirí:** *Analysis of the accessibility of CLIP bound sites reveals that nucleation of the miRNA:mRNA pairing occurs preferentially at the 3'-end of the seed match* (2012). *RNA*. 18(10)1760–70
- [160] **KHORSHID, Mohsen ; HAUSSER, Jean ; ZAVOLAN, Mihaela ; VAN NIMWEGEN, Erik:** *A biophysical miRNA-mRNA interaction model infers canonical and noncanonical targets* (2013). *Nat Methods*. 10(3)253–55

- [161] **Wu, Ligang ; BELASCO, Joel G.:** *Micro-RNA regulation of the mammalian lin-28 gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells (2005)*. Mol Cell Biol. 25(21)9198–208
- [162] **NIELSEN, Cydney B. ; SHOMRON, Noam ; SANDBERG, Rickard ; HORNSTEIN, Eran ; KITZMAN, Jacob ; BURGE, Christopher B.:** *Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs (2007)*. RNA. 13(11)1894–910
- [163] **HNATYSZYN, H. James:** *Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes (2005)*. Antivir Ther. 10(1)1–11
- [164] **BUHLER, Sandra ; BARTENSCHLAGER, Ralf:** *New targets for antiviral therapy of chronic hepatitis C (2012)*. Liver Int. 32 Suppl 1)9–16
- [165] **ROBERT KOCH INSTITUT** Robert Koch Institut: *RKI-Ratgeber für Ärzte*. URL [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_HepatitisC.html#doc2389942bodyText2](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HepatitisC.html#doc2389942bodyText2)
- [166] **ALEXOPOULOU, A. ; DOURAKIS, S. P.:** *Genetic heterogeneity of hepatitis viruses and its clinical significance (2005)*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 4(1)47–55
- [167] **JOPLING, Catherine L.:** *Targeting microRNA-122 to Treat Hepatitis C Virus Infection (2010)*. Viruses. 2(7)1382–93
- [168] **VAN DER REE, MEIKE H ; VAN DER MEER, ADRIAAN J ; BRUIJNE, Joep de ; MAAN, Rael ; VAN VLIET, Andre ; WELZEL, Tania M. ; ZEUZEM, Stefan ; LAWITZ, Eric J. ; RODRIGUEZ-TORRES, Maribel ; KUPCOVA, Viera ; WIERCINSKA-DRAPALO, Alcija ; HODGES, Michael R. ; JANSSEN, Harry L. A. ; REESINK, Hendrik W.:** *Long-term safety and efficacy of microRNA-targeted therapy in chronic hepatitis C patients (2014)*. Antiviral Res. 111)53–59
- [169] **JANSSEN, Harry L. A. ; REESINK, Hendrik W. ; LAWITZ, Eric J. ; ZEUZEM, Stefan ; RODRIGUEZ-TORRES, Maribel ; PATEL, Keyur ; VAN DER MEER, ADRIAAN J ; PATICK, Amy K. ; CHEN, Alice ; ZHOU, Yi ; PERSSON, Robert ; KING, Barney D. ; KAUPPINEN, Sakari ; LEVIN, Arthur A. ; HODGES, Michael R.:** *Treatment of HCV infection by targeting microRNA (2013)*. N Engl J Med. 368(18)1685–94
- [170] **LI, Yi-Ping ; VAN PHAM, Long ; UZCATEGUI, Nathalie ; BUKH, Jens:** *Functional analysis of microRNA-122 binding sequences of hepatitis C virus and identification of variants with high resistance against specific antagomir (2016)*. J Gen Virol
- [171] **LI, Yi-Ping ; GOTTWEIN, Judith M. ; SCHEEL, Troels K. ; JENSEN, Tanja B. ; BUKH, Jens:** *MicroRNA-122 antagonism against hepatitis C virus genotypes 1-6 and reduced efficacy by host RNA insertion or mutations in the HCV 5' UTR (2011)*. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(12)4991–96
- [172] **MORTIMER, Stefanie A. ; DOUDNA, Jennifer A.:** *Unconventional miR-122 binding stabilizes the HCV genome by forming a trimolecular RNA structure (2013)*. Nucleic Acids Res. 41(7)4230–40
- [173] **ØROM, Ulf Andersson ; NIELSEN, Finn Cilius ; LUND, Anders H.:** *MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation (2008)*. Mol Cell. 30(4)460–71
- [174] **KLOOSTERMAN, Wigard P. ; WIENHOLDS, Erno ; KETTING, Rene F. ; PLASTERK, Ronald H. A.:** *Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo (2004)*. Nucleic Acids Res. 32(21)6284–91
- [175] **LYTLE, J. Robin ; YARIO, Therese A. ; STEITZ, Joan A.:** *Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR (2007)*. Proc Natl Acad Sci U S A. 104(23)9667–72

- [176] **EULALIO, Ana ; HUNTZINGER, Eric ; IZAURRALDE, Elisa:** *Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing* (2008). *Cell*. 132(1)9–14
- [177] **SANGER, F. ; NICKLEN, S. ; COULSON, A. R.:** *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. 1977 (1992). *Biotechnology*. 24)104–08
- [178] **DARTY, Kévin ; DENISE, Alain ; PONTY, Yann:** *VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure* (2009). *Bioinformatics*. 25(15)1974–75
- [179] **GRUBER, Andreas R. ; LORENZ, Ronny ; BERNHART, Stephan H. ; NEUBÖCK, Richard ; HOFACKER, Ivo L.:** *The Vienna RNA websuite* (2008). *Nucleic Acids Res.* 36(Web Server issue)W70-4
- [180] **LORENZ, Ronny ; BERNHART, Stephan H. ; HÖNER ZU SIEDERDISSEN, Christian ; TAFER, Hakim ; FLAMM, Christoph ; STADLER, Peter F. ; HOFACKER, Ivo L.:** *ViennaRNA Package 2.0* (2011). *Algorithms Mol Biol.* 6)26

## 6 Anhang

### 6.1 Alignments

#### 6.1.1 Sequenz-Alignment miR-122-Bindungsstelle 5B.2

Auf der nächsten Seite ist die miR-122 und die konservierte miR-122-Bindungsstelle 5B.2 in 106 HCV-NS5B-Sequenzen dargestellt [48]

Die miR-122-*seed-target*-Sequenz (nt 2–8) und die *supplemental*-Region (nt 18–21) sind grau markiert. Die miR-122-Sequenz ist oberhalb des *Alignments* dargestellt. Die Lücken wurden eingefügt, um eine optimale Übereinstimmung der Sequenzen zu erhalten. HCV-Genotypen und die NCBI Referenznummer sind links angegeben. Ebenso die Nukleotidnummer an deren Stelle die dargestellte Sequenz im HCV-Genom beginnt und endet. Die *seed-target*-Sequenz der miR-122 ist in 99 der 106 Isolate konserviert und die *supplemental*-Region in allen Isolaten. Unter den Sequenzen ist ein Histogramm abgebildet, welches die Konservierung jeder einzelnen Base anzeigt.

	supplemental- Region	seed- Sequenz	
	miR-122 3' - G UGGUAACAG UUUUG	UGUGAGG	U - 5'
1a_EF621489.1	8776 UCGCGCGGGCCGCGUGGGAGACAGCAAGACACACUCC	- AGUCAAUUCCUGGUUAGGCAACA	8835
1a_AB520610.1	8776 UCGCGAGAGCCGCGUGGGAGACAGCAAGACACACUCC	- AGUCAAUUCCUGGUUAGGCAACA	8835
1b_AJ238799.1	8773 UCGCGCGGGCUGCGUGGGAGACAGCUAGACACACUCC	- AGUCAAUUCCUGGUUAGGCAACA	8835
1b_AY460204.1	8776 UCGCGCGGGCUGCGUGGGAGACAGCUAGGACACACUCC	- AGUCAAUUCCUGGUUAGGCAACA	8835
1c_AY651061.1	8776 UCGCGCGGGCUGCGUGGGAGACAGCAAGACACACUCC	- AGUGAACUCCUGGUUAGGCAACA	8835
1c_HPCCGS	8776 UCGCGCGGGCUGCGUGGGAGACAGCAAGACACACUCC	- AGUGAACUCCUGGUUAGGCAACA	8835
1e_KC248194.1	8787 UCGCGCGGGCUGCGUGGGAGACAGCUAGACACACUCC	- AAUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8846
1g_AM910652.2	8760 UCGCGCGGGCUGCGUGGGAGACAGCUAGACACACUCC	- UGUUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8819
1h_KC248198.1	8779 UCGCGCGAGCCGCGUGGGAGACAGCAAGACACACUCC	- AGUGAACUCCUGGUUAGGCAACA	8838
1h_KC248199.1	8779 UCGCGCGAGCCGCGUGGGAGACAGCAAGACACACUCC	- AGUGAACUCCUGGUUAGGCAACA	8838
1l_KC248196.1	8795 UCGCGCGAGCCGCGUGGGAGACAGCAAGACACACUCC	- AGUUAUCCUGGUUAGGCAACA	8854
2a_AF177036.1	8841 UCGCGCGGGCUGCGUGGGAGACAGUUAAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8900	
2a_AB047639.1	8841 UCGCGCGGGCUGCGUGGGAGACAGUUAAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8900	
2b_AB030907.1	8842 UCACCCGAGCUGCUUGGGAGACAGUUAAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8901	
2b_JQ745651.1	8842 UCACCCGAGCUGCUUGGGAGACAGUUAAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8901	
2c_D50409.1	8853 UGCGCAGGGCUGCCUGGGAGACAGCAAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8912	
2c_JX227965.1	8764 UGCGCAGGGCAGCUGGGAGACAGCAAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGCAACA	8823	
2d_JF735114.1	8841 UGCGCAGGGCUGCCUGGGAGACAGCAAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8900	
2e_JF735120.1	9057 UGCGCAGGGCUGCCUGGGAGACAGUUAAG - GCACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	9116	
6g_DQ314806.1	8806 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACUGCUCGACACACUCC	- AGUCAAUUCCUGGUUAGGCAACA	8865
6g_HPCJK046E2	8806 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACUGCUCGACACACUCC	- CGUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8865
2i_DQ155561	8811 UGCGCAGGGCUGCCUGGGAGACGCAAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8870	
2j_JF735113.1	8841 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - GCACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8900	
2j_HM777359.1	8761 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - GCACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8900	
2k_AB031663.1	8842 UGCGCAGGGCUGCCUGGGAGACAGCUAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8901	
2k_JF735118.1	8841 UGCGCAGGGCUGCCUGGGAGACAGCUAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8900	
2m_JF735111.1	8844 UGCGCAGGGCUGCCUGGGAGACAGCUAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8903	
2m_JX227968.1	8766 UGCGCAGGGCUGCCUGGGAGACAGCUAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8825	
2q_FN666429	8814 UGCGCAGGGCUGCCUGGGAGACAGUUAAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8873	
2q_FN666428	8814 UGCGCAGGGCUGCCUGGGAGACAGUUAAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8873	
3a_AB691596.1	8804 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACAGUUAAG - AGUUAUCCUGGUUAGGCAACA	8863	
3a_AB792683.1	8804 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACAGUUAAG - AGUUAUCCUGGUUAGGCAACA	8863	
3b_HPCFG	8810 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACAGUUAAG - AGUUAUCCUGGUUAGGCAACA	8869	
3g_JF735123.1	8813 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACGCAAG - AGUUAUCCUGGUUAGGCAACA	8872	
3g_JX227954.1	8732 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACAGCUAG - AGUUAUCCUGGUUAGGCAACA	8791	
3h_JF735121.1	8798 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACAGCUAG - GGUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8857	
3h_JF735124.1	8804 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACAGCUAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8863	
3i_FJ407092.1	8805 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACAGCUAG - GGUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8864	
3i_JF735125.1	8805 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACAGCUAG - GGUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8864	
3k_HPCJK049E1	8798 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACAGCUAG - AGUUAUCCUGGUUAGGCAACA	8857	
3k_JF735122.1	8798 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACAGCUAG - AGUUAUCCUGGUUAGGCAACA	8857	
4a_AB795432.1	8767 UGCGCGAGCCGCAUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAAUUCCUGGUUAGGCAACA	8826	
4a_Y11604	8709 UGCGCGAGCUGUAUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAAUUCCUGGUUAGGCAACA	8764	
4b_FJ025856	8629 UGCGUAGAGCCGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUGAACUCCUGGUUAGGCAACA	8684	
4b_FJ462435.1	8775 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACAGUUAAG - GGUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8834	
4c_FJ462436.1	8808 UGCGCGAGCUGCUUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAAUUCCUGGUUAGGCAACA	8867	
4d_DQ516083	8659 UGCGCAGGGCUGCCUGGGAGACAGCUAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8758	
4d_FJ462437.1	8760 UGCGCAGGGCUGCCUGGGAGACAGCUAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8763	
4f_EF589160	8704 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGCAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8819	
4f_EF589161	8706 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGCAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8765	
4g_FJ462432.1	8767 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGCUAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8826	
4g_JX227963.1	8886 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGCUAG - AGUUAUCCUGGUUAGGCAACA	8946	
4k_FJ462438.1	8776 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8835	
4k_EU392173	8698 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8757	
4l_JX227957.1	8689 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - GGUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8749	
4l_FJ839870.1	8760 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - GGUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8818	
4m_JX227961.1	8682 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8741	
4n_FJ462433.1	8761 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8820	
4n_JX227970.1	8685 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8744	
4n_FJ462441.1	8766 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8825	
4o_FJ462440.1	8758 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8817	
4o_JX227977.1	8668 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - GGUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8727	
4q_FJ462434.1	8773 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8832	
4r_FJ462431.1	8763 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUGAAUCCUGGUUAGGCAACA	8822	
4t_FJ839869.1	8763 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUGAAUCCUGGUUAGGCAACA	8822	
4r_FJ462439.1	8775 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8834	
4r_JX227962.1	8700 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8759	
4v_HQ537009	8696 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUUAUCCUGGUUAGGCAACA	8755	
5a_NC_009826	8682 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUUAUCCUGGUUAGGCAACA	8751	
5a_AF064490	8723 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8782	
5a_AY859526.1	8690 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - ACACUCCCGUCUCAAUUCUUGGUUAGGAAACA	8749	
6a_DQ480524.1	8760 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8819	
6b_NC_009827	8801 UGCGCGAGCUGCUUGGGAGACAGUUAAG - UGUCAAUCCUGGUUAGGCAACA	8850	
6b_D84262.2	8801 UGCGCGAGCUGCUUGGGAGACAGUUAAG - UGUCAAUCCUGGUUAGGCAACA	8850	
6c_EF424629.1	8801 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUUAUCCUGGUUAGGCAACA	8845	
6d_D84263.2	8775 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - CGUUAUCCUGGUUAGGCAACA	8838	
6e_EU408326	8806 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - GGUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8865	
6f_DQ314805.1	8806 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - GGUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8865	
6f_DQ835764.1	8794 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8853	
6f_DQ835760.1	8794 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8853	
6h_D84265.2	8785 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - UGUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8844	
6i_DQ835762.1	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6i_DQ835770.1	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6j_DQ835769.1	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6j_DQ835761.1	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6k_JX183552.1	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6k_D84264.2	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6l_JX183554.1	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6l_EF424628.1	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6m_DQ835765.1	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6m_DQ835767.1	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6n_DQ835768.1	8785 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUGAAUCCUGGUUAGGCAACA	8844	
6n_EU246937	8760 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUGAAUCCUGGUUAGGCAACA	8819	
6o_EF424627.1	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUGAAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6o_EU408327	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUGAAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6p_EF424626.1	8789 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUGAAUCCUGGUUAGGCAACA	8848	
6p_EF424625.1	8786 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8845	
6r_EU408328	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUGAAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6r_EU408329	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - GGUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6t_EF632070.1	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6t_EF632069.1	8788 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6u_EU246940	8766 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACAGUUAAG - AGUGAAUCCUGGUUAGGCAACA	8825	
6v_FJ435090.1	8788 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
6v_EU798760	8788 UGCGCGGGCUGCUUGGGAGACAGUUAAG - AGUCAUCCUGGUUAGGCAACA	8847	
7a_EF108306	8749 UGCGCAGGACGCGUGGGAGACAGUUAAG - UGUAAUCCUGGUUAGGCAACA	8808	



### 6.1.2 Sequenz-Alignment miR-122-Bindungsstelle 5B.3

Auf der nächsten Seite ist die miR-122 und die konservierte miR-122-Bindungsstelle 5B.3 in 106 HCV-NS5B-Sequenzen dargestellt [48]

Die miR-122-*seed-target*-Sequenz (nt 2–7) ist in hell-grau dargestellt. Die Nukleotide der *supplemental*-Region (nt 14–20) sind in unterschiedlichen grautönen hervorgehoben, je nachdem welche 4 Nukleotide lange Sequenz mit der miR-122 binden kann. Die miR-122-Sequenz ist oberhalb des *Alignments* dargestellt. HCV-Genotypen und die NCBI Referenznummer sind links angegeben. Ebenso die Nukleotidnummer an deren Stelle die dargestellte Sequenz im HCV-Genom beginnt und endet. Sowohl die *seed-target*-Sequenz der miR-122-Bindungsstelle als auch die *supplemental*-Region sind in allen Isolaten konserviert. Unter den Sequenzen ist ein Histogramm abgebildet, welches die Konservierung jeder einzelnen Base anzeigt.



### 6.1.3 Aminosäure-Alignment miR-122-Bindungsstelle 5B.2

Auf der nächsten Seite ist das *Alignment* der Nukleotidsequenz der miR-122-Bindungsstelle 5B.2 mit der Aminosäure-Sequenz dargestellt. Jede Aminosäure ist farbig hervorgehoben wenn sie mehr als 50 % konserviert vorliegt, wobei jeder Aminosäure eine eigene Farbe zugeteilt wurde. Da hier keine Lücken eingefügt werden konnten ist zu beachten, dass die miR-122 *seed-target*-Sequenz in manchen Isolaten um 2 Nukleotide verschoben ist. Das Histogramm zeigt den Anteil an vorliegenden Nukleotiden relativ zu der Anzahl an Nukleotiden, die eine bestimmte Aminosäure kodieren können, d.h. je niedriger der Balken im Histogramm ist, desto weniger Nukleotide werden aus den möglichen Nukleotiden tatsächlich verwendet, und desto eher hat diese Sequenz eine überlappende zusätzliche Funktion.



#### **6.1.4 Aminosäure-Alignment miR-122-Bindungsstelle 5B.3**

Auf der nächsten Seite ist das *Alignment* der Nukleotidsequenz der miR-122-Bindungsstelle 5B.3 mit der Aminosäure-Sequenz dargestellt. Jede Aminosäure ist farbig hervorgehoben wenn sie mehr als 50 % konserviert vorliegt, wobei jeder Aminosäure eine eigene Farbe zugeteilt wurde. Das Histogramm zeigt den Anteil an vorliegenden Nukleotiden relativ zu der Anzahl an Nukleotiden, die eine bestimmte Aminosäure kodieren können, d.h. je niedriger der Balken im Histogramm ist, desto weniger Nukleotide werden aus den möglichen Nukleotiden tatsächlich verwendet, und desto eher hat diese Sequenz eine überlappende zusätzliche Funktion.



### 6.1.5 Sequenz-Alignment miR-122- Bindungsstelle S3

Auf der nächsten Seite ist die miR-122 und die konservierte miR-122-Bindungsstelle S3 in 94 HCV-3'-UTR-Sequenzen dargestellt [48]

Die miR-122-*seed-target*-Sequenz (nt 2–8) und die *supplemental*-Region (nt 18–21) sind grau markiert. Die Lücken wurden eingefügt, um eine optimale Übereinstimmung der Sequenzen zu erhalten. HCV-Genotypen und die NCBI Referenznummer sind links angegeben. Ebenso die Nukleotidennummer an deren Stelle die dargestellte Sequenz im HCV-Genom beginnt und endet. Die *seed-target*-Sequenz der miR-122 ist in 85 der 94 Isolate konserviert und die *supplemental*-Region in 92 von 94. Unter den Sequenzen ist ein Histogramm abgebildet, welches die Konservierung jeder einzelnen Base anzeigt.











### 6.3 HCV-RNA-Strukturen der Bindungsexperimente

Auf den nachfolgenden Seiten sind die HCV-RNA-Strukturen der miR-122-Bindungsstellen 5B.2, 5B.3 und S3 aufgeführt, deren Transkripte in den co-IP-Bindungsexperimente verwendet wurden.

Zur besseren Darstellung der Strukturen wurde das VARNAv3-92-Programm [178] verwendet. Der Farbcode, welcher die Wahrscheinlichkeit angibt, dass die Base genau so vorliegt wurde mit dem Vienna RNAfold WebServer (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) [179; 180] berechnet und konnte als dot-plot EPS-Form in das Varna-Programm geladen werden. Die Einstellungen waren:

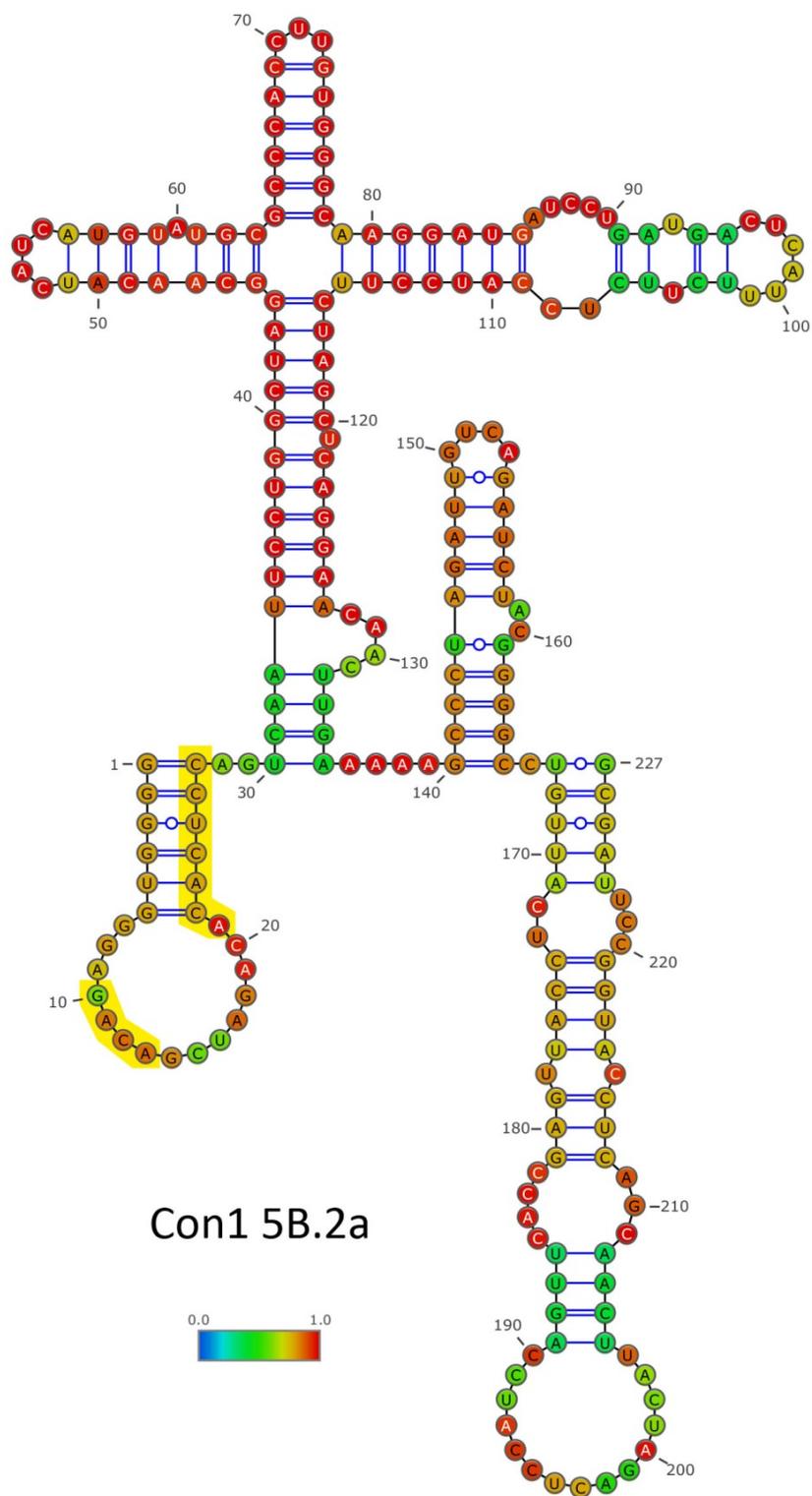
1. *Fold algorithms and basic options: minimum free energy and partition function, avoid isolated base pairs*
2. *Advances folding options: no dangling end energies, Turner model 2004.*

Die *seed-target*- und die *supplemental*-Region sind gelb hervorgehoben.

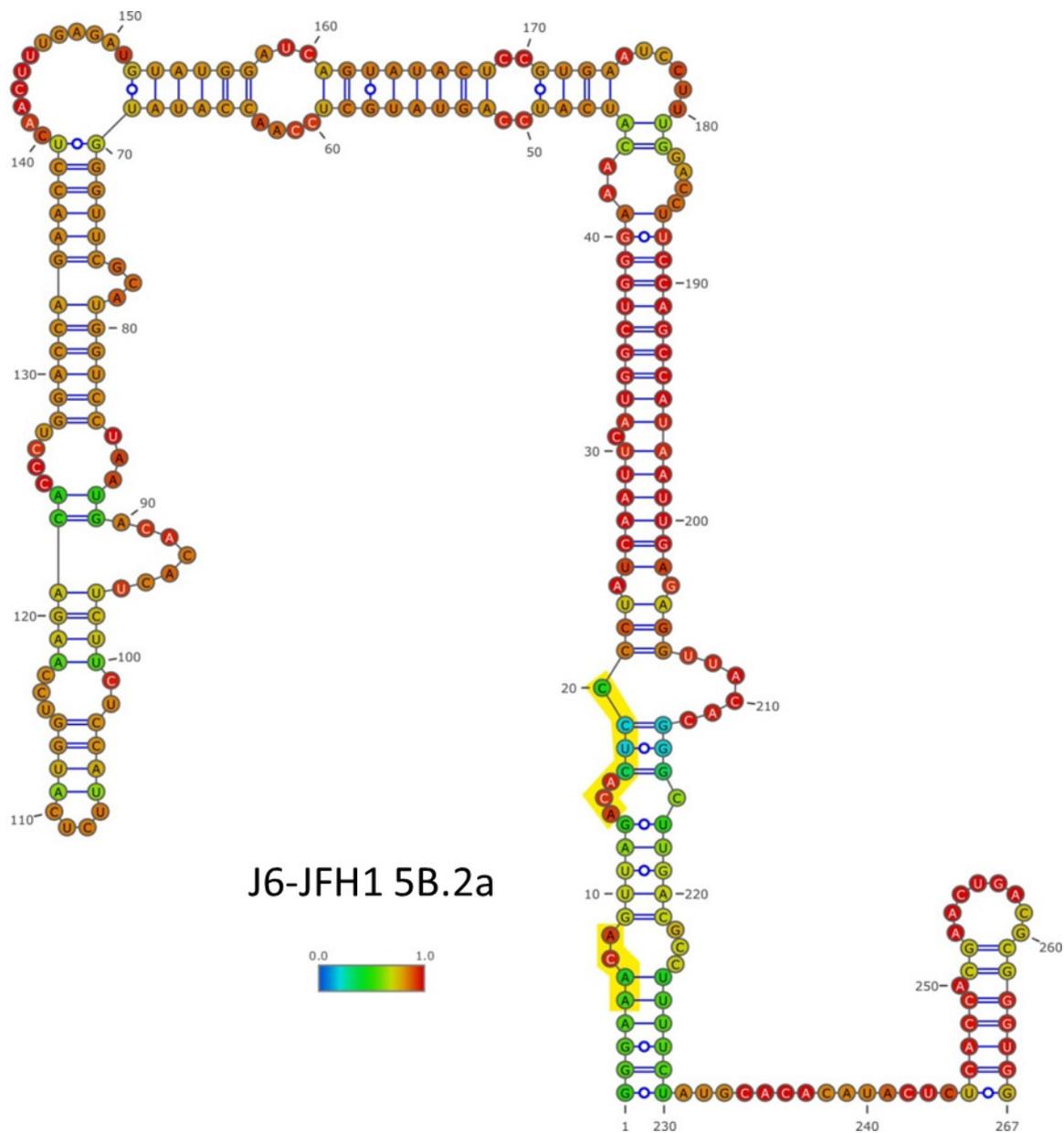
### 6.3.1 HCV-RNA-Strukturen miR-122-Bindungsstelle 5B.2

#### HCV-RNA\_5B.2a

Con1\_HCV-Genotyp 1b\_AJ238799.1\_227 nts

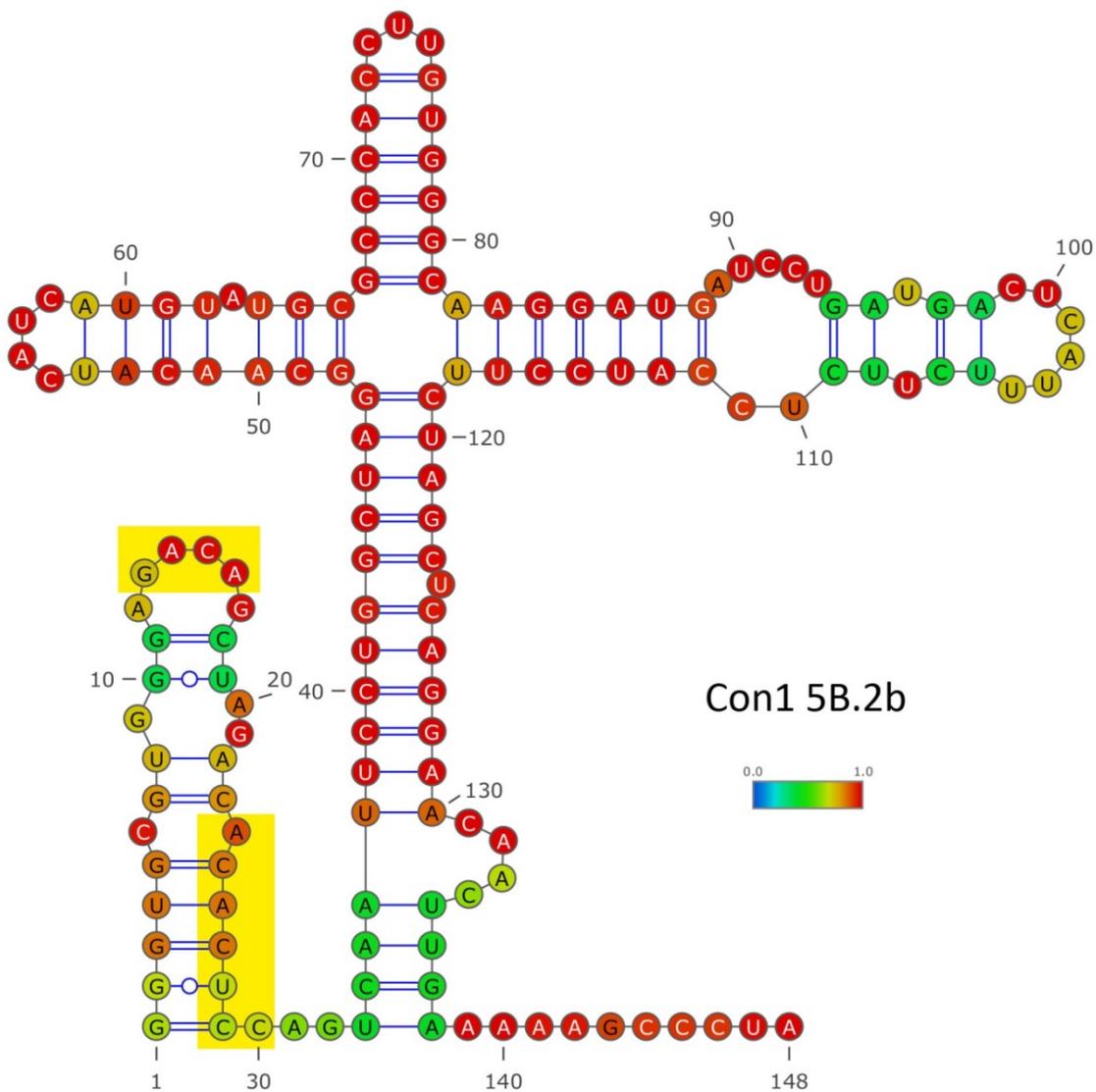


J6-JFH1\_HCV-Genotyp 2a\_AB047639.1\_267 nts

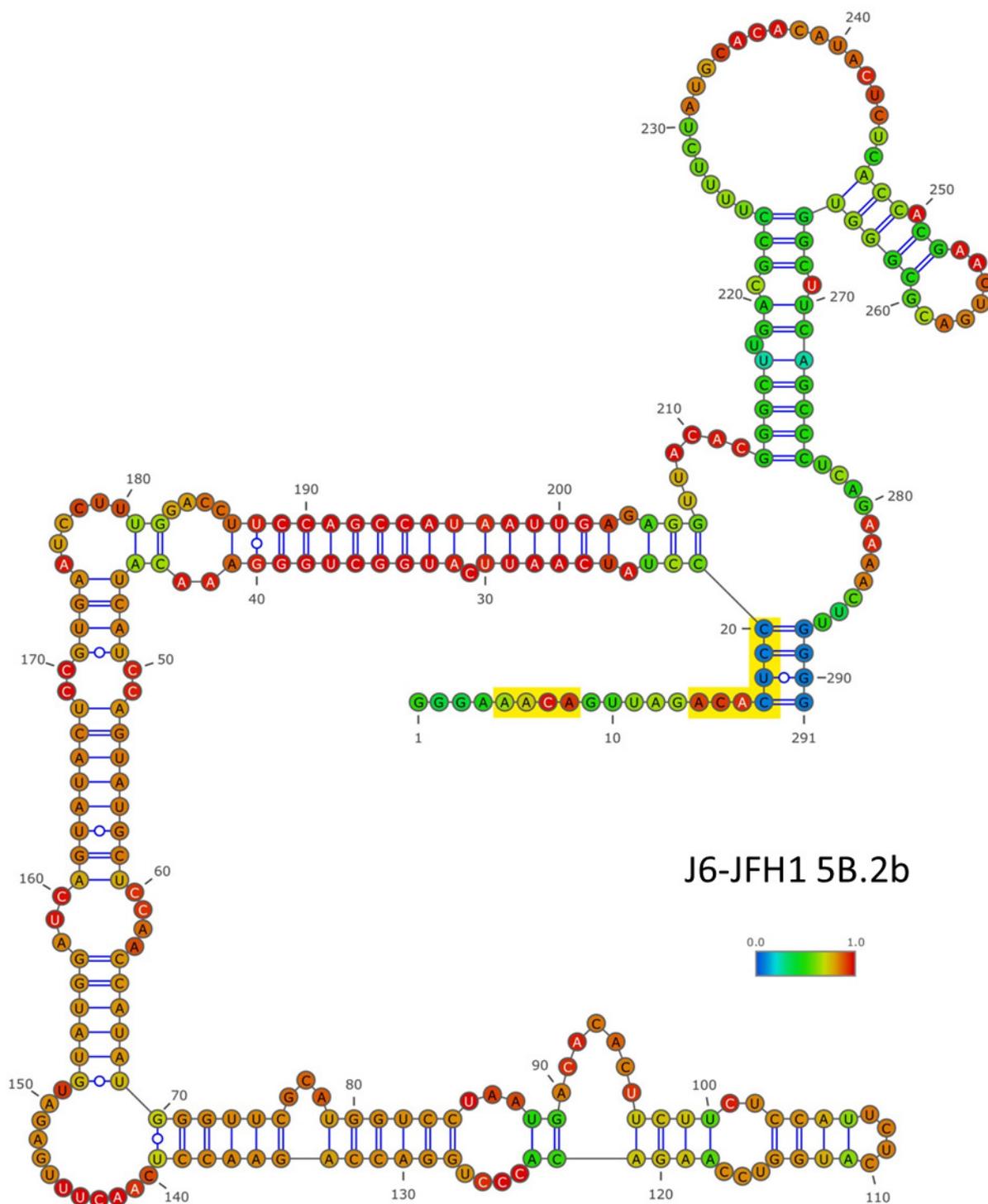


HCV-RNA\_5B.2b

Con1\_HCV-Genotyp 1b\_AJ238799.1\_148 nts

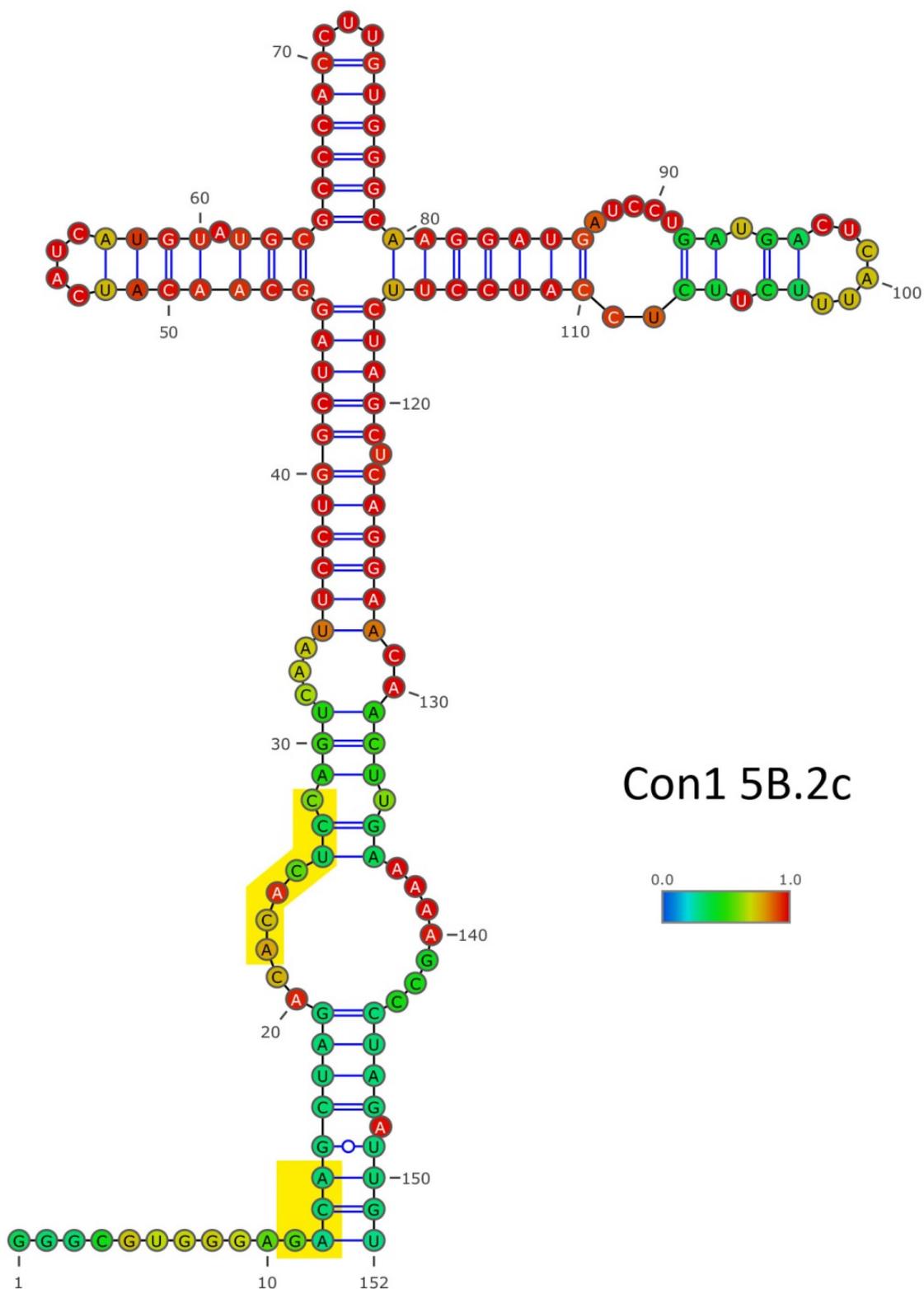


J6-JFH1\_HCV-Genotyp 2a\_AB047639.1\_291 nts

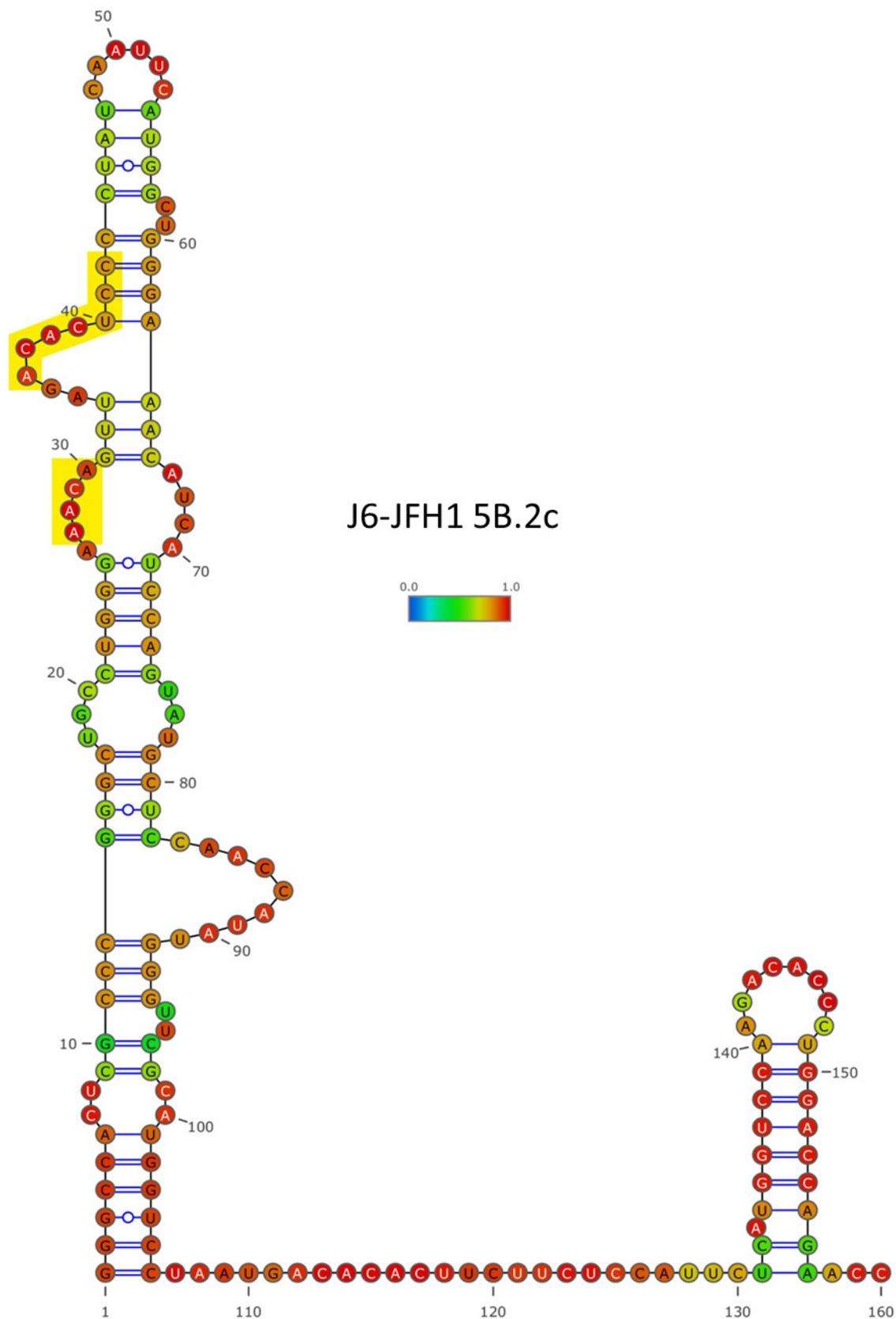


## HCV-RNA\_5B.2c

## Con1\_HCV-Genotyp 1b\_AJ238799.1\_152 nts



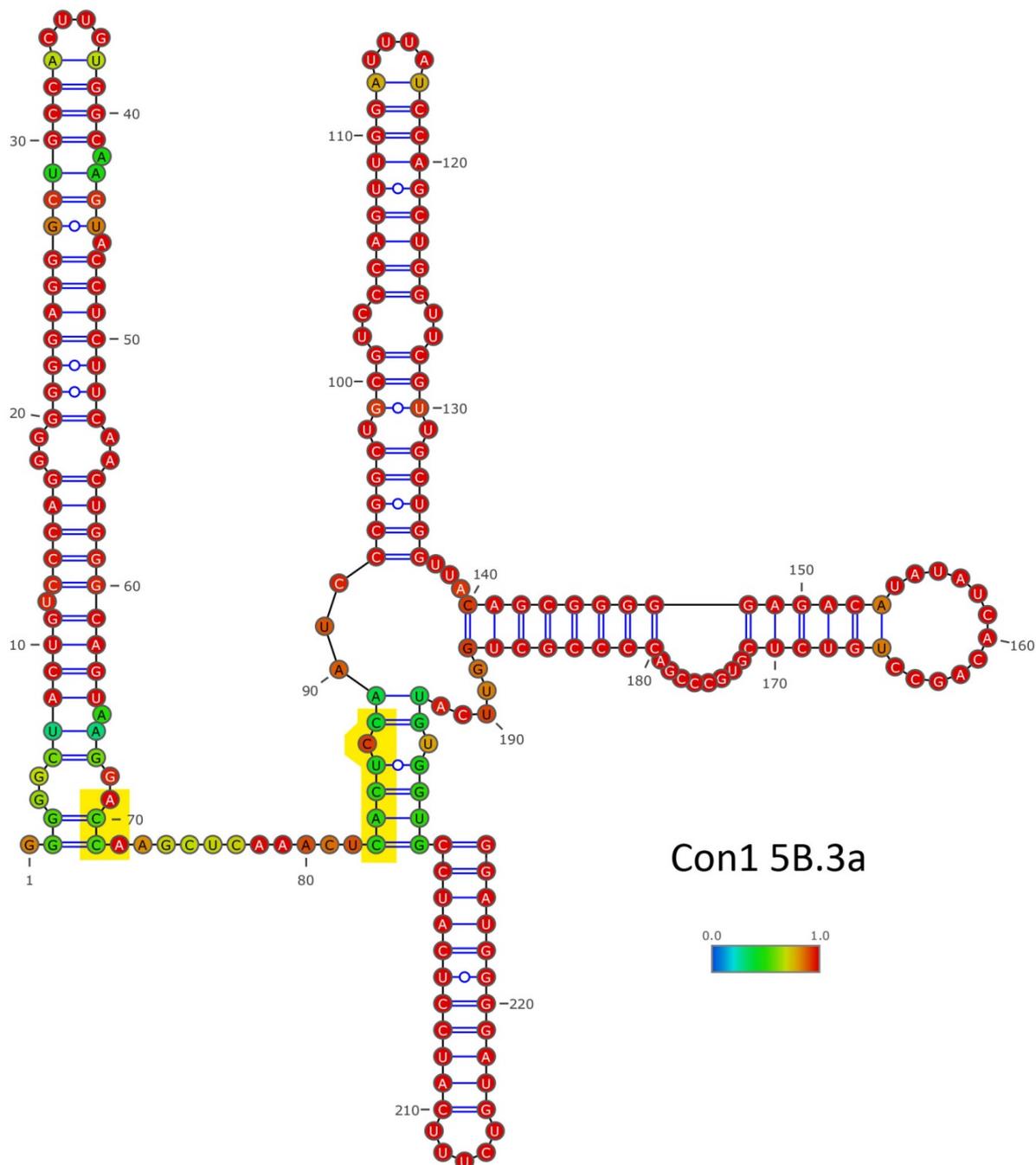
J6-JFH1\_HCV-Genotyp 2a\_AB047639.1\_160 nts



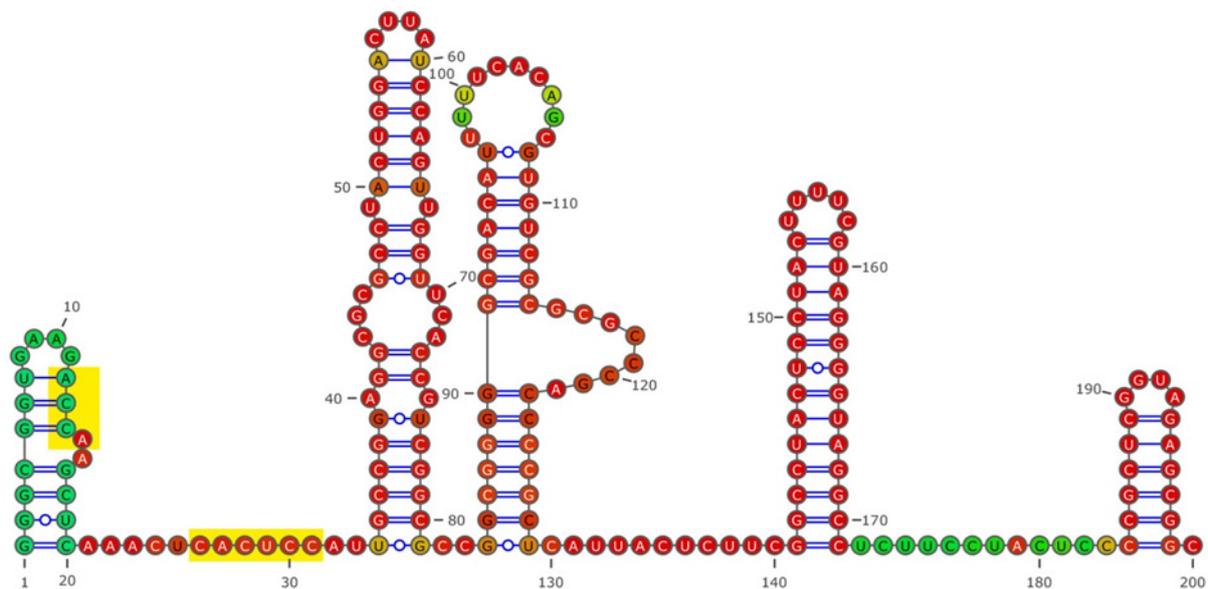
### 6.3.2 HCV-RNA-Strukturen miR-122-Bindungsstelle 5B.3

#### HCV-RNA\_5B.3a

Con1\_HCV-Genotyp 1b\_AJ238799.1\_226 nts



## J6-JFH1\_HCV-Genotyp 2a\_AB047639.1\_200 nts

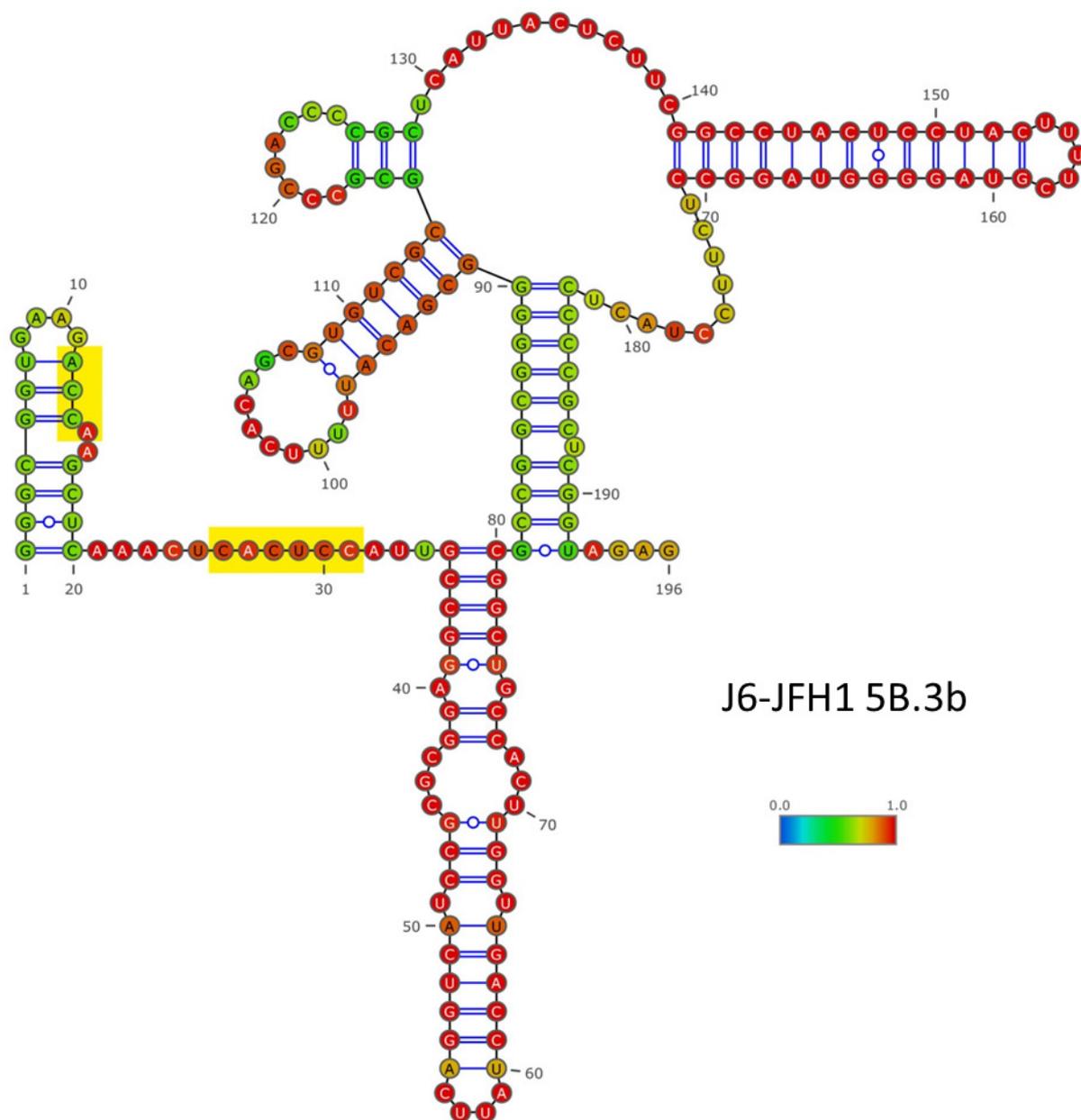


## J6-JFH1 5B.3a



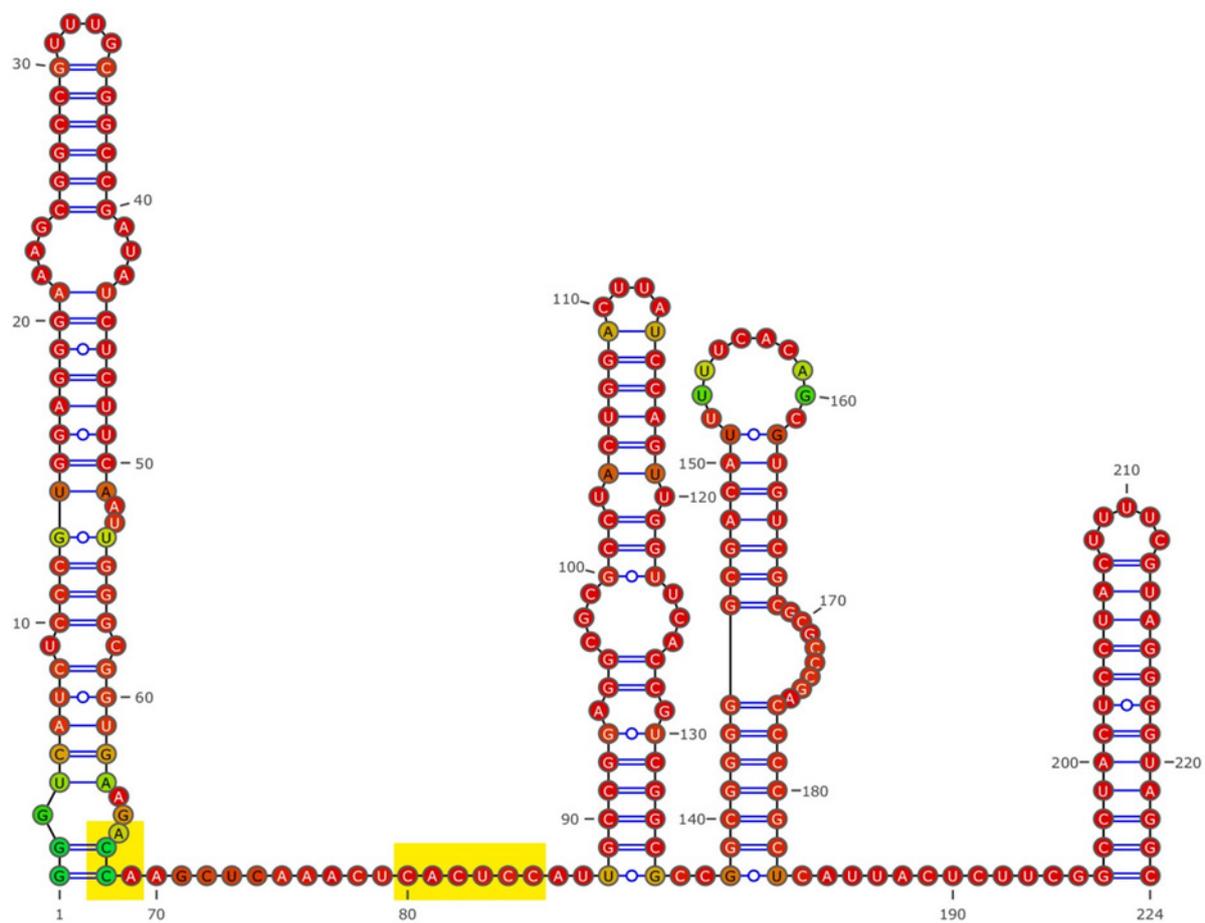
## HCV-RNA\_5B.3b

J6-JFH1\_HCV-Genotyp 2a\_AB047639.1\_196 nts



## HCV-RNA\_5B.3c

## J6-JFH1\_HCV-Genotyp 2a\_AB047639.1\_224 nts



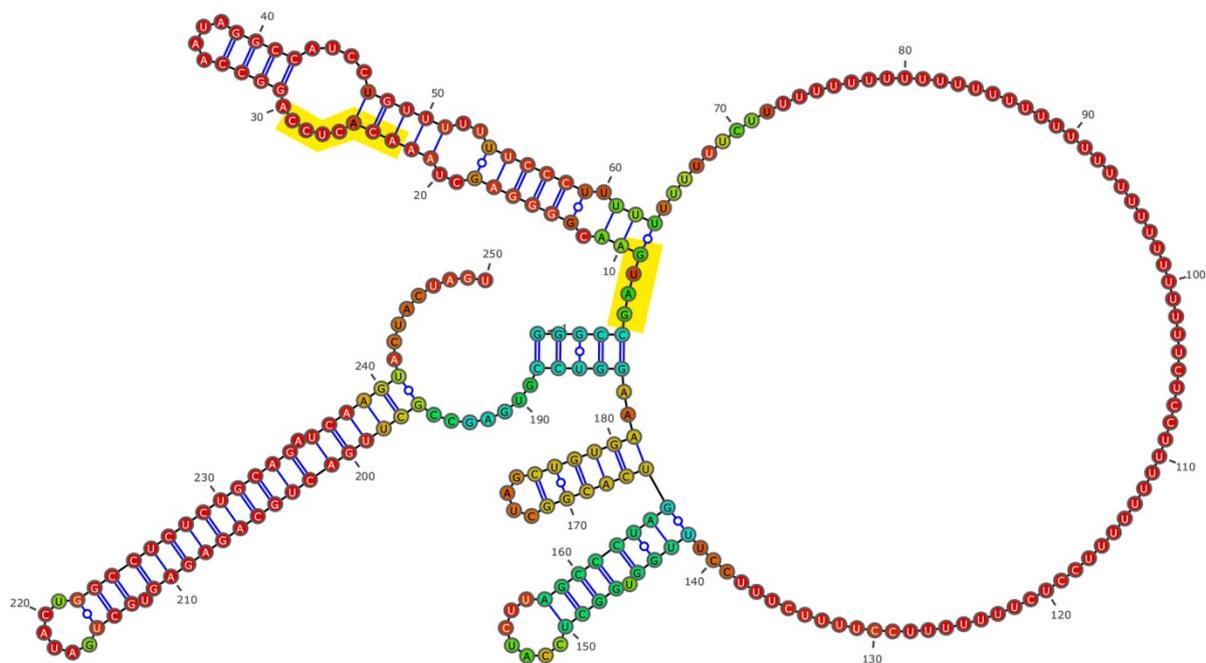
## J6-JFH1 5B.3c



### 6.3.3 HCV-RNA-Strukturen miR-122-Bindungsstellen S3

#### HCV-RNA\_S3a

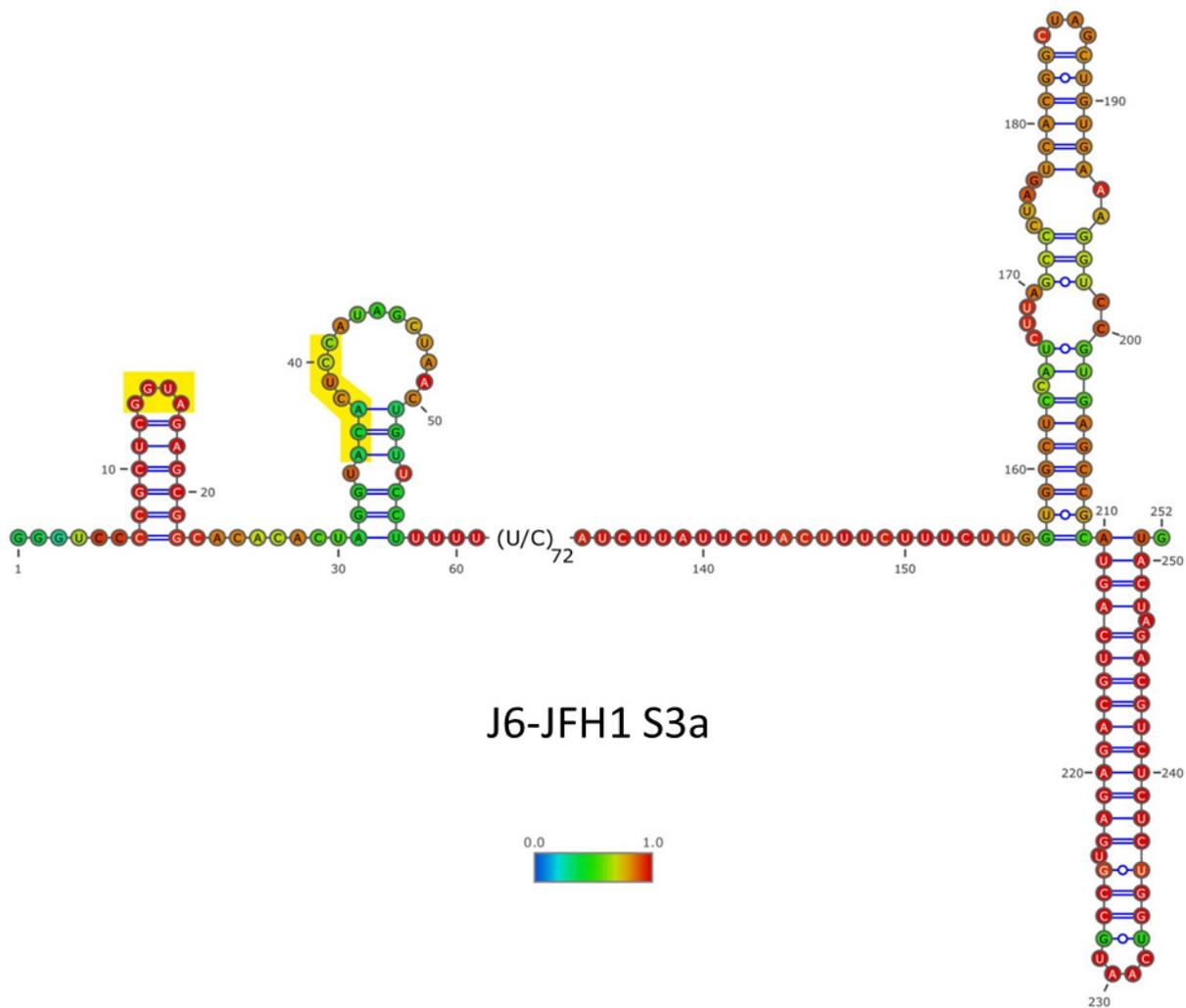
Con1\_HCV-Genotyp 1b\_AJ238799.1\_250 nts



Con1 S3a

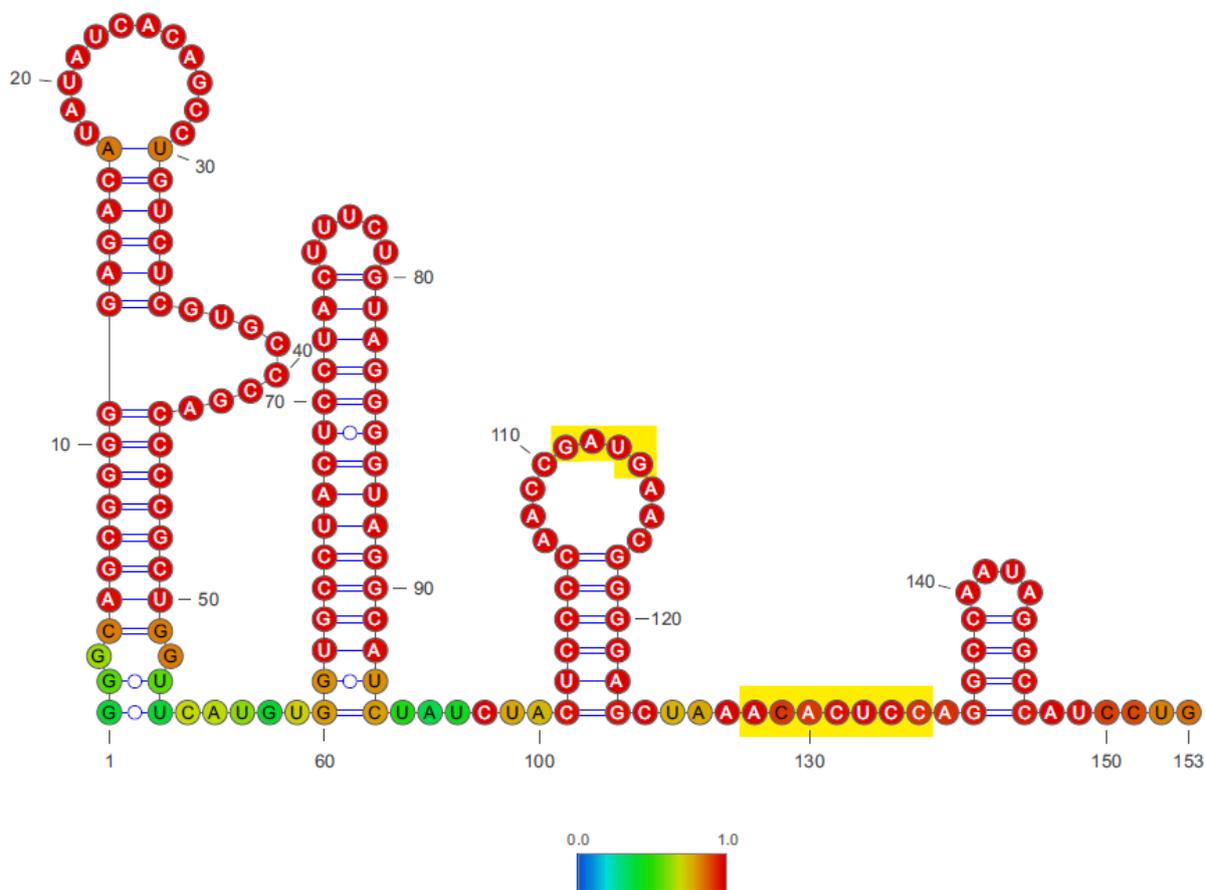


J6-JFH1\_HCV-Genotyp 2a\_AB047639.1\_252 nts



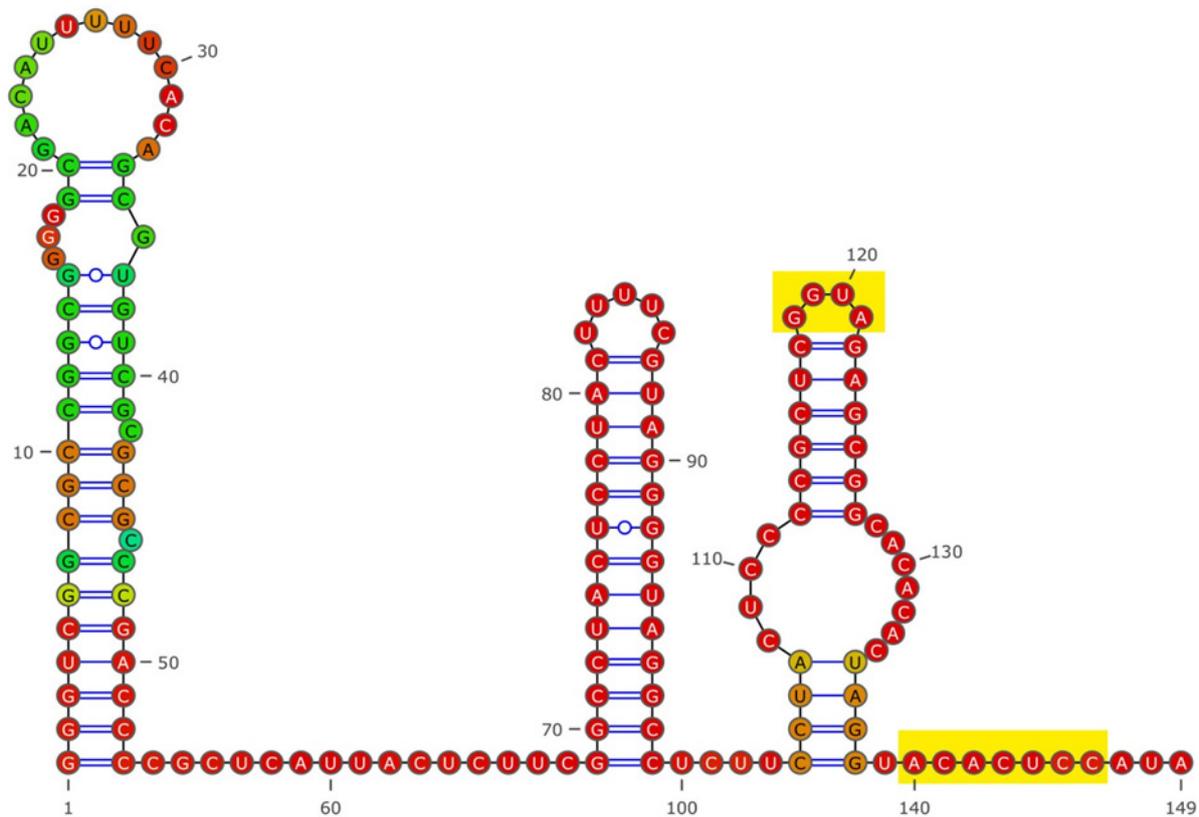
## HCV-RNA\_S3b

Con1\_HCV-Genotyp 1b\_AJ238799.1\_153 nts



Con1 S3b

## J6-JFH1\_HCV-Genotyp 2a\_AB047639.1\_298 nts

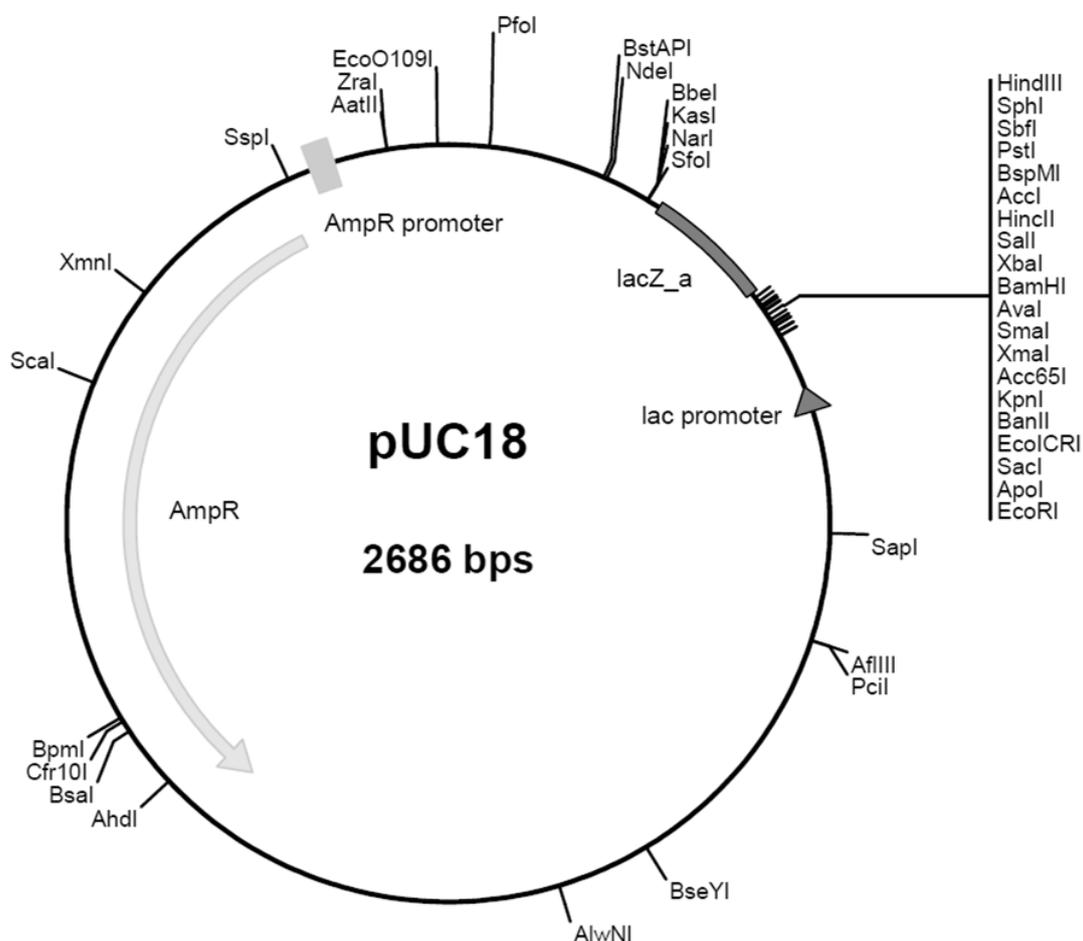


## J6-JFH1 S3b



## 6.4 Plasmidkarten

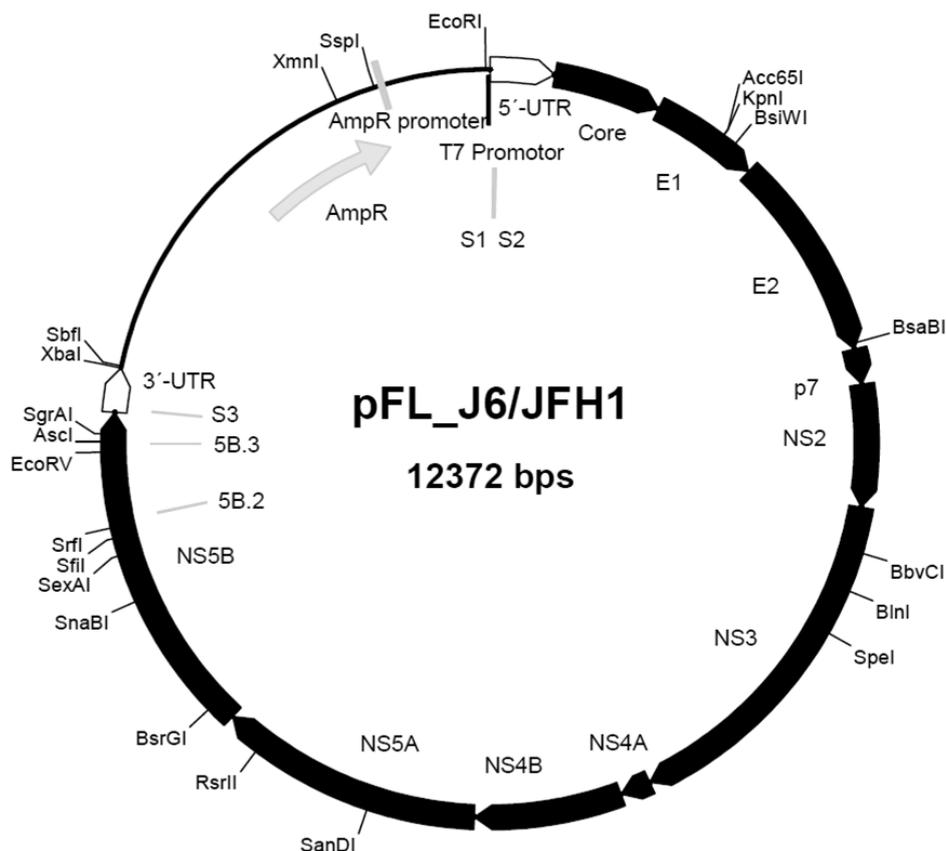
### pUC18



<b>Region</b>	<b>Start (nt)</b>	<b>Ende (nt)</b>
lacZ a	393	250
lac promoter	543	514
AmpR	2486	1626
AmpR promoter	2556	2528

Plasmid als Grundgerüst für die Klonierung der mutierten miR-122-Bindungsstellen der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR.

Die weiteren Bestandteile sind unterhalb der Karte aufgelistet. Außerdem sind die Erkennungssequenzen aller einfachen Restriktionsschnittstellen im Plasmid angezeigt.

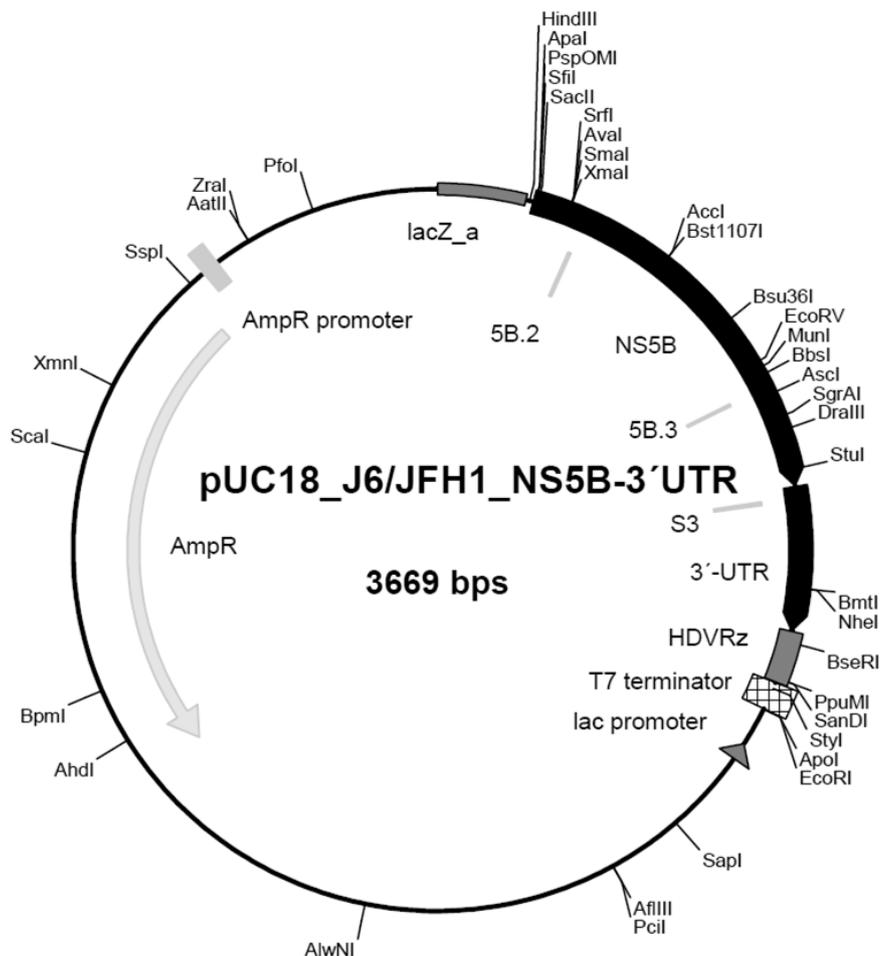
**pFL-J6/JFH1**

<b>Region</b>	<b>Start (nt)</b>	<b>Ende (nt)</b>
5'-UTR	1	340
S1	21	27
S2	37	43
Polyprotein	341	7666
NS5B	7667	9442
5B.2	8869	8875
5B.3	9274	9279
3'-UTR	9443	9678
S3	9460	9466
AmpR	10881	11740
AmpR promoter	11783	11811
T7 promoter	12355	12372

Plasmid zur Herstellung von  $^{32}\text{P}$ -markiertem RNA-Transkript für die Untersuchung der Hybridisierung eines miR-122/Ago2-Komplexes an die HCV-RNA in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR. Das Plasmid enthält dafür unter anderem die NS5B-kodierende Region und die 3'-UTR mit den miR-122-Bindungsstellen 5B.2, 5B.3 und S3.

Die weiteren Bestandteile sind unterhalb der Karte aufgelistet. Außerdem sind die Erkennungssequenzen aller einfachen Restriktionsschnittstellen im Plasmid angezeigt.

## pUC18\_J6/JFH1\_NS5B-3'-UTR

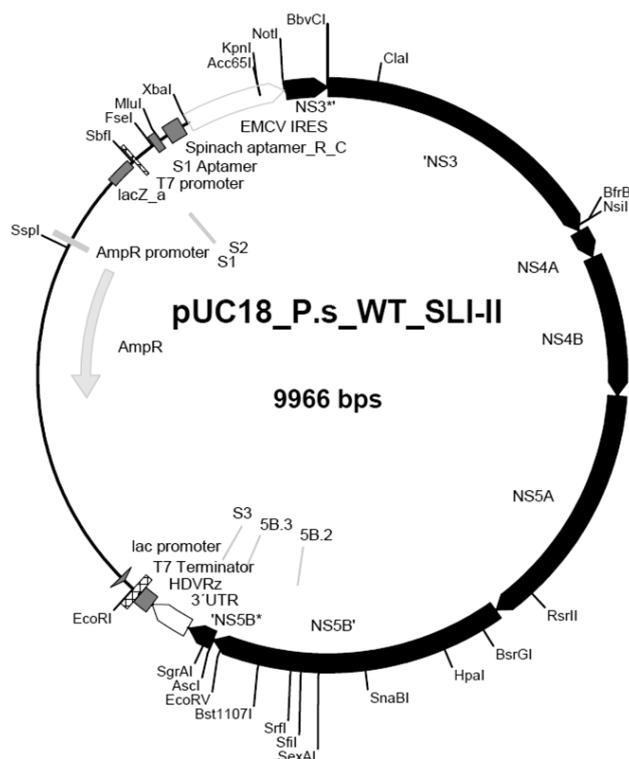


Region	Start (nt)	Ende (nt)
lacZ a	1	144
NS5B	156	813
3'-UTR	814	1049
HDVRz	1050	1136
T7 terminator	1137	1183
lac promoter	1277	1248
AmpR	3220	2360
AmpR promoter	3290	3262

Das Plasmid wurde verwendet um die miR-122-Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR zu mutieren. Anschließend diente es zur Herstellung von  $^{32}\text{P}$ -markiertem RNA-Transkript für die Untersuchung einer miR-122/Ago2-Komplex-Bindung an die HCV-RNA. Ausserdem wurde der NS5B-Bereich und die 3'-UTR in das pUC18\_P.s\_WT\_SLI-II kloniert, um Replikationsversuche durchzuführen zu können. Das Plasmid enthält dafür unter anderem einen Teil der NS5B-kodierende Region und die 3'-UTR mit den miR-122-Bindungsstellen 5B.2, 5B.3 und S3.

Die weiteren Bestandteile sind unterhalb der Karte aufgelistet. Außerdem sind die Erkennungssequenzen aller einfachen Restriktionsschnittstellen im Plasmid angezeigt.

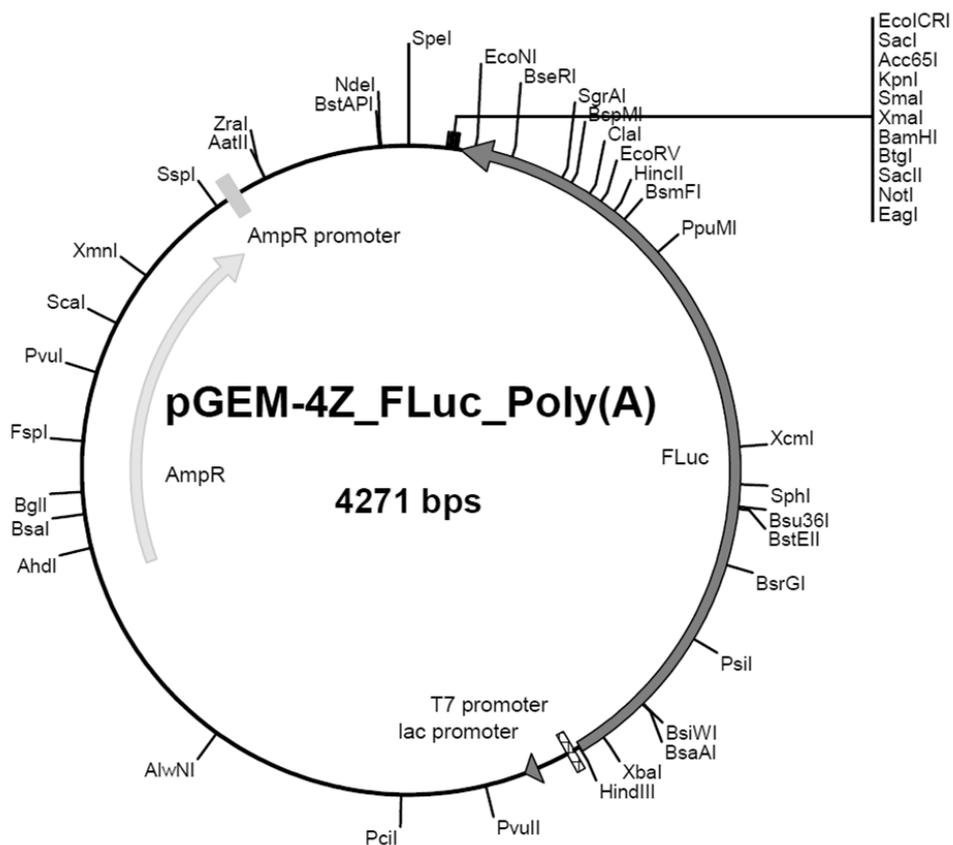
## pUC18\_P.s\_WT\_SLI-II



Region	Start (nt)	Ende (nt)
Polyprotein	1	5776
NS3'*	9734	9966
3'-UTR	5780	6015
HDVRz	6016	6102
T7 terminator	6103	6149
lac promoter	6243	6214
AmpR	8186	7326
AmpR promoter	8228	8256
lacZ a	8779	8636
T7 promoter	8804	8821
S1 aptamer	8944	8988
Spinach aptamer_R_C	9035	9132
EMCV IRES	9172	9727
S1	8841	8847
S2	8857	8862
5B.2	5206	5212
5B.3	5611	5616
S3	5797	5803

Plasmid zur Herstellung von HCV-RNA mit mutierten miR-122 Bindungsstellen in der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR zur Erforschung des Einflusses einer miR-122-Bindung auf die Replikation.

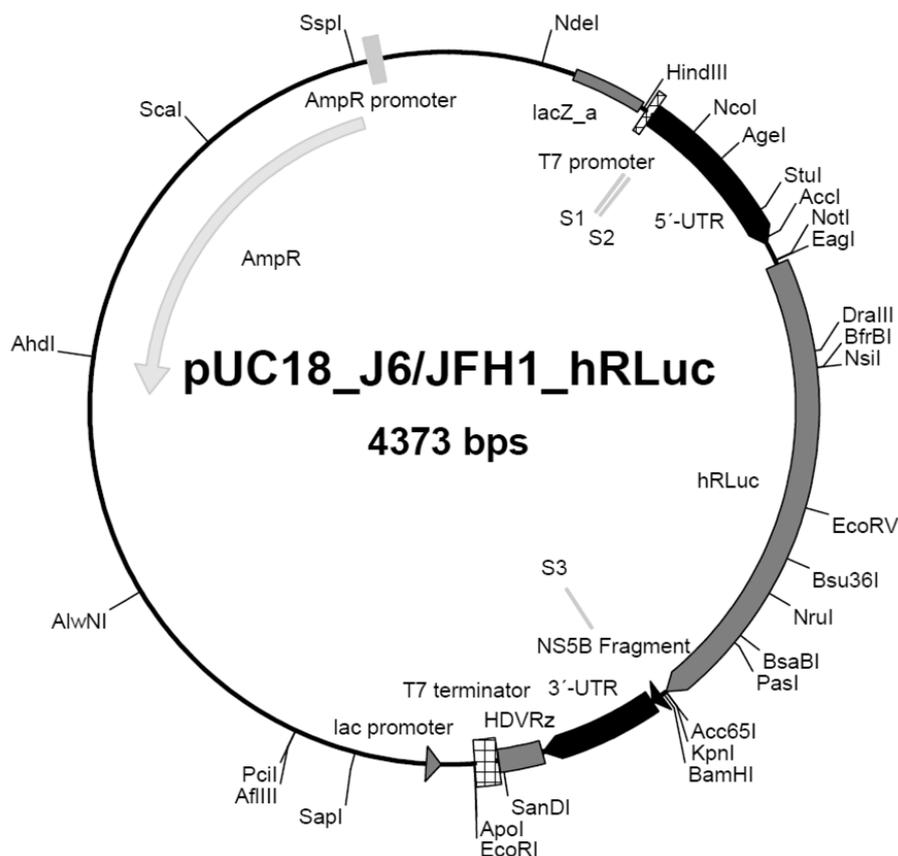
Die weiteren Bestandteile sind unterhalb der Karte aufgelistet. Außerdem sind die Erkennungssequenzen aller einfachen Restriktionsschnittstellen im Plasmid angezeigt

**pGEM-4Z\_FLuc\_Poly(A)**

<b>Region</b>	<b>Start (nt)</b>	<b>Ende (nt)</b>
FLuc	1761	109
T7 promoter	1791	1774
lac promoter	1859	1888
AmpR	2971	3831
AmpR promoter	3873	3901

Plasmid zur Herstellung von HCV-Reporter-RNA, welche zur Normalisierung des Luciferase-Assay benötigt wurden. Das Plasmid enthält das Gen für die *Firefly*-Luciferase. Die weiteren Bestandteile sind unterhalb der Karte aufgelistet. Außerdem sind die Erkennungssequenzen aller einfachen Restriktionsschnittstellen im Plasmid angezeigt.

## pUC18\_J6/JFH1\_hRLuc



Region	Start (nt)	Ende (nt)
lacZ	393	250
T7 promoter	405	421
5'-UTR	422	761
hRLuc	804	1733
NS5B Fragment	1746	1766
3'-UTR	1767	2002
HDVRz	2003	2089
T7 terminator	2090	2136
lac promoter	2230	2201
pBR322 origin	3158	2539
AmpR	4173	3313
AmpR promoter	4243	4215

Plasmid zur Herstellung von HCV-Reporter-RNA für den Luciferase-Assay mit der HCV-IRES, einem NS5B-Fragment welches die *supplemental*-Region der S3-Bindungsstelle enthält und die 3'-UTR mit der *seed-target*-Sequenz. Dargestellt ist exemplarisch das Wildtyp Plasmid. In weiteren Plasmiden lag die S3-Bindungsstelle mutiert vor.

Die weiteren Bestandteile sind unterhalb der Karte aufgelistet. Außerdem sind die Erkennungssequenzen aller einfachen Restriktionsschnittstellen im Plasmid angezeigt.

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
@	hinzufügen
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
32P	radioaktives Phosphorisotop
5B.1	erste miR-122-Bindungsstelle in der NS5B-kodierenden Region
5B.2	zweite miR-122-Bindungsstelle in der NS5B-kodierenden Region
5B.3	dritte miR-122-Bindungsstelle in der NS5B-kodierenden Region
A	Adenosin
Ago	Argonaute
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
bpp	<i>base pair probability</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	circa
Cap	m7-Gppp (am 5'-Ende der mRNA über eine 5'-5'-Bindung angefügtes 7-Methylguanosin)
CD81	Tetraspanin
CLDN1	Claudin-1
co	<i>complete</i> -Bindungsstelle
co-IP	co-Immunopräzipitation
CRE	cis-acting replication element
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
ddH2O	doppelt destilliertes Wasser
DLS	<i>dimer linkage sequence</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	<i>Envelope</i> Protein 1
E2	<i>Envelope</i> Protein 2
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EMCV	Encephalomyokarditis Virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	endosomal-sorting complex required for transport
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fötales Rinderserum)

FLuc	<i>Firefly</i> Luciferase
fwd	<i>forward</i> (vorwärts)
g	Gravitationskonstante
G	Guanin
GAG	Glycosaminoglycan
GTP	Guanosintriphosphat
h	<i>hour</i> (Stunde)
HCC	hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis C Virus
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i> (heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein)
IRES	<i>internal ribosome entry site</i> (interne Ribosomeneintrittsstelle)
ITAF	IRES-trans-aktivierender Faktor
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KH	K homolog
LB	Lennox Broth
LDL	Lipoprotein-Partikel
LDLR	<i>low-density lipoprotein receptor</i>
M	Molar
m7GpppN	7-methyl Guanosin
mA	Milliampere
mat	<i>mature</i> (reif)
Met-tRNAi	Methionin-beladene Initiator-tRNA
MFE	<i>minimum free energy</i>
min	Minute
miR-122*	Gegenstrang zur Herstellung von microRNA-Duplexen
miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimol/l
mRNA	<i>messenger-RNA</i> (Boten-RNA),
ms	Millisekunde
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NS	Nicht-Struktur-Protein
NSAP1	<i>mice minute virus NS1-associated protein 1</i>
nt	Nukleotide
OCLN	Occludin
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PABP	<i>Poly(A) binding protein</i>
PAZ	Piwi, Argonaute, Zwillie
<i>P-bodies</i>	<i>processing bodies</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pg	Picogramm
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
PIWI	<i>P-element induced wimpy testis</i>
PK	Pseudoknoten
PV	Poliovirus
PVDF	Polyvinylidenfluoride
py	Oligopyrimidin-Trakt
rev	<i>reverse</i> (rückwärts)

---

RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLuc	<i>Renilla</i> Luciferase
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonucleosidtriphosphat
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RRM	<i>RNA recognition motif</i> (RNA-Erkennungs-Motiv)
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit
S1	erste miR-122-Bindungsstelle in der 5'-UTR
S2	zweite miR-122-Bindungsstelle in der 5'-UTR
S3	miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR
SCARB1	Scavenger Rezeptor Klasse B Typ 1
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
se	<i>seed-target</i> -Sequenz
SL	<i>stem-loop</i>
SMN	<i>survival of motor neurons</i>
ss	<i>single strand</i> (Einzelstrang)
ssp	<i>single strand probability</i> (Einzelstrangwahrscheinlichkeit)
su	<i>supplemental</i> -Region
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-Essigsäure
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline</i> mit Tween20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFB	Transformations-Puffer
TRBP	<i>human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität), Uracil
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
UTP	Uridintriphosphat
UTR	<i>untranslated region</i> (nicht-translatierte-Region)
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
V	Volt
Vol.	Volumen
VR	variable Region
WB	Western Blot
WHO	<i>world health organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)
WT	Wildtyp
α	alpha
β	beta

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b> Modell des Hepatitis C Viruspartikels _____	2
<b>Abbildung 1.2:</b> Schema des HCV-Genoms _____	3
<b>Abbildung 1.3:</b> Sekundärstruktur der HCV-5'-UTR _____	5
<b>Abbildung 1.4:</b> Alternative sekundäre Struktur der 5'-UTR des HCV-Genoms _____	5
<b>Abbildung 1.5:</b> Sekundärstruktur der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR des HCV-Genoms _	6
<b>Abbildung 1.6:</b> Vermehrungszyklus von HCV _____	7
<b>Abbildung 1.7:</b> Schematische Darstellung der eukaryotischen Translationsinitiation _____	9
<b>Abbildung 1.8:</b> Zirkularisierung der mRNA _____	10
<b>Abbildung 1.9:</b> Schematische Darstellung der verschiedenen IRES-Typen _____	11
<b>Abbildung 1.10:</b> Schematische Darstellung der IRES-abhängigen Translationsinitiation bei HCV ____	12
<b>Abbildung 1.11:</b> IRES-trans-aktivierende Faktoren von HCV _____	13
<b>Abbildung 1.12:</b> Prozessierung von miRNAs _____	15
<b>Abbildung 1.13:</b> Schematische Darstellung des Ago2-Proteins _____	16
<b>Abbildung 1.14:</b> miR-122-Bindungsstellen im HCV-Genom _____	17
<b>Abbildung 1.15:</b> miR-122-Bindung an die HCV-RNA _____	18
<b>Abbildung 2.1:</b> Ausschnitt des Sequenzvergleichs für NS5B.2 _____	21
<b>Abbildung 2.2:</b> Ausschnitt des Sequenzvergleichs für NS5B.3 _____	22
<b>Abbildung 2.3:</b> Konservierung der Aminosäuren in der seed-target-Sequenz _____	23
<b>Abbildung 2.4:</b> Ausschnitt des Sequenzvergleichs für die miR-122-Bindungsstelle in der 3'-UTR ____	24
<b>Abbildung 2.5:</b> Erster Nachweis einer möglichen Hybridisierung des miR-122/Ago2-Komplexes an die miR-122-Bindungsstellen _____	28
<b>Abbildung 2.6:</b> HCV-RNA-Strukturen der miR-122-Bindungsstellen 5B.2a und 5B.3a für Con1 und J6-JFH1 _____	29
<b>Abbildung 2.7:</b> HCV-RNA-Strukturen der miR-122-Bindungsstellen S3a für Con1 und J6-JFH1 _____	30
<b>Abbildung 2.8:</b> Konservierte Sekundärstruktur um die miR-122-Bindungsstelle 5B.3 _____	31
<b>Abbildung 2.9:</b> HCV-RNA-Strukturen und co-IP-Experimente der miR-122-Bindungsstellen 5B.2b, 5B.3b und S3b _____	33
<b>Abbildung 2.10:</b> HCV-RNA-Strukturen und co-IP-Experimente der miR-122-Bindungsstellen 5B.2c und 5B.3c _____	35
<b>Abbildung 2.11:</b> Korrelation von Bindungsstärke und Zugänglichkeit der miR-122-Bindungsstellen für 5B.2, 5B.3 und S3 _____	38
<b>Abbildung 2.12:</b> Korrelation von Bindungsstärke und Zugänglichkeit der miR-122 Kern-Sequenz für 5B.2, 5B.3 und S3 _____	39

---

<b>Abbildung 2.13:</b> Korrelation von Bindungsstärke und Zugänglichkeit der miR-122-Bindungsstellen für 5B.2, 5B.3 und S3 unter Einbeziehung eines Adenosins _____	40
<b>Abbildung 2.14:</b> Korrelation von Bindungsstärke und Zugänglichkeit an die miR-122-Bindungsstelle 5B.2 in Abhängigkeit vom verwendeten Genotyp _____	42
<b>Abbildung 2.15:</b> co-IP-Experimente der mutierten HCV-RNAs mit den Bindungsstellen 5B.2m und 5B.3m _____	45
<b>Abbildung 2.16:</b> co-IP-Experimente der mutierten HCV-RNAs mit den Bindungsstellen S3 <sub>su</sub> m, S3 <sub>se</sub> m und S3 <sub>co</sub> m _____	46
<b>Abbildung 2.17:</b> Bindungsversuche der mutierten HCV-RNA 5B.2m und 5B.3m, transfiziert mit allen miR-122-Varianten _____	48
<b>Abbildung 2.18:</b> Bindungsversuche der mutierten HCV-RNA S3 <sub>se</sub> m und S3 <sub>co</sub> m, transfiziert mit allen miR-122-Varianten _____	49
<b>Abbildung 2.19:</b> Bindungsversuche der verschieden mutierten miR-122-Duplexe an die WT-miR-122-Bindungsstelle _____	51
<b>Abbildung 2.20:</b> Schematische Darstellung der verwendeten HCV-Reporter-RNAs _____	53
<b>Abbildung 2.21:</b> Translationsversuche von HCV-Reporter-RNAs mit mutierter miR-122-Bindungsstelle der 3'-UTR und Wildtyp-miR-122-Bindungsstelle der 5'-UTR _____	54
<b>Abbildung 2.22:</b> Translationsversuche von HCV-Reporter-RNAs mit mutierter miR-122-Bindungsstelle der 3'-UTR und mutierten miR-122-Bindungsstelle der 5'-UTR _____	56
<b>Abbildung 4.1:</b> Neubauer-Zählkammer _____	91

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1:</b> Menge des eingesetzten nicht-radioaktiv-markierten UTP in die in vitro-Transkription	26
<b>Tabelle 2.2:</b> single strand probability (ssp) und Bindungsstärke der kompletten miR-122-Bindungsstellen 5B.2, 5B.3, S3	36
<b>Tabelle 2.3:</b> Mutationen der miR-122-Bindungsstellen in der 5'-UTR, der NS5B-kodierenden Region und der 3'-UTR	44
<b>Tabelle 4.1:</b> Standard-PCR Programm	93
<b>Tabelle 4.2:</b> Standard-PCR Reaktionsansatz	93
<b>Tabelle 4.3:</b> Mutagenese-PCR Programm	94
<b>Tabelle 4.4:</b> Zusammensetzung eines denaturierenden Polyacrylamidgels	96
<b>Tabelle 4.5:</b> Standard-Transkriptionsansatz	99
<b>Tabelle 4.6:</b> Transkriptionsansatz radioaktiv-markierter RNA	99
<b>Tabelle 4.7:</b> co-IP-Antikörper	101
<b>Tabelle 4.8:</b> SDS-Polyacrylamidgel	102

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

### Publikation

Fricke, M., Dünnes, N., Zayas, M., Bartenschlager, R., Nipemann, M., Marz, M. (2015)  
Conserves RNA secondary structures and long-range interactions in Hepatitis C Viruses

### In Revision

Dünnes, N., Gerresheim, G. K., Nieder-Röhrmann, A., Fricke M., Hofacker, I., Marz, M.,  
Niepmann, M. (2016) microRNA binding to structured RNAs correlates with target site  
accessibility

### Eingereiche Manuskripte

Shalamova, L., Rossbach, O., Dünnes, N., Nieder-Röhrmann, A., Gerresheim, G. K., Mueller,  
S., Song, Y., Wimmer, E., Niepmann, M. (2016) Dissecting the requirements for Hepatitis C  
virus RNA synthesis using a split replication system

Nieder-Röhrmann, A., Dünnes, N., Gerresheim, G., Shalamova, L., Niepmann, M. (2016)  
Cooperative stimulation of Hepatitis C Virus RNA translation by microRNA-122/Argonaute2  
complexes

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und mich dabei unterstützt haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Friedhoff für die Übernahme der Betreuung im Fachbereich Biologie und Chemie der JLU Giessen und seine Unterstützung meiner Arbeit.

Ein weiteres Dankschön gilt meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Michael Niepmann am Fachbereich Humanmedizin der JLU Giessen. Danke für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und der Arbeitsmaterialien. Außerdem möchte ich ihm für seine stetige Diskussionsbereitschaft und seine Anregungen zur Problemlösung danken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der Truppe des IRTG, welche mir durch sehr schöne und interessante Tage in Moskau den Start in die Doktorarbeit und den Neubeginn in Giessen um einiges erleichtert haben. Und die weiteren Zusammentreffen in Giessen nicht zu vergessen ;-)

Außerdem möchte ich mich von Herzen bei meinen Freunden Anika, Carmen, Nils und Gesche bedanken, ohne sie wäre hier alles ein wenig.....anders gewesen :-P

Und natürlich bei all den anderen die wissen das sie gemeint sind!

Ein sehr großes Dankeschön gilt meiner Familie. Danke das ihr immer für mich da seid :-X

Zum Schluss möchte ich mich noch bei Constanze, Rüdiger, Theo, Berta, Hilde, Frederik, Andi, Clemens und Berthold bedanken ohne deren Durchhaltevermögen ich nie so weit gekommen wäre :-D

## Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre:

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

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Giessen, Juli 2016

Nadia Dünnes