

**Einfluss der RNA-Replikation des Hepatitis-C-Virus auf die
Expression des *vascular endothelial growth factor A***

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftliche Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Eileen-Christin Winkler,

geb. am 31.05.1984 in Leipzig

öffentlich verteidigt am 27.11.2017

Gutachter:

1. Prof. Dr. Sven-Erik Behrens
2. Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier
3. Prof. Dr. Norbert Tautz

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Phylogenetische Einordnung des Hepatitis-C-Virus	2
1.2	Morphologie des Hepatitis-C-Virus	2
1.3	Replikationszyklus des Hepatitis-C-Virus	3
1.4	Genomorganisation des Hepatitis-C-Virus	5
1.5	Verwendung von RNA-Replikons in der Hepatitis-C-Virus-Forschung	7
1.6	Funktionen zellulärer Proteine während der HCV-Infektion	8
1.6.1	Wirtsfaktoren des Hepatitis-C-Virus	8
1.6.2	Die Interferonantwort	8
1.6.3	Die Assemblierung von <i>stress granules</i>	12
1.6.4	Die Regulation der <i>VEGF</i> -Expression	13
1.7	Zielstellung	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien	16
2.2	Bakterienstämme, virale Replikons und humane Zellen	16
2.2.1	Kultivierung von prokaryotischen Zellen	17
2.2.1.1	Herstellung kompetenter Zellen	18
2.2.1.2	Transformation chemokompetenter Zellen	19
2.2.2	Kultivierung humaner Zellen	19
2.2.2.1	Transfektion von Plasmid-DNA in humane Zellen	20
2.2.2.2	Transfektion von RNA in humane Zellen	20
2.2.2.2.1	siRNA <i>design</i>	20
2.2.2.2.2	Transfektion von siRNA mittels Lipofectamin® RNAiMax-Reagenz	20
2.2.2.2.3	Transfektion von siRNA und viraler RNA mittel Elektroporation	21
2.2.2.3	Infektion und Transfektion von humanen Zellen mit MVA-T7 und pCite2a-Vektoren	21
2.2.2.4	Hemmung der zellulären RNA-Synthese (Actinomycin D-Assay)	22
2.2.2.5	Stressinduktion in eukaryotischen Zellen	22
2.2.2.6	Zellyse mittels Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Lösung (Trizol) oder Trypsin	22
2.3	Plasmide und Vektoren	23
2.4	Molekularbiologische Methoden zum Arbeiten mit DNA	23

2.4.1	Primer <i>design</i> _____	23
2.4.2	Quantitative <i>real time</i> -PCR (qRT-PCR) _____	23
2.4.3	Berechnung von mRNA-Halbwertszeiten _____	25
2.4.4	DNA-Sequenzierung _____	26
2.4.5	cDNA-Einzelstrangsynthese durch reverse Transkription _____	26
2.5	Molekularbiologische Methoden zum Arbeiten mit RNA _____	26
2.5.1	RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen _____	26
2.5.1.1	RNA-Reinigung über Phenol-Chloroform-Extraktion _____	27
2.5.1.2	RNA-Reinigung mit kommerziellen Systemen _____	27
2.5.2	<i>in vitro</i> -Transkription zur Herstellung von RNA _____	28
2.6	Proteinbiochemische Methoden _____	28
2.6.1	Verwendete Antikörper _____	28
2.6.2	Herstellung von Gesamtzelllysat und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen _____	28
2.6.3	Indirekte Immunfluoreszenz _____	29
2.6.4	Immunpräzipitation (IP) und Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) _____	30
2.6.5	Inkubation humaner Zellen unter Hypoxie und Verwendung des HIF1 α -Inhibitors _____	31
2.6.6	Massenspektrometrie _____	31
2.6.7	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) _____	32
2.6.8	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) _____	32
2.6.9	Immunoblot _____	33
2.7	Histochemie _____	34
2.8	Rekombinante Reinigung von TIA1vl aus <i>E.coli</i> _____	34
2.9	<i>in vitro</i> Phosphorylierungsstudien _____	34
2.10	<i>in vivo</i> Phosphorylierungsstudien _____	35
2.11	Statistik _____	36
3	Ergebnisse _____	37
3.1	Einfluss der HCV-Replikation auf die Expression verschiedener zellulärer Referenzgene _____	37
3.1.1	Verwendung von HCV- und WNV-Replikons _____	37
3.1.2	Einfluss der HCV-Replikation auf die mRNA-Synthese verschiedener zellulärer Referenzgene _____	41
3.1.3	VEGF-Proteinexpression in transient HCV-RNA replizierenden Zellen _____	44
3.1.4	HCV-assoziierte hepatozelluläre Karzinome zeigen eine erhöhte VEGF-Expression und Vaskularisierung _____	45
3.2	Posttranskriptionelle Regulation der VEGF-mRNA _____	47

3.2.1	Posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in transient HCV-RNA replizierenden Zellen _____	48
3.2.2	Regulation verschiedener Isoformen der VEGF-mRNA _____	53
3.2.3	Nicht alle zellulären mRNAs mit IRES-Struktur werden durch die HCV-Replikation posttranskriptionell stabilisiert _____	55
3.3	Einfluss viraler HCV-Proteine auf die Stabilisierung der VEGF-mRNA _____	57
3.4	Einfluss von Hypoxie auf die Stabilisierung der VEGF-mRNA _____	59
3.4.1	Hypoxie erhöht die VEGF-mRNA-Menge in naiven Huh7-Zellen _____	59
3.4.2	Einfluss von HIF1 α auf die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA _____	61
3.5	HCV-RNA-Replikation und Assemblierung von <i>stress granules</i> _____	64
3.5.1	Die HCV-RNA-Replikation induziert die Assemblierung von SGs in transient transfizierten Huh7-Zellen _____	64
3.5.2	Fehlende SG-Assemblierung in der persistenten HCV-Zelllinie ist nicht durch Modifikation der HCV-RNA bedingt _____	67
3.6	Depletion von SG-Komponenten beschleunigt den VEGF-mRNA-Abbau _____	69
3.7	Assemblierung von SGs in TIA1-depletierten Zellen, unter oxidativen Stress und der Replikation von WNV-RNA _____	72
3.8	Die Expression der kurzen Isoform von TIA1 induziert die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA _____	75
3.8.1	Die TIA1-mRNA-Menge in transient transfizierten Huh7-Zellen _____	76
3.8.2	TIA1vl lokalisiert nicht ausschließlich in SGs _____	76
3.8.3	Die Expression von FLAG-TIA1vl rekonstituiert die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie _____	79
3.8.4	Die Rekonstituierung der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie ist zeitabhängig _____	81
3.9	Überprüfung von TIA1 auf posttranslationale Modifikationen _____	83
3.9.1	Massenspektrometrische Untersuchungen von TIA1 _____	83
3.9.2	<i>in vitro</i> Phosphorylierung von TIA1vl _____	84
3.9.3	<i>in vivo</i> Phosphorylierung von TIA1 _____	85
3.10	Protein-Bindepartner von TIA1 _____	87
3.10.1	Identifikation TIA1vl-assoziiierter Proteine über Massenspektrometrie _____	88
3.10.2	Überprüfung von TIA1vl-assoziierten Proteinen auf eine Beteiligung an der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA _____	90

4	Diskussion	93
4.1	Die mit der HCV-Replikation assoziierte Regulation der Genexpression von VEGF	93
4.2	TIA1 als möglicher Faktor der posttranskriptionellen Genregulation in HCV-RNA replizierenden Zellen	101
4.3	Fazit und Ausblick	111
5	Zusammenfassung	116
6	Literaturverzeichnis	118
7	Anhang	138
7.1	Verwendete Materialien	138
7.2	Putative Bindepartner von FLAG-TIA1vl	142
Publikationsliste		145
Danksagung		146
Lebenslauf		147
Eidesstattliche Erklärung		148

Abkürzungsverzeichnis

Aus dem Englischen und Lateinischen übernommene Begriffe werden kursiv dargestellt. Komplexe zusammengesetzte Begriffe werden durch einen Bindestrich getrennt. Chemikalien, Enzymbezeichnungen, Maßeinheiten, die Nukleobasen (A, C, G, T), sowie Abkürzungen, die im Wörterbuch aufgelistet sind, sind nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Asparaginsäure	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glutaminsäure	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin			

2' - 5' -OAS	2' - 5'-Oligoadenylat-Synthetase	dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
5'-cap	m7GpppG am 5'-Ende von RNA	E	<i>envelope protein</i>
Abb.	Abbildung	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ad	lateinisch „zu“	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ADAR1	dsRNA-spez. Adenosin-Desaminase	eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
ANM5	<i>Protein arginine N-methyltransferase 5</i>	ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ATP	Adenosintri-phosphat	EMCV	Enzephalomyokarditis Virus
AU-reich	Adenin und Uracil reiche Sequenz	ER	Endoplasmatisches Retikulum
BHK21	<i>baby hamster kidney fibroblasts</i>	<i>et al.</i>	lateinisch et alia „und andere“
bp	Basenpaar	EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin	Fc	<i>fragment crystallisable</i>
BVDV	bovines Virusdiarrhö Virus	FCS	fötales Kälberserum
bzw.	beziehungsweise	FLAG-	Protein mit N-terminalem FLAG- <i>tag</i>
c	<i>core</i> -Protein	FLAG-<i>tag</i>	Aminosäuresequenz DYKDDDDK
cDNA	<i>complementary</i> DNA	FSME	Frühsommer-Meningo-Enzephalitis
cds	kodierende Sequenz	fwd	<i>forward</i> [Primer] (<i>sense</i>)
CIAP	<i>cytokine-induced apoptosis-inhibitor 1</i>	G418	Geneticin
c-myc	<i>V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>	G3BP1	<i>GTPase activating protein binding protein 1</i>
CSFV	Virus der klassischen Schweinepest	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
CT	Schwellenwert (<i>cycle threshold</i>)	GBV	GB-Virus
C-Terminus	Carboxy-Terminus	GFP	grün fluoreszierendes Protein
Cy2	Carbocyanin2	GND	replikationsdefizientes HCV-Replikon
Cyr61	<i>cysteine-rich angiogenic inducer 61</i>	GRP78	<i>glucose-regulated protein 78</i>
DAMP	<i>damage-associated-pattern</i>	GTP	Guanosintri-phosphat
DAPI	4,2-Diamino-2-phenylindol	H₂O <i>bidest</i>	bidestilliertes Wasser
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat	HCC	hepatozelluläres Karzinom
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat	HCV	Hepatitis-C-Virus
DENV	Dengue-Virus	HCV-mut	replikationsdefiziente Mutante des HCV-Replikons
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat	HCV-pers.	persistente HCV-Zelllinie
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle-Medium</i>	HDVr	Hepatitis-D-Virus-Ribozym
DMSO	Dimethylsulfoxide	HE	Hämatoxylin-Eosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	HeLa	Zelllinie aus Cervix-Tumorgewebe der Patientin <i>Henrietta Lachs</i>
DNase	Desoxyribonuklease	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtri-phosphate	HepG2	humane Leberkarzinom Zelllinie
ds	doppelsträngig	HIF1α/β	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α / β
DTT	Dithiothreitol	His-	Protein mit N-terminalem His- <i>tag</i>

hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>	MKP1	<i>MAP kinase phosphatase 1</i>
HRP	<i>Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)</i>	MOI	<i>multiplicity of infection</i>
Hsp70	<i>heat-shock cognate 71 kDa protein</i>	MOV10	<i>moloney leukemia virus 10 protein</i>
Huh7	<i>human hepatoma</i>	mRNA	<i>messenger RNA</i>
HuR	<i>embryonic lethal abnormal visual (ELAV) RNA-binding protein</i>	MVA-T7	<i>modified vaccinia ankara T7-polymerase</i>
ICTVdB	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>	NANBH	<i>non-A, non-B Hepatitis</i>
IF	<i>Immunfluoreszenz</i>	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
IFN	<i>Interferon</i>	NEAA	<i>non-essential amino acids</i>
IGF2BP	<i>insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein</i>	NEB	<i>New England Biolabs</i>
IgG	<i>Immunoglobulin G</i>	NEO	<i>Neomycin-Phosphotransferase II</i>
IL	<i>Interleukin</i>	NF90	<i>nuclear factor 90</i>
IP	<i>Immunpräzipitation</i>	NFAR	<i>nuclear factor associated with dsRNA</i>
IPS1	<i>induced by phosphate starvation 1</i>	NFκB	<i>Transkriptionsfaktor (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer')</i>
IPTG	<i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid</i>	NK	<i>Negativkontrolle</i>
IRES	<i>interne Ribosomenbindestelle</i>	NONO	<i>non-POU domain-containing octamer-binding protein</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>	NP-40	<i>Nonidet P-40</i>
ISG	<i>interferon stimulated genes</i>	NRF	<i>nuclear respiratory factor 1</i>
ISGF3	<i>interferon-stimulated gene factor 3</i>	NS	<i>Nichtstrukturprotein</i>
JAK	<i>Janus-Kinase</i>	nt	<i>Nukleotid</i>
JEV	<i>japanisches Enzephalitis-Virus</i>	N-Terminus	<i>Amino-Terminus</i>
JFH	<i>japanese fulminant hepatitis</i>	NTP	<i>Nukleosid-5'-Triphosphat</i>
LB	<i>Luria-Bertani</i>	OD	<i>optische Dichte</i>
LIV	<i>louping ill virus</i>	ORF	<i>offener Leserahmen</i>
LW6	<i>HIF1α-Inhibitor</i>	P	<i>statistischer Signifikanzwert</i>
M	<i>Marker (in grafischen Darstellungen)</i>	p.t.	<i>lateinisch post transfectionem</i>
MALDI-TOF/TOF	<i>Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Tandem-Flugzeit-Massenanalysator</i>	PABP1	<i>polyadenylate binding-protein 1</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	PAGE	<i>PAA-Gelelektrophorese</i>
MAVS	<i>mitochondrial antiviral-signaling protein</i>	PAMP/R	<i>pathogen-associated pattern/receptor</i>
MEP50	<i>methylosome protein 50</i>	PBS	<i>phosphatgepufferte Kochsalzlösung</i>
miRNA	<i>microRNA</i>	PCR	<i>Polymerasekettenreaktion</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>	siRNA	<i>short interfering RNA</i>
PEI	<i>Polyethylenimin</i>	ss	<i>einzelsträngig (single stranded)</i>

Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin	STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
PERK	<i>protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>	STAU1	<i>double-stranded RNA-binding protein staufen homolog 1</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration	STK38	Serin-/Threoninkinase 38
PKR	Proteinkinase R	T_{1/2}	Halbwertszeit
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	Tab.	Tabelle
poly(I:C)	Polyinosin:Polycytidin	TBEV	<i>tick-borne encephalitis virus</i>
poly-A	Polyadenylierung, angehängte Adenin-Nukleotide am 3'-Ende von prä-mRNAs	TCA	Trichloressigsäure
prM	prä-Membranprotein	TIA1	<i>T-cell intracellular antigen-1</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid	TIA1vl	kurze Isoform von TIA1
Q-rich	Glutamin-reiche Region	TIA1vlII	lange Isoform von TIA1
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> -PCR	TIAR	<i>TIA1 -related protein</i>
rATP	Adenosin-5'-Triphosphat	TLR3	<i>toll-like-receptor 3</i>
RBM10	<i>RNA-binding protein 10</i>	TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Methylglycin
RBP	RNA-Bindeprotein	tRNA	transfer-RNA
rCTP	Cytidin-5'-Triphosphat	TTP	Thymidintriphosphat
RdRp	RNA-abhängige-RNA-Polymerase	Tyk	Tyrosinkinase
rev	<i>reverse</i> [Primer] (<i>antisense</i>)	ün	über Nacht
rGTP	Guanidin-5'-Triphosphat	upm	Umdrehungen pro Minute
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene 1</i>	USA	<i>United States of America</i>
RKI	Robert-Koch-Institut	UTP	Uridin-5'-Triphosphat
RNA	Ribonukleinsäure	UTR	nichttranslatierte Region
RNase	Ribonuklease	v/v	Volumen pro Volumen
RNP	Ribonukleoprotein	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
rNTPs	Ribonukleotidtriphosphate	VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
RO60	<i>60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein</i>	VT	Volumenteil
ROS	<i>reactive-oxygen-species</i>	w/v	Gewicht pro Volumen
RRM	RNA-Erkennungsmotiv	WHO	<i>World Health Organization</i>
RT	<i>reverse</i> Transkription	WNV	West-Nil-Virus
rUTP	Uridin-5'-Triphosphat	WNV-mut	replikationsdefizientes WNV-Replikon
S10A9	<i>protein S100 Ca-binding protein-A9</i>	XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat	YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
SFPQ	<i>splicing factor, P- and Q-rich</i>	YFV	Gelbfieber-Virus
SFV	<i>semliki forest virus</i>	Δ	Delta
SG	<i>stress granules</i>		

1 Einleitung

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) ist ein leberspezifisches, durch Blut übertragbares Virus, dessen natürliche Wirte hauptsächlich der Mensch und höhere Primaten (Schimpansen) sind (WHO, 2016). Ist es in den Blutkreislauf gelangt, können in der Folge Leberentzündungen und -zirrhosen entstehen, aus denen sich auch hepatozelluläre Karzinome (HCC) entwickeln können (Modrow *et al.*, 2003). Da die Diagnose der Hepatitis meist erst nach Eintreten der ersten Leberschäden erfolgt und es jährlich zu drei bis vier Millionen Neuinfektionen kommt, besitzt HCV eine große pathologische Bedeutung (RKI, 2016; WHO, 2016; Esteban *et al.*, 2008). Bis 1989 wurde HCV als *non-A-non-B* Hepatitis (NANBH) bezeichnet und war nicht näher beschrieben. Sein Genom konnte erstmals bei der Untersuchung von *complementary* Desoxyribonukleinsäure-Bibliotheken (cDNA-Bibliotheken, gewonnen aus infiziertem Schimpansenblut) charakterisiert werden. Die darin kodierten Proteine wurden exprimiert und getestet, inwieweit diese mit NANBH-Patientenseren reagieren. Dies gestattete die Identifikation sowie Sequenzierung des HCV-Genoms (Choo *et al.*, 1989). Der spezifische Nachweis des Virus über reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde dadurch ermöglicht (Sarrazin *et al.*, 2010a). Die meisten HCV-Infektionen verlaufen inapparent und nur ein Fünftel der Infizierten weist eine Gelbfärbung der Augen oder Haut sowie grippeähnliche Symptome auf. Bei 55-85 % aller Infizierten kommt es zu persistierenden oder -reaktivierenden Hepatitiden. Nur in ca. 20 % der Fälle heilt die Erkrankung innerhalb von 6 Monaten von selbst aus, was jedoch nicht zu einer protektiven Immunität führt. Eine Impfung gegen HCV ist bisher nicht verfügbar (Modrow *et al.*, 2003; WHO, 2016; Gerlach *et al.*, 2003, Micallef *et al.*, 2006). Weltweit sind zwischen 130 und 150 Millionen Menschen chronisch an HCV-Infektionen erkrankt (WHO, 2016). Ein Viertel dieser Patienten entwickelt schwerwiegende Lebererkrankungen, wie chronische Hepatitiden oder Leberzirrhosen, die eine Lebertransplantation nötig machen. Dabei gehen weltweit 2/3 aller Lebertransplantate an HCV-geschädigte Personen (WHO, 2016; Marusawa *et al.*, 1999). Oftmals leiden die Patienten zusätzlich unter extrahepatische Manifestationen, wie Gelenkbeschwerden, Neuropathien sowie Nieren- und Schilddrüsenschäden (WHO, 2016; Wasley und Alter, 2000; Lavanchy, 2011). Die Therapieoptionen entwickeln sich stetig weiter. Ursprünglich wurde mit Ribavirin und pegyliertem Interferon- α behandelt, was häufig zu erheblichen Nebenwirkungen führte. Durch interferonfreie Therapieschemata können Nebenwirkungsprofile verträglicher gestaltet werden (Sarrazin *et al.*, 2010a/b; Sherman *et al.*, 2011; Degasperi und Aghemo, 2014). Diese Behandlungsmethoden beinhalten HCV-Proteaseinhibitoren, wie z.B. Boceprevir, Telaprevir und Simeprevir oder den Polymeraseinhibitor Sofosbuvir. Dennoch sterben jährlich bis zu 500.000 Menschen an HCV-bezogenen Lebererkrankungen (WHO, 2016).

1.1 Phylogenetische Einordnung des Hepatitis-C-Virus

Das Hepatitis-C-Virus gehört zur Familie der *Flaviviridae*, welche sich phylogenetisch in drei Gattungen unterteilt: *Flavivirus*, *Pestivirus* sowie *Hepacivirus*. Diese wurden anhand von Aminosäuresequenzhomologien festgelegt (Heinz *et al.*, 2000; Calisher und Gould 2003; Abb. 1). Die Gattung *Flavivirus* umfasst einige humanpathogene Viren, die Krankheiten wie Fieber, Enzephalitis oder hämorrhagisches Fieber verursachen (Lindenbach *et al.*, 2006). Sie stellt die größte Gattung dar und wird untergliedert in *mosquito-borne viruses* sowie *tick-borne viruses* (von Stechmücken bzw. Zecken übertragene Viren). Zu den Vertretern zählen beispielsweise das West-Nil-Virus (WNV) und das Gelbfieber-Virus sowie das *tick-borne* Enzephalitis-Virus (TBEV/FSME). Zur Gattung *Pestivirus* gehören vor allem tierpathogene Vertreter, wie das Virus der bovinen Virusdiarrhö (BVDV) und der klassischen Schweinepest (CSFV), welche eine große Bedeutung für die Viehwirtschaft haben (ICTVdB, 2002). Das Hepatitis-C-Virus ist der Gattung *Hepacivirus* zugeteilt und weist starke Polymorphismen auf. Es wird in 6 bekannte Genotypen (1-6) mit wiederum über 80 Subtypen (a, b,...) unterteilt (Simons *et al.*, 1995; Lindenbach *et al.*, 2006).

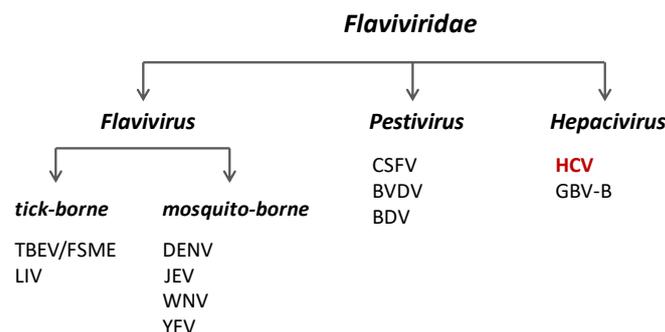


Abb. 1: Die Gattungen der *Flaviviridae*

Die Familie der *Flaviviridae* ist in 3 Gattungen unterteilt: *Flavivirus*, *Pestivirus* und *Hepacivirus*. Die Gattung *Flavivirus* wird in *tick-borne* (von Zecken übertragene) und *mosquito-borne* (von Stechmücken übertragene) Viren gegliedert. Zu letzteren gehören das Gelbfieber-Virus (YFV), das japanische Enzephalitis-Virus (JEV) und das Dengue-Virus (DENV) sowie das West-Nil-Virus (WNV). Zu den *tick-borne* Viren gehören das *louping ill virus* (LIV) sowie das *tick-borne* Enzephalitis-Virus (Frühsommer-Meningio-Enzephalitis) (TBEV/ FSME). Das Virus der bovinen Virusdiarrhö (BVDV), der klassischen Schweinepest (*classical swine fever virus*, CSFV) und das *border disease virus* (BDV) werden der Gattung *Pestivirus* zugeordnet. Die Gattung *Hepacivirus* umfasst das GB-Virus B (GBV-B) sowie das Hepatitis-C-Virus (HCV).

1.2 Morphologie des Hepatitis-C-Virus

Die *Flaviviridae* besitzen viele Gemeinsamkeiten hinsichtlich Morphologie, Genomorganisation und Replikationsstrategie. Sie vermehren sich im Zytoplasma der Wirtszelle bei einem pH-Bereich von 7-9. Die Virionen des HCV haben einen Durchmesser von 40 bis 70 nm (Wakita *et al.*, 2005) und sind von einer Lipid-Doppelschicht-Membran umgeben (Abb. 2). Diese Membran besteht aus Lipiden der ursprünglichen Wirtszelle mit zwei darin eingelagerten, viralen Glykoproteinen (E1 und E2, *envelope*). Diese sind am N-

Terminus glykosyliert und bilden ein Heterodimer. Verankert sind die Glykoproteine über eine C-terminale, hydrophobe Transmembran-Helix (Lindenbach *et al.*, 2006). Von der Lipidmembran eingeschlossen liegt das ikosaedrische Nukleokapsid, welches an der Verpackung des viralen Genoms beteiligt ist. Das Nukleokapsid selbst besteht aus einer multiplen Anzahl des basischen *core*-Proteins und ummantelt das einzelsträngige (ss), virale Genom. Dieses besteht aus Ribonukleinsäure (RNA) und weist eine positive Orientierung auf [(+)-Strang-RNA-Virus] (Lindenbach *et al.*, 2006; Modrow *et al.*, 2003).

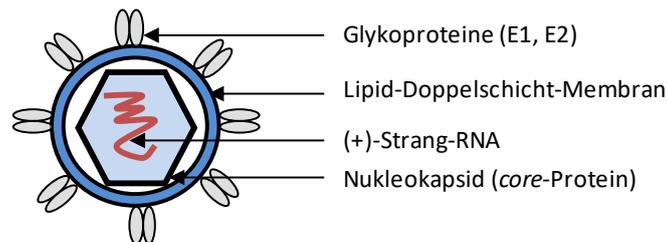


Abb. 2: Morphologie des HCV-Virions

Das Virion besteht, von seinem Inneren ausgehend, aus dem einzelsträngigen (+)-Strang-RNA-Genom, welches vom *core*-Protein eingeschlossen wird (Nukleokapsid). Dieses wird von einer doppelten Lipid-Membran mit eingelagerten Glykoproteinen (E1 und E2) umschlossen.

1.3 Replikationszyklus des Hepatitis-C-Virus

Der Replikationszyklus des Hepatitis-C-Virus (Abb. 3) beginnt mit der Bindung des Virions an die Wirtszelle über spezifische zelluläre Oberflächenrezeptoren wie zum Beispiel *cluster of differentiation 81 molecule* oder Claudin 1 (Pileri *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 2007). Durch Clathrin-vermittelte Endozytose erfolgt der Eintritt des Virions in die Zelle (Blanchard *et al.*, 2006). Der niedrige pH-Wert in den endosomalen Vesikel ermöglicht die Fusion der Virionhülle mit intrazellulären Membranen. Dies geschieht über Konformationsänderungen der Glykoproteine E1 und E2 (Koutsoudakis *et al.*, 2006; Tscherne *et al.*, 2006). Dabei kommt es zum *uncoating* des Virus, bei dem das Nukleokapsid zerfällt und die virale RNA direkt ins Zytoplasma entlassen wird. Die HCV-RNA besitzt am 5'-Ende der 5'-untranslatierten Region (UTR) keine *cap*-Struktur (m^7GpppG). Daher wird die Translationsinitiation durch einen *cap*-unabhängigen Mechanismus, über eine interne Ribosomenbindestelle (IRES, *internal ribosomal entry site*) vermittelt, ohne die Beteiligung der eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIF) 4B und 4F (Pestova *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 2010). Die virale Translation erfolgt in 5'-3'-Richtung am endoplasmatischen Retikulum (ER) im Zytoplasma der Zelle. Zunächst bindet die HCV-IRES direkt an die 40S-Untereinheit und bildet einen binären Komplex in der Nähe des Initiator Startcodons. Anschließend werden eIF3 und der ternäre Komplex aus eIF2 mit Guanosin-Triphosphat (GTP) sowie Initiator-Methionyl-tRNA ($Met-tRNA_i$) rekrutiert, um den 43S-Präinitiationskomplex zu bilden. Daraufhin lagert sich, in einem GTP-abhängigen und durch eIF5B vermittelten Schritt, die ribosomale 60S-Untereinheit

an, um den aktiven 80S-Komplex zu bilden (Otto *et al.*, 2004; Pestova *et al.*, 2000). Es wurde ebenfalls eine alternative eIF2-unabhängige Initiation beschrieben, bei der für die Assemblierung des 80S-Ribosoms lediglich GTP, Met-tRNA_i, eIF3 und eIF5B sowie die ribosomalen Untereinheiten 40S und 60S benötigt werden (Terenin *et al.*, 2008). Über diesen Mechanismus kann die Translation der HCV-RNA auch bei zellulären Stressbedingungen initiiert werden, wenn die eIF2-vermittelte Initiation durch Phosphorylierung der eIF2 α -Untereinheit inhibiert ist. Das entstandene Polyprotein wird ko- und posttranslational durch virale und zelluläre Proteasen in die Struktur- und Nicht-Strukturproteine prozessiert (Moradpour *et al.*, 2007; Abb. 3). Die gebildeten Strukturproteine sind für die Bildung neuer Virionen essentiell, die Nichtstrukturproteine (NS) für die virale Replikation und den Zusammenbau der Virionen (Lindenbach *et al.*, 2006). Die Replikation viraler RNA erfolgt in zytoplasmatischen, membrangebundenen Replikationskomplexen (Moradpour *et al.*, 2004; Lindenbach *et al.*, 2006). Die synthetisierte, virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) nutzt die (+)-Strang-RNA im ersten Replikationsschritt als Matrize und katalysiert die Synthese des (-)-Strang-RNA-Intermediats in 3'-5'-Richtung. Dieses wird im Weiteren zu Synthese neuer (+)-Strang-RNA verwendet, die als Virus-Genom in neue Viruspartikel verpackt wird. Diese neuen Viruspartikel werden im Lumen des ER assembliert und über Exozytose aus der Zelle freigesetzt (Lindenbach *et al.*, 2006).

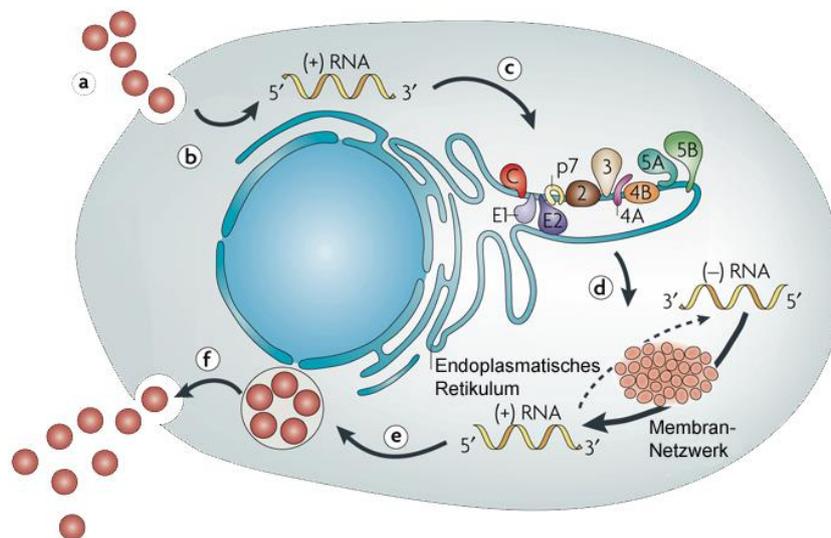


Abb. 3: Replikationszyklus des Hepatitis-C-Virus

Das Virion bindet an Oberflächenrezeptoren und wird über Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen (a). Über die Fusion der Virus-Lipidmembran mit internen zellulären Membranen erfolgt das *uncoating*, wodurch die virale (+)-Strang-RNA ins Zytoplasma entlassen wird (b). Durch IRES-vermittelte Translationsinitiation werden virale Proteine am rauen ER translatiert und mittels viraler und zellulärer Proteasen prozessiert (c). Das HCV-Genom wird für die Replikation in einen membrangebundenen Replikationskomplex rekrutiert. Aus der viralen (+)-Strang-RNA wird mittels der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase komplementäre (-)-Strang-RNA synthetisiert. Das (-)-Strang-RNA-Intermediat dient im zweiten Replikationsschritt als Matrize für die Synthese von (+)-Strang-RNA-Molekülen (d). Diese werden als virales Genom in neue Viruspartikel (Virionen) verpackt (e). Nach Reifung der Virionen werden diese in den extrazellulären Raum freigesetzt (f). (Abb. modifiziert nach Moradpour *et al.*, 2007)

1.4 Genomorganisation des Hepatitis-C-Virus

Das (+)-Strang-RNA-Genom des Hepatitis-C-Virus umfasst ungefähr 9,6 Kilobasen (kb). Es besteht aus einer ca. 340 Basenpaare (bp) langen 5'-UTR mit IRES-Struktur, gefolgt von einem ca. 9 kb langen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF). Daran schließt sich die ca. 230 bp umfassende 3'-UTR mit einer variablen poly(U/UC)-Region und einem konserviertem RNA-Element an, welches essentiell für die Replikation des Hepatitis-C-Virus ist (Kolykhalov *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 1996; Modrow *et al.*, 2003). Der ORF kodiert ein Polyprotein, welches ko- und posttranslational in Struktur- (N-terminal gelegen) und Nichtstrukturproteine (NS-Proteine; C-terminal gelegen) prozessiert wird (Major und Feinstone, 1997). Dies geschieht durch zelluläre Signalpeptidasen und virale Proteasen (Abb. 4). Das erste Strukturprotein innerhalb des ORF ist das prolinreiche *core*-Protein (C; 21 kDa) (McLauchlan *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2004). Es bildet das virale Nukleokapsid, welches das virale (+)-Strang Genom einschließt. Außerdem bilden ca. 40 Nukleotide der kodierenden Sequenz des *core*-Proteins zusammen mit Teilen der 5'-UTR die HCV-IRES. Durch eine Leserahmenverschiebung kommt es zur Bildung des F-Proteins (16 kDa), das an Regionen des ER zu binden scheint, dessen Funktion aber bisher noch unbekannt ist (Xu *et al.*, 2003; Vassilaki und Mavromara, 2009). Weitere Strukturproteine sind p7 und die *envelope* Glykoproteine E1 sowie E2. Die Glykoproteine lagern sich in die äußere Lipid-Doppelschicht-Membran ein und vermitteln die Bindung des HCV an die Wirtszelle. Zusammen mit dem *core*-Protein sind sie essentiell für die Bildung infektiöser Virionen. Das p7-Protein (7 kDa) ist ein Membranprotein und gehört zur Viporin-Proteinfamilie, welche selbstassemblierende Ionenkanäle in der Virushülle bildet (Griffin *et al.*, 2003; Pavlovic *et al.*, 2003; Luik *et al.*, 2009). Es ist entbehrlich für die Replikation (Lohmann *et al.*, 1999) jedoch essentiell für die Infektiosität *in vivo* (Sakai *et al.*, 2003; Steinmann *et al.*, 2007). Die Spaltung und Prozessierung der Strukturproteine erfolgt, nach Translokation in das ER-Lumen, mittels zellulärer ER-Signalpeptidasen. Die NS-Proteine sind hingegen an der viralen Replikation, dem Zusammenbau der Virionen und der Unterdrückung der wirtseigenen, angeborenen Immunantwort beteiligt (Lindenbach *et al.*, 2006; Brenndörfer *et al.*, 2012a/b). Zu ihnen gehören NS2, NS3, NS4A, NS4B sowie NS5A und NS5B. Deren Spaltung aus dem Polyprotein erfolgt im Zytoplasma mittels zweier viraler Proteasen (NS2/3, NS3/4A; Abb. 4). Das NS2-Protein ist eine Metalloprotease (23 kDa) und besitzt eine C-terminal gelegene Cystein-Autoprotease Domäne. Seine einzige bekannte Funktion ist die Spaltung der NS2/3 Bindung (Grakoui *et al.*, 1993a/b/c; Hijikata *et al.*, 1993; Lorenz *et al.*, 2006), welche für die HCV-Replikation und Infektiosität essentiell ist (Kolykhalov *et al.*, 2000; Welbourn *et al.*, 2005). Das NS3-Protein (70 kDa) besitzt mehrere Funktionen. Zum einen kodiert es N-terminal eine Serin-Protease, welche NS4A (8 kDa) als Kofaktor benötigt und für die Spaltung von NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A und NS5A/5B verantwortlich ist (Bartenschlager *et al.*, 1993; Manabe

et al., 1994; Pang *et al.*, 2002). Zum anderen kodiert es C-terminal eine RNA Helikase/NTPase Domäne, welche die Energie aus der NTP-Hydrolyse nutzt, um doppelsträngige (ds) Nukleinsäuren in 3'-5'-Richtung aufzuwinden (Caruthers und McKay, 2002).

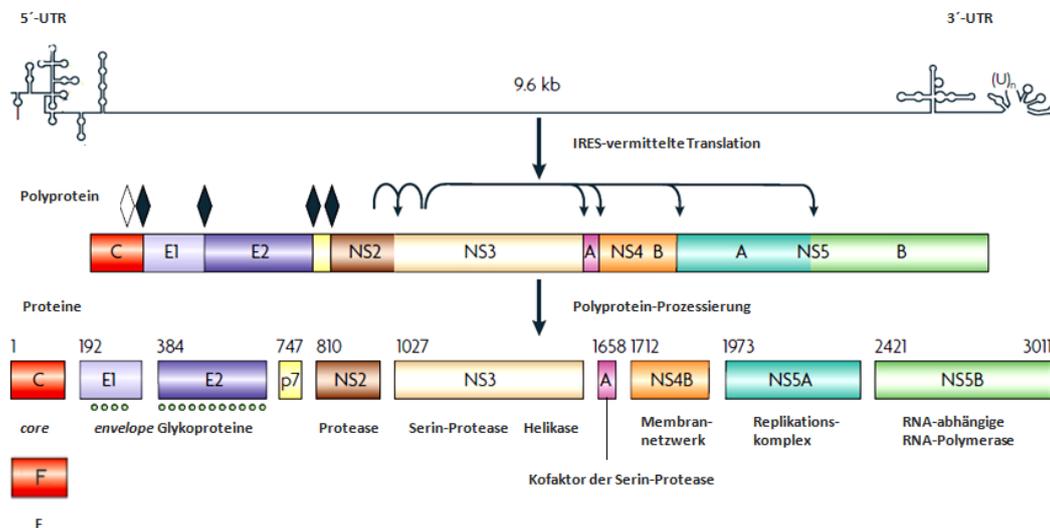


Abb. 4: Genomorganisation und Polyprotein-Prozessierung des Hepatitis-C-Virus

Das (+)-Strang-RNA-Genom des HCV (9,6 kb) besteht aus einer 5'-UTR mit IRES, einem einzelnen ORF, welches für Struktur- und Nichtstrukturproteine kodiert, sowie einer 3'-UTR. Das kodierte Polyprotein umfasst 3011 Aminosäuren. Es wird über IRES-vermittelte Translation synthetisiert und über virale (NS2/3, NS3/4A; Pfeile) und zelluläre Proteasen (Signal-Peptidasen des ER; Rauten) prozessiert. Zu den Strukturproteinen gehören das *core*-Protein (C), die *envelope*-Glykoproteine (E1, E2, glykosyliert (Kreise)) sowie das p7- und das F-Protein. Zu den Nichtstrukturproteinen gehören NS2 (Protease), NS3 (Serin-Protease und Helikase), NS4A (Kofaktor von NS2/NS3), NS4B (mit dem Membrannetzwerk assoziiert) sowie NS5A und NS5B (RNA-abhängige-RNA-Polymerase) (modifiziert nach Moradpour *et al.*, 2007).

Die Funktion des hydrophoben, integralen Membranproteins NS4B (27 kDa) ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass es eine Rolle bei der Organisation des Replikationskomplexes spielt, indem es die Bildung des Membrannetzwerkes initiiert (Hügler *et al.*, 2001; Egger *et al.*, 2002; Gosert *et al.*, 2003). In den Replikationskomplexen lokalisiert das hydrophile Phosphoprotein NS5A (58 kDa). Es ist für die Replikation von HCV essentiell (Gosert *et al.*, 2003; Lohmann *et al.*, 2001) und kann durch zelluläre Kinasen basal- oder hyperphosphoryliert werden (Reed *et al.*, 1997; Coito *et al.*, 2004). Dies kann sich auf die HCV-Replikationsrate auswirken (Lohmann *et al.*, 2001; Appel *et al.*, 2005). Eine Schlüsselfunktion im Replikationsprozess besitzt die RNA-abhängige-RNA-Polymerase (RdRp) NS5B, welche die Replikation am 3'-Ende der 3'-UTR *de novo* initiieren kann (Behrens *et al.*, 1996; Ivashkina *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2000). NS5B weist dabei keine Korrekturlesefunktion auf, wodurch es zu hohen Fehlerraten und der Entstehung von Quasispezies kommen kann. Auch innerhalb eines Wirts können sich so komplexe Viruspopulationen entwickeln, die das Immunsystem des Wirts unterlaufen und Resistenzen gegen antivirale Medikamente entwickeln können (Simmonds *et al.*, 1995; Domingo *et al.*, 1985).

1.5 Verwendung von RNA-Replikons in der Hepatitis-C-Virus-Forschung

Lange Zeit war es nur schwer möglich den Replikationszyklus von HCV zu untersuchen, da geeignete Zellkultursysteme fehlten. Die Entwicklung immortalisierter, humaner Leberzelllinien, wie Huh7 (*human hepatocellular carcinoma*; Nakabayashi *et al.*, 1982) aus Leberzelltumoren ermöglichte neue Anwendungsfelder in der HCV-Forschung. Diese Zelllinie stellt in Kombination mit Infektions-Systemen (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005) sowie RNA-Replikon-Systemen (Bartenschlager und Lohmann, 2000) das meistgenutzte Modell zur Untersuchung von HCV-Infektionen dar. Infektionsmodelle ermöglichen es unter anderem die Aufnahme des Virus in die Zelle bzw. die Freisetzung neu assemblierter Viruspartikel zu untersuchen. Zusätzlich wurde ein nicht infektiöses Replikon-System zur Untersuchung des viralen Translations- und RNA-Replikationsprozesses von HCV entwickelt (Lohmann *et al.*, 1999). Replikons sind RNA-Moleküle, die unabhängig von der Virionformation in transfizierten Zellen autonom replizieren (Khromykh und Westaway, 1997; Behrens *et al.*, 1998; Lohmann *et al.*, 1999). Sie kodieren alle Proteine und RNA-Elemente, die für eine vollständige Replikation notwendig sind. Der Prototyp eines solchen subgenomischen Replikons ist eine bicistronische RNA. Für seine Generierung wurde die kodierende Region der Strukturproteine, des p7-Proteins und des NS2-Proteins ersetzt durch die kodierende Region für Neomycin-Phosphotransferase II (NEO). Der Selektionsmarker NEO vermittelt eine Neomycin-/Geneticinresistenz (G418) und ermöglicht die Selektion von Zellen die aktiv HCV-RNA replizieren. Dadurch können auch persistente HCV-Zelllinien etabliert werden. Die Translation der NEO-RNA erfolgt über die HCV-IRES. Die Synthese der Nichtstrukturproteine NS3-NS5B wird über eine zweite, heterologe IRES aus dem Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV) initiiert (Lohmann *et al.*, 1999). Allerdings wiesen die ersten entwickelten Replikons in Huh7-Zellen eine geringe Replikationseffizienz auf. Adaptive Mutationen, die in der viralen RNA während des Selektionsprozesses akkumulierten steigerten die Replikationsrate jedoch deutlich (Blight *et al.*, 2003; Lohmann *et al.*, 2001/2003). Neben den ursprünglich entwickelten Replikon des HCV-Genotyps 1b konnten mittlerweile auch Replikons weiterer Genotypen etabliert werden (Blight *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2003a/b). Die HCV-RNA des Genotyps 2a wurde aus einem Patienten mit fulminanter Hepatitis isoliert und in das sogenannte JFH-Replikon (*japanese fulminant hepatitis 1*) integriert. Es ist in der Lage auch ohne adaptive Mutationen effizient in Huh7-Zellen zu replizieren (Kato *et al.*, 2003b). Da Tierexperimente aus ethischen und finanziellen Gründen so gut wie nicht umsetzbar sind, stellen Replikonsysteme eines der wichtigsten Werkzeuge dar, um den Replikationszyklus sowie Wirtsinteraktionen der *Flaviviridae* in Zellkultur-Experimenten nachzustellen und zu charakterisieren.

1.6 Funktionen zellulärer Proteine während der HCV-Infektion

Mit dem Hepatitis-C-Virus infizierte Hepatozyten produzieren ca. 10^{12} Virionen pro Tag (Neumann *et al.*, 1998). Da Viren jedoch aufgrund ihrer Genomgröße nur eine begrenzte Anzahl von Genen exprimieren können, wurden Strategien entwickelt, um zelluläre Faktoren in den viralen Vermehrungszyklus einzubinden.

1.6.1 Wirtsfaktoren des Hepatitis-C-Virus

Das Hepatitis-C-Virus verändert intrahepatische Genexpressionsmuster der Wirtszelle und rekrutiert zelluläre Proteine, um die virale Replikation und die Assemblierung neuer Virionen aufrecht zu erhalten sowie den Aufbau einer peripheren Toleranz der Wirtszellen zu ermöglichen (Hanahan und Weinberg, 2011; Ahlquist *et al.* 2003). Zelluläre Faktoren werden für die Translation, Prozessierung und Replikation der Struktur- und Nichtstrukturproteine des HCV bzw. seiner RNA benötigt. Dazu gehören zelluläre Proteasen für die Polyprotein-Prozessierung und im Zuge der viralen Replikation RNA-stabilisierende bzw. vor Degradation schützende Proteine. Zu ihnen gehören beispielsweise das *La-Autoantigen* (Spangberg *et al.*, 1999; Ali und Siddiqui, 1997) oder das *human vesicle-associated-membran-protein-associated-protein A*. Beide ermöglichen die Ausbildung von Replikationskomplexen durch Bindung von viralem NS5A und NS5B an *lipid rafts* aus intrazellulären Membranen (Tu *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2004). Weitere identifizierte Wirtsfaktoren gehören zur Gruppe der RNA-bindenden Proteine (RBPs), die an das Virus-Genom assemblieren können und deren Depletion meist zur Inhibition der viralen Replikation führt. Die Funktion von RBPs liegt bei (+)-Strang-RNA-Viren (z.B. HCV) meist in der Regulation der viralen Translation und der (-)-Strang-Synthese. Beide Prozesse müssen miteinander koordiniert werden, da die Replikation am 3'-Ende der (+)-Strang-RNA initiiert wird und entgegengesetzt zur Translation (5'-3'-Richtung) verläuft (Isken *et al.*, 2007; Shi und Lai, 2006). In diesem Zusammenhang wurden *cis*-aktive RNA-Elemente in der 5'- und 3'-UTR sowie zelluläre Faktoren identifiziert, die beim Wechsel von Translation zu Replikation involviert sind. So sind beispielsweise die NFAR (*nuclear factor associated with RNA*)-Proteine, wie der *nuclear factor 90* (NF90), vermutlich an der Zirkularisierung des viralen Genoms beteiligt, durch Bindung an dessen 3'- und 5'-UTR. (Isken *et al.*, 2003/2007; Grassmann *et al.* 2005; Ray und Das 2011; Kumar *et al.* 2013).

1.6.2 Die Interferonantwort

Neben der Rekrutierung von Wirtsfaktoren, wird bei viralen Infektionen auch die angeborene Immunantwort der Zelle induziert. Diese ist hauptsächlich für die entstehenden Zellschäden bei HCV-Infektionen verantwortlich, weil das HCV selbst kaum zytopathisch ist (Su *et al.*, 2002). Daher versucht das HCV die zelluläre Immunantwort zu

umgehen, um seine Persistenz zu sichern. Es unterläuft dabei das Immunsystem seines Wirtes durch Hemmung des Interferonsystems, Inhibierung der Antigenpräsentation und Regulierung der viralen Genexpression. Zusammen mit einer hohen Mutationsrate und der Entstehung von Quasispezies, durch die fehlende Korrekturlese-Funktion der RdRp (NS5B), wirkt das HCV antagonistisch auf die Antigenerkennung durch viruspezifische T-Lymphozyten ein (Steinhauer *et al.*, 1992; Simmonds *et al.*, 1995; Cerny und Chisari, 1999). Im Zuge der zellulären Immunantwort erkennt die infizierte Wirtszelle sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Zu ihnen gehören beispielsweise die bei der Replikation von HCV-RNA auftretende dsRNA-Bereiche bzw. poly-Uridin-Bereiche in der viralen 3'-UTR (Au *et al.*, 1995; Tuplin *et al.*, 2002; Saito und Gale, 2008; Stone *et al.*, 2013). Diese PAMPs werden durch zelluläre Sensor-Proteine, den *pathogen-associated molecular pattern-receptors* (PAMPR) detektiert. Diese molekularen Sensoren umfassen die membrangebundenen *toll-like* Rezeptoren (TLR) (Akira *et al.*, 2006; Iwasaki *et al.*, 2004) und zytoplasmatische Rezeptoren, wie das *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), die Protein Kinase R (PKR) oder das *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) (Kang *et al.*, 2002; Silvermann *et al.*, 2003; Yoneyama *et al.*, 2004/2007; Diebold *et al.*, 2003; McAllister und Samuel, 2009). Diese Rezeptorgruppen agieren in Hepatozyten unabhängig voneinander (Li *et al.*, 2005) und resultieren in der schnellen Produktion von Interferonen (IFN), welche zu den zentralen Komponenten der angeborenen Immunantwort gehören und als „erste Verteidigungslinie“ gelten (insbesondere IFN β) (Isaacs *et al.*, 1957a/b). Interferone werden zur Gruppe der Zytokine gezählt und agieren als Signalmoleküle. Sie können Effektorzellen des Immunsystems sowie umgebende Zellen beeinflussen. Die IFN β -Synthese erfolgt in zwei Phasen. In der ersten Phase (Induktionsphase) werden PAMPs durch die PAMPRs erkannt und die IFN β -Transkription induziert, wobei geringe Mengen IFN β produziert werden. Das gebildete IFN β wird von den Zellen sezerniert und bindet an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche von Nachbarzellen. Dadurch wird eine weitere Signalkaskade in Gang gesetzt und die zweite Phase der IFN β -Synthese (Effektorphase) eingeleitet. In der IFN β -induzierten Effektorphase werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche wiederum die IFN β -Transkription weiter verstärken (Abb. 5). Innerhalb der ersten Phase wird die HCV-RNA durch die Helikase RIG-I über die Triphosphat-Struktur am 5'-Ende der HCV-RNA sowie längere poly-Uridin-Motive in der 3'-UTR erkannt (Hornung *et al.*, 2006; Pichlmair *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2009; Schnell *et al.*, 2012; Yoneyama *et al.*, 2004; Sumpter *et al.*, 2005). Dabei findet eine Konformationsänderung und Multimerisierung des Rezeptors statt sowie die Aktivierung der IPS1-Signalkaskade (*interferon- β -promoter-stimulator 1*) an der Mitochondrien-assoziierten Membran. Die Transkriptionsfaktoren *nuclear-factor- κ -light-chain-enhancer* of activated B-cells (NF- κ B), *interferon regulatory factor 3* und *7* (IRF3, IRF7) werden über IPS1 aktiviert, welche wiederum die Genexpression Interferon sensibler Gene (ISG), zu denen auch Zytokine (z.B. IFN β) gehören, induzieren

(Der *et al.*, 1998; Malmgaard, 2004; Lin *et al.*, 2013). Andere PAMPRs, wie TLR3 oder PKR aktivieren die Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- κ B, hingegen über TRIF (*toll/interleukin-1-receptor-domain-containing adapter-inducing IFN β* ; TLR3) oder TRAF (*TNF-receptor-associated factor 1*; PKR). Dadurch wird ebenfalls vermehrt IFN β gebildet und sezerniert (Malmgaard *et al.*, 2004; Stark *et al.*, 1998; Loza und Perussia, 2004). Die Signalwege der Pathogenerkennung werden somit im Bereich der Transkriptionsfaktor-Aktivierung zusammengeführt. In der darauf folgenden Effektorphase (zweite Phase) bindet sezerniertes IFN β wiederum an einen heterodimeren Rezeptorkomplex an der Zelloberfläche (IFNAR). Dieser besteht aus *interferon- α/β receptor 1 and 2* (IFNAR1/2) und bindet Interferone des Typs I (IFN α , IFN β) (de Weerd *et al.*, 2007). An seine intrazellulären Domänen sind Tyrosinkinasen (TYK2, JAK1) der Januskinasefamilie (JAK) assoziiert. Die Bindung von IFN β an IFNAR resultiert in der gegenseitigen Aktivierung der Kinasen, wodurch eine *signal-transducers and activators of transcription* (STAT)-vermittelte Transkriptionsinduktion von interferonsensitiven Genen (ISGs) ausgelöst wird. Dabei werden die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 durch JAK1/TYK2 phosphoryliert und aktiviert. Daraufhin assemblieren mit dem Transkriptionsfaktor IRF9 zum *interferon-stimulated gene factor 3*-Komplex (ISGF3). Dieser transloziert sie in den Zellkern und bindet an die *interferon-stimulated response elements* der Zielgene, wodurch die Transkription von *interferon-stimulated genes* (ISGs) induziert wird (Bluyssen *et al.*, 1996; Darnell *et al.*, 1994; Haque *et al.*, 1994; Kessler *et al.*, 1990; Williams, 1991). Mehrere hundert Gene tragen diese spezifischen DNA-Sequenzen in ihren Promotoren und können über diesen Signalweg induziert werden. Dazu gehören unter anderem die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS), die Adenosin-Deaminase 1 (ADAR1), das Mx-Protein (*myxovirus resistance*) sowie Proteinkinase R (PKR) und der Transkriptionsfaktor IRF7 (Abb. 5) (Rebouillant und Hovanessian, 1999; Samuel, 2001; Clemens und Elia, 1997; Proud, 1995; Wathelet *et al.*, 1998; Marie *et al.*, 1999). IRF7 ist in der Lage an die IFN α - und IFN β -Promotoren zu binden und kann somit die Typ-I-Interferon abhängige Immunabwehr weiter modulieren (Marie *et al.* 1998, Sato *et al.* 1998/2000). Die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase wird hingegen, wie auch ADAR1 und PKR, durch die Detektion viraler dsRNA aktiviert. Sie katalysiert die Veresterung von Adenosin-Triphosphat (ATP) zu 2',5'-gebundenen Oligoadenylat. Diese binden an die im Zytoplasma vorkommende Endoribonuklease L (RNase L), welche virale und zelluläre RNA in nichtfunktionale Produkte degradiert (Rebouillant und Hovanessian, 1999; Janeway and Medzhitov 2002). ADAR1 hingegen wandelt durch hydrolytische Deaminierung (*RNA-editing*) posttranskriptionell die Adenosine der dsRNA in Inosine. Dadurch wird die dsRNA-Helix destabilisiert und die Inosine werden nachfolgend durch die Translationsmaschinerie als Guanodin gelesen. In kodierenden Bereichen kann dies zum Aminosäureaustausch und Funktionsverlust führen (Kim und Nishikura, 1993; Bass, 1997/2002).

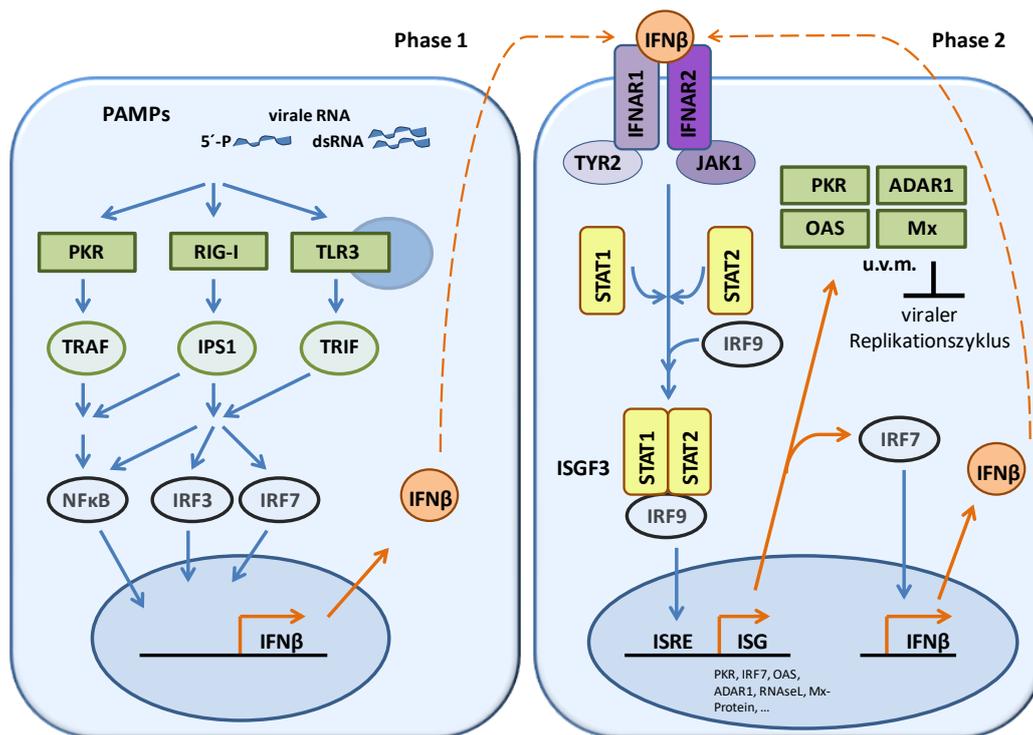


Abb. 5: Der Interferon- β -Signalweg

Der IFN β -Signalweg verläuft in zwei Phasen. Innerhalb der ersten Phase werden virale PAMPs, wie z.B. dsRNA durch entsprechende PAMP-Rezeptoren erkannt. Dazu gehören die zytoplasmatisch vorliegende PKR oder RIG-I oder membrangebundene TLRs. Durch die PAMP-Erkennung werden über verschiedene Signalproteine (z. B. TRAF, IPS1, TRIF) Transkriptionsfaktoren (IRF3, IRF7, NF κ B) aktiviert, die kooperativ an den Promotor des *IFN β* -Gens binden, wodurch dessen Transkription induziert wird. Das synthetisierte IFN β wird von den Zellen sekretiert und bindet in Phase zwei des IFN β -Signalwegs an die extrazellulären Domänen spezifischer IFN-Oberflächenrezeptoren (IFNAR1, IFNAR2). Die intrazellulären Domänen sind mit JAK-Kinasen assoziiert (TYR2, JAK1), welche die Phosphorylierung von STATs vermitteln (STAT1, STAT2). Die phosphorylierten STATs assoziieren daraufhin mit dem Transkriptionsfaktor IRF9 zum ISGF3-Komplex. Dieser transloziert in den Zellkern und stimuliert die Transkription verschiedener ISGs. Deren Produkte (z.B. PKR, OAS, Mx-Proteine, ADAR1) können als PAMP-Sensoren agieren und sind häufig an der Inhibition des viralen Replikationszyklus beteiligt. Im Zuge der Transkription von ISGs wird auch der Transkriptionsfaktor IRF7 gebildet, welcher verstärkend auf die Synthese von IFN β wirkt und so zu einer positiven Rückkopplung im IFN β -Signalweg führt.

Ein weiteres Sensorprotein des Immunsystems stellt die Serin-Threoninkinase PKR dar. Ubiquitär exprimierte PKR liegt normalerweise in einem inaktiven Zustand vor. Sie wird durch die Bindung an dsRNA, Heparin oder PACT (*interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A*) aktiviert (Galabru und Hovanessian, 1987; Hovanessian und Galabru, 1987; Patel und Sen, 1998). Dabei kommt es zur Dimerisierung, Autophosphorylierung und Konformationsänderung der PKR (Thomis und Samuel, 1995; Williams, 1999; Zamanian-Daryoush *et al.*, 2000). Die aktivierte PKR bindet und phosphoryliert daraufhin ihre natürlichen Substrate, wie die α -Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 (eIF2 α). Dadurch wird die Bildung des ternären Komplexes (eIF2-GTP-tRNA^{Met}) aus eIF2-GTP mit der Initiator-tRNA (tRNA^{Met}) verhindert und die *cap*-abhängige Translationsinitiation inhibiert. Begründet liegt dies darin, dass der phosphorylierte eIF2 α -GDP-Komplex eine höhere Bindeaffinität zu eIF2 β besitzt als die

unphosphorylierte Form, wodurch die Menge an freiem eIF2 β limitiert wird. Dadurch wird der Translations-Präinitiationskomplex blockiert (Kedersha *et al.*, 1999/2002; Hershey, 1991; Sudhakar *et al.*, 2000). EIF2 β gewährleistet sonst den Guanin-Nukleotid-Austausch zu eIF2 α -GTP, welcher jedoch nur am unphosphorylierten eIF2 α -GDP erfolgen kann. Die Synthese antiviraler ISGs wird somit ebenfalls inhibiert, was die Effizienz der viralen RNA-Replikation unterstützen kann (Garaigorta and Chisari, 2009). Darüber hinaus wirkt PKR in der Transkriptionsregulation, z.B. durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (Kumar *et al.*, 1994; Su *et al.*, 2007) und in der Induktion von Apoptose über Serin-Threoninkinase-abhängige Signalwege (Gil und Esteban, 2000).

1.6.3 Die Assemblierung von *stress granules*

Die Phosphorylierung von eIF2 α spielt neben der Inhibierung der *cap*-abhängigen Translationsinitiation auch bei der Assemblierung von sogenannten *stress granules* (SG) eine entscheidende Rolle (Anderson und Kedersha, 2002a/b). SGs sind 50-200 nm große, dynamische, zytoplasmatische Strukturen, die den blockierten Translations-Präinitiationskomplex enthalten (Beckham und Parker, 2008). Die Aggregation von SGs geht mit der Limitierung des eIF2-GTP-tRNA^{Met}-Komplexes einher. Dies führt zum translationalen Arrest von *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) und deren Lagerung in 48S-Komplexen, die sich zu SGs zusammenfügen (Kedersha *et al.*, 1999/2000; Anderson und Kedersha, 2006). SGs sind durch die Anwesenheit zellulärer mRNAs, Translationsinitiationsfaktoren (z.B. eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF4B, eIF3) und RBPs sowie der kleinen ribosomalen Untereinheit (48S) charakterisiert. Eine Theorie ist, dass dort die mRNAs gespeichert und vor Abbau geschützt werden, damit nach Abklingen des Stress auslösenden Moments ein Reservoir an mRNAs zur Verfügung steht, das der Translation zugeführt werden kann (Anderson und Kedersha, 2006). Die Assemblierung von SGs wurde bereits im Zusammenhang mit verschiedenen Virusinfektionen beschrieben (z.B. Poliovirus, HCV) (White *et al.*, 2007; Garaigorta *et al.*, 2012). Somit spielen SGs wahrscheinlich eine entscheidende Rolle beim Metabolismus zellulärer und viraler RNA. Die Rekrutierung viraler RNA in translational stillgelegte *messenger* Ribonukleoproteine (mRNPs), die in SGs aggregieren, würde einer erfolgreichen Virusinfektion jedoch entgegenwirken. Daher haben Viren Methoden entwickelt, um die SG-Assemblierung zu hemmen. Nachdem die Assemblierung von SGs in frühen Infektionsstadien zunächst durch die Phosphorylierung von eIF2 α ausgelöst wurde, wird diese in späteren Stadien häufig durch das Virus reprimiert (White und Llyod, 2012). Ein Beispiel hierfür ist das Poliovirus, welches das zelluläre *GTPase-activated protein-binding protein 1* (G3BP1), durch die virale 3C-Protease, proteolytisch spaltet und so die Kolokalisation von SG-Komponenten limitiert. Dabei gilt G3BP1 als eine der Hauptkomponenten von SGs (White *et al.*, 2007). Weitere bekannte Komponenten von SGs sind das *T-cell restricted*

intracellular antigen 1 (TIA1), das *TIA1 related protein* (TIAR) und das *insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1* (IGF2BP1), die als Marker der SG-Bildung verwendet werden (Tourrière *et al.*, 2003; Gilks *et al.*, 2004). Einige andere Viren, wie das Dengue-Virus oder West-Nil-Virus rekrutieren SG-Komponenten als Wirtsfaktoren der viralen Replikation (Emara und Brinton, 2007; Emara *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2002). Das Hepatitis-C-Virus induziert ebenfalls die Assemblierung von SGs (Garaigorta *et al.*, 2012; Ruggieri *et al.*, 2012). Während der viralen Infektion oszillieren die SGs, das heißt sie werden dynamisch assembliert und disassembliert. Möglicherweise wird dadurch die virale und zelluläre Genexpression zwischenzeitlich ermöglicht. Zudem wird darüber spekuliert, ob durch SGs auch verschiedene Komponenten apoptotischer Signalwege sequestriert werden (Jones *et al.*, 2010; Ruggieri *et al.*, 2012). Beides wäre von Vorteil für das Virus und würde vermutlich langfristig die virale Replikation und das Überleben der Wirtszelle gewährleisten (Arimoto *et al.*, 2008). Die genaue Regulation der SG-Assemblierung während RNA-Virus-Infektionen ist sehr komplex und noch nicht endgültig geklärt. Die Assemblierung von SGs besitzt einen auf verschiedenen Ebenen potentiell antiviralen Charakter. Einerseits sequestrieren SGs Translationsinitiationsfaktoren und die ribosomale 40S-Untereinheit der Wirtszelle, welche auch viele Viren für die Translation ihrer viralen Transkripte benötigen, andererseits werden innerhalb von SGs auch IRES-transaktivierende Faktoren, wie PTB (*polypyrimidine-tract-binding protein*) und PCBP2 (*poly(rC)-binding protein 2*) gebunden, welche z.B. von Picornaviren für eine effiziente IRES-vermittelte Translation benötigt werden (White und Lloyd, 2011; Fujimura *et al.*, 2008). Desweiteren können vermutlich auch zelluläre RNA-Bindeproteine, die als Wirtsfaktor der viralen Replikation agieren, in SGs zwischengelagert werden, da sie häufig an stillgelegte mRNPs gebunden sind (Emara und Brinton, 2007; Ariumi *et al.*, 2011).

1.6.4 Die Regulation der VEGF-Expression

Neben diesen Mechanismen können im Zuge einer HCV-Infektion auch die Expressionsmuster anderer zellulärer Gene beeinflusst werden. Dazu gehören Wachstumsfaktoren wie der *vascular endothelial growth factor A* (VEGF) (Daum *et al.*, 1994). Eine zentrale Rolle spielt VEGF bei der Versorgung von Geweben mit Sauerstoff und Nährstoffen durch seine Funktion bei Angiogenese und Neovaskularisierung (Ferrara und Bunting, 1996). Durch entsprechende Stimuli wird vermehrt VEGF synthetisiert und von den Zellen sezerniert. Dieses bindet daraufhin an spezifische VEGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wodurch z.B. Prozesse ausgelöst werden, die zur gezielten Bildung von Blutgefäßen führen (Leung *et al.*, 1989; Neufeld *et al.*, 1994). Von besonderer Bedeutung ist dies bei der Entwicklung von Tumorgewebe. Da die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen nur über kurze Distanzen gewährleistet werden kann, ist es für dessen Wachstum essentiell, dass neue Blutgefäße gebildet werden (Ferrara und Bunting, 1996; Folkman, 1985; Hanahan und Folkman, 1996). In verschiedenen

Tumorarten (z.B. Lungenkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs oder Brustkrebs) konnte bereits eine verstärkte VEGF-Expression nachgewiesen werden (Ohta *et al.*, 1996; Salven *et al.*, 1998; Gasparini, 2000; Carmeliet *et al.*, 2005). Da es bei HCV-Infektionen häufig auch zu chronischen Manifestationen kommt, die von der Entstehung hepatozellulärer Karzinome begleitet sein können, ist hier die Regulation von VEGF ebenfalls von großer Bedeutung. Neben Funktionen bei der Vaskularisierung und Angiogenese im Zuge der Kanzerogenese hat VEGF jedoch auch eine Bedeutung bei anderen zellulären Prozessen. Dazu gehört beispielsweise die Proliferation des Endothels, die Regulation der Zellpermeabilität sowie die Embryonalentwicklung und Wundheilung (Shweiki *et al.*, 1992; Leung *et al.*, 1989; Neufeld *et al.*, 1994; Carmeliet *et al.*, 1996; Larcher *et al.*, 1998; Ferrara *et al.*, 1996; Nissen *et al.*, 1998). Die Expression von VEGF kann dabei über verschiedene Faktoren stimuliert werden. Abgesehen vom Hypoxie-induzierten Signalweg können auch Hypoglykämie oder Zytokine die VEGF-Expression beeinflussen (Shweiki *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 1996). Reguliert wird VEGF dabei auf verschiedenen Ebenen. Neben der Regulation von Transkription und Translation spielen auch die Mechanismen des alternativen Spleißens sowie die Stabilisierung oder Destabilisierung über RNA-Bindeproteine bzw. *micro*-RNAs eine wichtige Rolle (Cohen *et al.*, 1996; Neufeld *et al.*, 1999; Akiri *et al.*, 1998; Levy *et al.*, 1998; Dibbens *et al.*, 1999; Shima *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 1995; Hua *et al.*, 2006; Arcondeguy *et al.*, 2013). Die Regulation von VEGF unter hypoxischen Bedingungen, wie sie auch in Tumorgeweben vorkommen, ist bereits umfänglich untersucht worden. Die Transkription des *VEGF*-Gens wird in hypoxischen Zellen durch den Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor 1* (HIF1) induziert (Forsythie *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1995/2002). Dieser besteht aus den Untereinheiten HIF1 α und HIF1 β . Unter normoxischen Bedingungen wird HIF1 α proteosomal abgebaut. Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF1 α jedoch stabilisiert und transloziert in den Zellkern, wo es mit der HIF1 β -Untereinheit dimerisiert (Forsythie *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1998; Tsuzuki *et al.*, 2000). Der HIF1 α / β -Komplex (HIF1) agiert als Transkriptionsfaktor und bindet an das *hypoxia-response-element* des *VEGF*-Gens (Forsythie *et al.*, 1996; Tsuzuki *et al.*, 2000). Da auch persistierende HCV-Infektionen zur Entstehung hepatozellulärer Karzinome führen können, überrascht es nicht, dass in HCV-infizierten Zellen bereits eine Stabilisierung des HIF1- α -Proteins und somit eine Stimulation der VEGF-Synthese nachgewiesen werden konnte (Nasimuzzaman *et al.*, 2007; Abe *et al.*, 2012; Ripoli *et al.*, 2010; Hassan *et al.*, 2009). Nasimuzzaman und Kollegen beschrieben 2007 beispielsweise die Aktivierung und Stabilisierung der HIF1 α -Untereinheit in Huh7-Zellen, die mit dem *full-length* HCV-Genom oder HCV-Replikons transfiziert wurden. Dies führte zu einer erhöhten Expression und verstärkten Sekretion von VEGF. Vermittelt wird dies vermutlich durch eine Störung der Kalzium-Homöostase, welche bei der HCV-Genexpression entsteht, wodurch wiederum oxidativer Stress induziert wird. An der Stabilisierung der HIF1 α -Untereinheit beteiligt sind außerdem

zelluläre Kinasen, wie die Proteinkinase-B, die *p42/44-mitogen-activated protein kinase* sowie die Transkriptions-faktoren NF κ B und STAT3. Da die Experimente unter normoxischen Bedingungen durchgeführt wurden, ist davon auszugehen, dass das HCV hypoxieartige Effekte imitiert, um die VEGF-Synthese zu stimulieren (Nasimuzzaman *et al.*, 2007). In anderen Studien wurde das HCV-core-Protein als Faktor identifiziert, welcher über den HIF1 α -Weg die VEGF-Synthese stimulieren soll (Abe *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2009).

1.7 Zielstellung

Unter dem Einfluss einer Hepatitis-C-Virus Infektion werden eine Vielzahl zellulärer Proteine beeinflusst, die den Stoffwechsel der Wirtszelle zu Gunsten des Virus verändern oder direkt in den Vermehrungszyklus des Virus eingreifen (He, 2006; Carney und Gale, 2006). In diesem Kontext sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation der Einfluss der HCV-RNA-Replikation auf die Genexpression der Wirtsfaktorkandidaten *nuclear factor 90* (NF90), *mitogen-activated protein kinase phosphatase 1* (MKP1) und *vascular endothelial growth factor A* (VEGF) untersucht werden. Die geschah unter Verwendung es HCV-Replikonsystems (JFH1, Genotyp 2a) (Lohmann *et al.* 1999; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005; Lindenbach *et al.*, 2005). Die Auswahl dieser Wirtsfaktorkandidaten orientierte sich an Literaturangaben, denen zufolge, diese Faktoren im Zuge von Virusinfektionen oder zellulärem Stress auf transkriptioneller und translationaler Ebene reguliert werden (Wen *et al.* 2014; Kuwano *et al.*, 2008; Nasimuzzaman *et al.*, 2007). Erste Untersuchungen zeigten einen deutlichen Einfluss der HCV-Replikation auf die VEGF-Transkription. VEGF-mRNA lag in Zellen, die HCV-RNA replizieren, in erhöhter Quantität vor. Auswirkungen der HCV-Replikation auf die anderen Wirtsfaktorkandidaten waren nicht zu beobachten. Zudem konnte erstmals eine erhöhte Halbwertszeit der VEGF-mRNA in transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Sie wurde posttranskriptionell stabilisiert. Da VEGF einen wichtigen Faktor der endothelialen Zellproliferation und Neovaskularisierung darstellt (Shweiki *et al.*, 1992; Hanahan und Folkman, 1996), ist es vermutlich auch an der Entstehung hepatozellulärer Karzinome (HCC) beteiligt. Vor diesem Hintergrund sollte der molekulare Mechanismus charakterisiert werden, durch welchen die Halbwertszeit der VEGF-mRNA in Zellen, die transient mit dem HCV-Replikon transfiziert wurden, erhöht wird. Dabei sollten beteiligte Proteine identifiziert und verschiedene molekulare Mechanismen untersucht werden, die zur posttranskriptionellen Stabilisierung von VEGF-mRNA beitragen können.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Diagonal (Münster, Deutschland), Life Technologies (Carlsbad, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (St.Louis, USA), ThermoFisher Scientific (Waltham, USA), Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), Roche (Mannheim, Deutschland), New England Biolabs (NEB, Ipswich, MA, USA), GIBCO® life technologies™ (Carlsbad, CA, USA), PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland), BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland) und Th. Geyer (Renningen, Deutschland) bezogen, soweit nicht anders angegeben. Bei Nutzung kommerziell erhältlicher Produkte wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

2.2 Bakterienstämme, virale Replikons und humane Zellen

Für Untersuchungen mit Hilfe von prokaryotischen Zellen wurde zur Transformation und Anzucht genkodierender Plasmide (siehe 2.2.1; 2.2.1.1; 2.2.1.2) TOP10-Zellen (F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ -, life technologies™, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Für Experimente mit eukaryotischen Zellen wurden in dieser Arbeit die humanen Zelllinien Huh7 (*human hepatocellular carcinoma*), welche aus Lebertumor-Gewebe gewonnen (Nakabayashi *et al.*, 1982) und freundlicherweise von Prof. Dr. Bartenschlager (Universität Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden, sowie Huh7-JFH1-Zellen verwendet. Huh7-JFH1-Zellen sind Huh7-Zellen, die persistent mit einem bicistronischen HCV-Replikon des Genotyps 2a (JFH, *japanese fulminant hepatitis*) mittels Elektroporation transfiziert wurden (siehe 2.2.2.3). Sie werden im Folgenden als HCV-pers. bezeichnet. Anschließend erfolgte die Kultivierung der transient transfizierten Zellen in Geneticin-haltigem DMEM (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*), zur Selektion HCV-RNA replizierender Zellen. Das Antibiotikum Geneticin wird durch die im HCV-Replikon kodierte Neomycin-Phosphotransferase II inhibiert. Zellen ohne funktionales Replikon sterben ab. Die Generierung der persistenten HCV-Zelllinie erfolgte durch Dr. René Geißler (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland) unter Verwendung der Huh7-Zelllinie. Das bicistronische, subgenomische HCV-Replikon des Genotyps 2a (JFH) wurde erstmals 2003 beschrieben (pSGR-JFH1; NCBI: AB114136) und wird im Folgenden als HCV-Replikon bezeichnet. Es handelt sich dabei um virales HCV-Material aus dem kein infektiöses Virus gebildet werden kann, da bis auf einen Teil des *core*-Proteins (Δ *core*) die zur Assemblierung der Virushülle notwendigen Strukturprotein-kodierenden Bereiche deletiert sind. Die effiziente Replikation ist jedoch gewährleistet, da alle RNA-Elemente

und Protein-kodierenden Sequenzen enthalten sind, um eine autonome RNA-Replikation zu gewährleisten (Kato *et al.*, 2001/2003a/2005). Es besteht aus der 5'-UTR, den NS-Proteine kodierenden Bereichen sowie der 3'-UTR und einer Neomycin-/Geneticin-Kassette, welche unter der Kontrolle der HCV-spezifischen, internen Ribosomenbindestelle (IRES) steht. Die Translation der NS-Proteine wird durch die IRES des Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV) vermittelt. Neben dem HCV-Replikon wurde das monocistronische West-Nil-Virus-Replikon (im Folgenden als WNV-Replikon bezeichnet) verwendet. Dieses basiert auf einem WNV-Virus, welches aus einer Krähe isoliert wurde (NY2000-crow3356; Shi *et al.*, 2002). Es ist ähnlich aufgebaut und enthält ebenfalls die NS-Protein kodierenden Bereiche sowie die UTRs des West-Nil-Virus. Der Großteil der Strukturproteine ist deletiert. Die Translation ist *cap*-abhängig (Shi *et al.*, 2002). Das ursprünglich etablierte, replikonkodierende Plasmid wurde aus viraler RNA generiert, die aus einem infizierten Patienten gewonnen wurde. Das virale RNA-Genom wurde *in vitro* mittels spezifischer Primer und reverser Transkriptase über RT-PCR in mehrere cDNA-Fragmente umgeschrieben. Dabei wurden die cDNA-Fragmente über die Primersequenz mit Restriktionsschnittstellen versehen, die eine Klonierung in Plasmide ermöglichen und eine T7-Polymerase-Erkennungssequenz eingefügt. Diese ermöglicht die *in vitro*-Transkription der cDNA in virale RNAs für die Transfektion (siehe 2.2.2.2.3; 2.5.2). Die cDNA-Fragmente wurden in entsprechende Plasmide als subgenomisches Replikon kloniert. Die in dieser Arbeit verwendeten HCV- bzw. WNV-Replikons besitzen am 3'-Ende ein Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym (HDVr). Dieses RNA-Molekül, mit katalytischer *self-cleavage*-Funktion, erzeugt nach Abspaltung des Ribozyms ein einheitliches, natives 3'-Ende. Dies steigert die Effizienz der Replikation (Tilgner und Shi, 2004; Been und Wickham, 1997). Von beiden Replikons wurden auch replikationsdefiziente Varianten verwendet, die jeweils eine Punktmutation in der für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) kodierenden Sequenz enthalten. Das replikationsdefiziente HCV-Replikon wird im Folgenden als HCV-mut bezeichnet und besitzt eine Punktmutation der Aminosäure 318 im NS5B-kodierenden Bereich (Asparaginsäure zu Asparagin). Das replikationsdefiziente WNV-Replikon (im Folgenden als WNV-mut bezeichnet) besitzt eine Punktmutation in der Aminosäure 669 von Asparaginsäure zu Alanin der NS5-kodierenden Sequenz. Die Generierung, der in dieser Arbeit verwendeten, Replikon-kodierenden Plasmide erfolgte durch Dr. René Geißler und Dr. Susann Friedrich (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland).

2.2.1 Kultivierung von prokaryotischen Zellen

Zur Kultivierung von prokaryotischer *Escherichia coli*-Stämmen (*E. coli*) wurde Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) mit entsprechender Antibiotikazugabe und Medienzusätzen in beschriebener Konzentration zur Selektion verwendet (Sambrook *et*

al., 1989). Die Zellen wurden in sterilen Reagenzgläsern und Erlenmeyerkolben in 1/5 Gefäßvolumen Flüssigmedium angezogen und aerob und schüttelnd bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Zellwachstum wurde als Optische Dichte (OD₆₀₀) mit einem Spektrophotometer gegen unbeimpftes Medium gemessen. Regulär erfolgte die Anzucht über Nacht, mindestens jedoch für 14 h. Zur Ernte wurden die Zellen zentrifugiert und das überstehende Medium verworfen. Das LB-Medium für Flüssigkultur wurde vor Verwendung und Zugabe der Medienzusätze steril autoklaviert (121 °C; 1,3 bar; 20 min).

LB-Medium:

10 g Bacto™-Trypton
 10 g NaCl
 5 g Bacto™-Yeast extract
 ad 1 l H₂O_{bidest}

Medienzusätze:

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden mittels Spritzenfilter steril filtriert und bei -20 °C gelagert bis zur Zugabe zu den sterilen Medien in den in Tabelle 1 aufgeführten Endkonzentrationen.

Tab. 1: Antibiotika zur Kultivierung prokaryotischer Zellen

Antibiotika/Medienzusatz	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 g/l in H ₂ O _{bidest} (286 mM)	100 mg/l (286 µM)
Kanamycin	50 g/l in H ₂ O _{bidest} (103 mM)	50 mg/l (103 µM)
Chloramphenicol	20 g/l in Ethanol _{absolut} (62 mM)	20 mg/l (62 µM)
IPTG	24 g/l in H ₂ O _{bidest} (100 mM)	240 mg/l (1 mM)

2.2.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde die Rubidiumchlorid-Methode nach Sambrook *et al.* 1989 verwendet sowie TOP10-Zellen (F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galk16 rpsL(StrR) endA1 λ-). Zunächst wurde eine Vorkultur des zu transformierenden Stammes angezogen. Von dieser Kultur wurden in 100 ml LB-Medium 1 ml Bakterienkultur überimpft und bis zum Erreichen einer Optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 bei 37 °C inkubiert (250 Umdrehungen pro Minute [upm]). Die Zellen wurden zunächst für 5 min auf Eis inkubiert und dann für 10 min, bei 5000 upm und 4 °C durch Zentrifugation in zwei 50 ml Zentrifugationsgefäßen sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Pellets vorsichtig in je 15 ml eiskalter TFB I-Lösung resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in je 2 ml eiskalter TFB II-Lösung aufgenommen. Bis zur Transformation wurden die Zellen auf Eis gestellt oder zur Lagerung aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

<u>TFB I:</u>	<u>TFB II:</u>
30 mM Kaliumacetat	10 mM MOPS
100 mM RbCl	10 mM RbCl
10 mM CaCl ₂	75 mM CaCl ₂
50 mM MnCl ₂	15 % (v/v) Glycerol
15 % (v/v) Glycerol	
pH 5,8	pH 6,5

2.2.1.2 Transformation chemokompetenter Zellen

Die Transformation chemokompetenter Zellen erfolgte nach Sambrook *et al.* 1989. Je Transformation wurden 50 µl kompetente *E.coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit der entsprechenden Menge DNA (5 µl eines Ligationsansatzes, 50-100 ng Vektor-DNA) gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C. Anschließend wurde der Ansatz für 3 min auf Eis abgekühlt, bevor er mit 200 µl LB-Medium versetzt und für 45 min schüttelnd bei 37 °C inkubiert wurde. Danach wurde ca. 1/5 des Ansatzes auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2 Kultivierung humaner Zellen

Für alle Experimente wurde die permanente und adhärent wachsende Leberkarzinomzelllinie Huh7 (*human hepatoma*) verwendet. Zusätzlich wurde eine persistente Zelllinie kultiviert, welche aus naiven Huh7-Zellen gewonnenen wurde und stabil das JFH1 Hepatitis-C-Virus-Replikon des Genotyps 2a mit Geneticin-Resistenz enthält (HCV-pers.). Die Huh7-Zelllinien wurde in Zellkulturschalen im Brutschrank bei konstanter Temperatur von 37 °C unter 5 % CO₂-Begasung und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde DMEM (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*) verwendet, welches mit hitzeinaktivierten fötalen Kälberserum (v/v) in einer Endkonzentration von 10 %, Penicillin/Streptomycin in einer Endkonzentration von 1 % (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin), sowie D-Biotin und Hypoxanthin in einer Endkonzentration von je 0,1 % versetzt wurde. Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens (ca. 10⁷ Zellen bei einer 10 cm-Zellkulturschale) wurden die Zellen passagiert. Dabei wird der am Boden der Kulturschale haftende Zellrasen mit 1 x PBS (37 °C) gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 700 µl Trypsin/EDTA-Lösung benetzt und kurz inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren resuspendiert. Entsprechend der gewünschten Verdünnung wurden die Zellen in neue Zellkulturschalen mit DMEM-Zellkulturmedium ausgesät. Zur Selektion der Zellen mit funktionalem HCV-Replikon, wurde das Zellkulturmedium zusätzlich mit einer 20 mg/ml Geneticin (G418) Stammlösung versetzt (Endkonzentration 800 µg/ml).

<u>DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium):</u>			<u>1 x PBS (phosphate buffered saline):</u>	
[+] D-Glucose	4,5 g/l	(w/v)	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
[+] NEAA			Na ₂ HPO ₄	6,5 mM
[-] L-Glutamin	-		NaCl	137 mM
[-] Pyruvat	-		KCl	2,7 mM
[+] FCS	10 %	(v/v)	pH	7,2
[+] Hypoxanthin	0,1 %	(v/v) (0,25 µg/ml)		
[+] D-Biotin	0,1 %	(v/v) (0,10 µg/ml)		
[+] Penicillin/ Streptomycin	1 %	(v/v) (100 U/ml) (100 µg/ml)		

2.2.2.1 Transfektion von Plasmid-DNA in humane Zellen

Für die Transfektion von Plasmid-DNA wurden Huh7-Zellen kultiviert, wie in 2.2.2 beschrieben. Die Zellen wurde 24 h vor der Transfektion so passagiert, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von ca. 70-90 % aufwiesen (ca. $6-8 \times 10^6$ Zellen bei einer 10 cm-Zellkulturschale). Die Transfektion erfolgte mittels Turbofect™ oder Polyethylenimin (PEI). Für eine 10 cm-Zellkulturschale wurden 1,5 ml serum- und antibiotikafreies DMEM mit 25 µl Turbofect™ Transfektionsreagenz oder 1 ml serum- und antibiotikafreies DMEM mit 30 µl PEI gemischt. Es wurden jeweils 20 µg Plasmid-DNA hinzugefügt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde auf die Zellen aufgetropft und für 24 h bis 76 h im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.2 Transfektion von RNA in humane Zellen

2.2.2.2.1 siRNA design

Die Sequenzen der siRNAs wurden mittels der Software von Dharmacon Inc. (Chicago, IL, USA) generiert und durch Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Eine Liste der siRNAs befindet sich in Tabelle 7 (siehe Anhang 7.1). Die siRNAs wurden im mitgelieferten Puffer gelöst (Stammlösung: 100 pmol/µl) und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2.2 Transfektion von siRNA mittels Lipofectamine® RNAiMax-Reagenz

Huh7-Zellen wurden ausgesät und für 24 h kultiviert, sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 50-70 % besaßen (ca. $4-6 \times 10^6$ Zellen bei einer 10 cm-Zellkulturschale). Zur Transfektion einer 10 cm-Zellkulturschale wurden je 1,5 ml serum- und antibiotikafreies DMEM mit 30 µl Lipofectamine® RNAiMax Transfektionsreagenz bzw. mit 1200 pmol siRNA (siehe 2.2.2.2.1) gemischt und separat für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden beide Ansätze vereint und für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor es auf die Zellen getropft wurde. Die Zellen wurden für 24-96 h bei 37 °C inkubiert. Gegebenenfalls wurden die Zellen nach 24 h mit viraler Replikon-RNA elektroporiert (siehe 2.2.2.2.3).

2.2.2.2.3 Transfektion von siRNA und viraler RNA mittels Elektroporation

Für die transiente RNA-Transfektion mittels Elektroporation (Neumann *et al.*, 1982) wurden Huh7-Zellen wie in 2.2.2 beschrieben kultiviert. Zur Erhöhung der Transfektionsrate wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion erneut passagiert, in einer 1:3 Verdünnung ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Für jede Transfektion wurde die Zellmenge einer 90 % konfluenten 10 cm-Zellkulturschale verwendet, dies entspricht einer Zellzahl von ca. 8×10^6 . Die Zellen wurden kurz vor der RNA-Transfektion geerntet, analog dem Verfahren zum Passagieren von Zellen. Nach der Behandlung mit Trypsin wurden die Zellen in Zellkulturmedium resuspendiert und für 5 min bei 1500 upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde 2-mal mit PBS gewaschen. Die Zellen entsprechend einer 10 cm-Zellkulturschale wurden in je 400 μ l PBS aufgenommen, mit 3 μ g Replikon-RNA bzw. 1200 pmol siRNA vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 0,4 cm (*Gene Pulser Cuvettes*) transferiert. Elektroporiert wurde bei einer Spannung von 200 V und einer Kapazität von 950 μ F bei maximalem Widerstand mit einem Puls. Sofort nach der Elektroporation wurden 800 μ l des Zellkulturmediums zu den Zellen gegeben, diese darin resuspendiert und anschließend in entsprechenden Kulturschalen ausgesät.

2.2.2.3 Infektion und Transfektion von humanen Zellen mit MVA-T7 und pCite2a-Vektoren

Zur Expression von HCV-Proteinen in Huh7-Zellen wurden die Zellen mit dem MVA-T7-Virus (*modified vaccinia ankara virus*) infiziert und mit einem Plasmid (CITE-2a(+)) Vektor, Merck, Darmstadt, Deutschland) transfiziert, das die HCV-Proteine unter Kontrolle eines T7-Promotors trägt. Das MVA-T7 Virus exprimiert in der infizierten Zelle zytoplasmatisch die DNA-abhängige RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 und ermöglicht somit die transiente Expression rekombinanter Gene unter Kontrolle eines T7-Promotors (Sutter *et al.*, 1995; Sutter und Moss, 1995). Die Anzucht des MVA-T7 Virus erfolgte in BHK21-Zellen (*baby hamster kidney cells*) und wurde von Frau Dr. Martina Behrens (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland) durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Generierung erfolgte gemäß *Current Protocols in Molecular Biology* (Earl *et al.*, 1998). Zum Zeitpunkt der Infektion wurde die Zellzahl mittels Zählkammer (Neubauer-Hämozytometer) bestimmt, die Zellen in serumfreien DMEM gewaschen und mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 2 in 1 ml serumfreien DMEM mit MVA-T7-Virus infiziert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Virussuspension abgenommen und die Zellen zweimal in serumfreien DMEM gewaschen. Nach einer 1-stündigen Inkubation in Zellkulturmedium wurden die Zellen mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert (siehe 2.2.2.1). Die Ernte der Zellen erfolgte nach 24 h oder 48 h mittels Trizol oder Trypsin (siehe 2.2.2.6).

2.2.2.4 Hemmung der zellulären RNA-Synthese (Actinomycin D-Assay)

Die Untersuchung der mRNA-Stabilität in eukaryotischen Zellen erfolgte durch Zugabe von Actinomycin D. Dabei handelt es sich um ein zytotoxisches Peptid-Antibiotikum, welches die zelluläre, DNA-abhängige mRNA-Synthese inhibiert (Sobell, 1985; Delepierre *et al.*, 1989; Koba und Konopa, 2005). Durch die Hemmung der zellulären *de novo* RNA-Synthese können Rückschlüsse auf die Degradation von zellulären mRNAs gezogen werden, die bereits vor der Applikation von Actinomycin D synthetisiert wurden. Zur Hemmung der mRNA-Synthese wurden Actinomycin D in einer Endkonzentration von 1,6 μ M ins Zellkulturmedium appliziert. Nach der Zugabe wurden die Zellkulturplatten bis zur Zellernte im Brutschrank inkubiert. Die Quantifizierung bestimmter Transkripte erfolgte mittels qRT-PCR (siehe 2.4.2). Dabei wurden die im zeitlichen Verlauf gemessenen relativen Transkriptmengen in Bezug zur Anfangs-mRNA-Menge gesetzt. Wenn nur ein Anfangs und ein Endwert der jeweiligen Probe bestimmt wurde, wird dies als Actinomycin D-Endpunkt Assay bezeichnet.

2.2.2.5 Stressinduktion in eukaryotischen Zellen

Um in eukaryotischen Zellen Stress zu induzieren und die Effekte mit den Veränderungen in der Zelle zu vergleichen, die durch transiente Transfektion hervorgerufen werden, wurde Di-Natriumhydrogen-Arsenat in einer Endkonzentration von 2,5 mM verwendet. Dieses induziert in der Zelle oxidativen Stress und wurde zu den Huh7-Zellen gegeben. Nach der Zugabe wurden die Zellkulturplatten bis zur Zellernte im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.6 Zellyse mittels Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Lösung (Trizol) oder Trypsin

Für die Lyse von Huh7-Zellen wurde das Zellkulturmedium von den Zellen entfernt und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Darauf folgend wurden die Zellen mit 1 ml Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Lösung (Trizol) pro 3 cm-Zellkulturschale oder einer entsprechenden Menge Trypsin/EDTA-Lösung behandelt, um die Zellen vom Boden der Zellkulturschale zu lösen. Darauf wurden die Trypsin-gelösten Zellen in 10 ml (10 cm-Zellkulturschale) bzw. 1 ml (3 cm-Zellkulturschale) Zellkulturmedium resuspendiert und in ein entsprechendes Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 3 min bei 2000 upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml (10 cm-Zellkulturschale) oder 1 ml (3 cm-Zellkulturschale) 1 x PBS resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde restlos entfernt und die Zellen wurden zur direkten Weiterverarbeitung in Proteinlysepuffer oder Trizol aufgenommen und in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für die Zellyse mittels Trizol-Lösung wurden die Zellen nach 3-5 min Inkubation in der Lösung resuspendiert. Die RNA wurde mittels Chloroform und Isopropanol extrahiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C zur Weiterverarbeitung gelagert (siehe 2.5.1).

2.3 Plasmide und Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Vektoren sowie die Konstruktion der Plasmide sind in Tabelle 6 des Anhangs aufgeführt (siehe 7.1).

2.4 Molekularbiologische Methoden zum Arbeiten mit DNA

Um DNasen zu inaktivieren, wurden hitzebeständige Geräte, Materialien und Lösungen bei 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Geräte wurden mit 70%igen (v/v) Ethanol gereinigt.

2.4.1 Primer *design*

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer für PCR-Amplifikationen und Sequenzierreaktionen (Tab. 7, siehe 7.1) wurden durch die Firma Eurofins Genomics (Luxemburg, Luxemburg) synthetisiert. Sie wurden in sterilem H₂O_{bidest} gelöst (100 pmol/μl) und bei -20 °C gelagert. Die Oligonukleotide wurden mittels Clone Manager Suite entworfen (Scientific & Educational Software, Morrisville, NC, USA).

2.4.2 Quantitative *real time*-PCR (qRT-PCR)

Die Methode der quantitativen *real time*-PCR (qRT-PCR) dient zur Amplifikation und Quantifizierung von DNA. Sie beruht auf dem Prinzip der klassischen PCR (Murphy *et al.*, 1990), wobei die Quantifizierung über eine Fluoreszenzmessung am Ende der Elongation jedes Zyklus erfolgt. Als DNA-Matrize für die qRT-PCR dienten cDNAs, die über reverse Transkription aus RNA gewonnen wurden. Für die Messungen in dieser Arbeit wurde SYBR® Green I als Fluoreszenzfarbstoff verwendet (QuantiTect SYBR® Green PCR Master Mixes, roboklon SGqPCR Master Mixes), welcher in dsDNA interkaliert und proportional mit der Menge des amplifizierten PCR-Produkts zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führt. Die Quantifizierung wird während der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen, da in diesem Zeitraum optimale Reaktionsbedingungen vorliegen und von einer Verdopplung der PCR-Produkte ausgegangen wird. Das Fluoreszenzsignal wird gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Der Punkt, an dem sich das Fluoreszenzsignal signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt wird als *cycle threshold*-Wert (CT-Wert) bezeichnet und bildet die Grundlage der Quantifizierung. Für die relative Quantifizierung werden die Transkriptmengen der Probe und eines Referenzgens zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dabei werden relative und keine absoluten Mengen ermittelt (Zhao und Fernald, 2005). Zur Auswertung der qRT-PCR wurden die gemessenen CT-Werte des Referenzgens von dem des Zielgens der zu analysierenden Probe subtrahiert. In dieser Arbeit diente GAPDH als Referenzgen. Der Δ CT-Wert gibt die Differenz aus Zielgen und Referenzgen an ($CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}} = \Delta$ CT). Der Δ CT-Wert wurde anschließend in die Formel $2^{-\Delta$ CT eingesetzt, unter der Voraussetzung, dass mit

jedem Zyklus eine Verdopplung des PCR-Produkts auftritt. Da es sich um Proben zu verschiedenen Punkten nach Behandlung der Zellen handelt, wurden die $2^{-\Delta CT}$ -Werte der verschiedenen Zeitpunkte auf den $2^{-\Delta CT}$ -Wert der Null-Probe bezogen, welcher 100 % gleichgesetzt wurde. Mit dieser Methode werden innerhalb einer Probenreihe die gemessenen Werte mit dem Referenzgen verglichen. Zum Vergleich der mRNA-Menge zwischen zwei Proben wurde die $\Delta\Delta CT$ -Methode verwendet. Dafür wurden die ΔCT -Werte zu den entsprechenden Zeitpunkten (T_x) mittels nachstehender Gleichungen berechnet.

$$CT_{\text{Zielgen Probe 1 (Tx)}} - CT_{\text{Referenzgen Probe 1 (Tx)}} = \Delta CT_{\text{Probe 1 (Tx)}}$$

$$CT_{\text{Zielgen Probe 2 (Tx)}} - CT_{\text{Referenzgen Probe 2 (Tx)}} = \Delta CT_{\text{Probe 2 (Tx)}}$$

Die ermittelten ΔCT -Werte zum Zeitpunkt T_x wurden im Anschluss über die Gleichung $\Delta CT_{\text{Probe 1 (Tx)}} - \Delta CT_{\text{Probe 2 (Tx)}} = \Delta\Delta CT_{(Tx)}$ verrechnet. Dieser wurde in die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ eingesetzt und ergab so das relative Verhältnis der Transkriptmenge des Zielgens von Probe 1 und Probe 2 (Pfaffl, 2001). Ermittelte Werte verschiedener Zeitpunkte konnten wiederum prozentual zueinander verrechnet werden. Die Messungen erfolgten am LightCycler® 1.5 (QuantiTect SYBR® Green PCR Master Mixes; Qiagen, Hilden, Deutschland) oder des LightCycler® 480 (SGqPCR Master Mixes; roboklon, Berlin, Deutschland) der Firma Roche (Mannheim, Deutschland), unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Glaskapillaren oder weißen 96-well-Platte als Reaktionsgefäß (Wittwer *et al.*, 1997). Der qRT-PCR-Ansatz wurde nach den Angaben in Tabelle 2 bzw. 3 gemessen. Die zu amplifizierenden Fragmente hatten eine Länge von 70-150 bp, die eingesetzten Primer eine Länge von 18-25 bp. Im Anschluss an die qRT-PCR erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse, um die Spezifität der verwendeten Primer zu überprüfen.

qRT-PCR Ansatz:

- 5 µl 2 x QuantiTect Mix/ 2 x SGqPCR Mix
- 0,5 µl Primer *forward* (10 µM)
- 0,5 µl Primer *reverse* (10 µM)
- 50 ng *template*
- ad 10 µl steriles H₂O_{bidest}

Tab. 2: Programm für quantitative *real-time*-PCR mit LightCycler® 480

	PCR-Schritt	Zeit	Temperatur	Erwärmungsrate	Zyklen
	Aktivierung der Polymerase	10 min	95 °C	4,4 °C/sec	1
Amplifikation	Denaturierung	5 sec	95 °C	4,4 °C/sec	45
	Hybridisierung	10 sec	60 °C	2,2 °C/sec	
	Elongation	15 sec	72 °C	4,4 °C/sec	
Schmelzkurve	Denaturierung	30 sec	95 °C	4,4 °C/sec	1
	Fluoreszenzmessung	60 sec	67 °C	2,2 °C/sec	
	Denaturierung		95 °C	0,1 °C/sec	
	Kühlen	30 sec	40 °C	2,2 °C/sec	1

Tab. 3: Programm für quantitative *real-time*-PCR mit LightCycler® 1.5

	PCR-Schritt	Zeit	Temperatur	Erwärmungsrate	Zyklen
	Aktivierung der Polymerase	15 min	95 °C	20 °C/sec	1
Amplifikation	Denaturierung	15 sec	95 °C	20 °C/sec	45
	Hybridisierung	25 sec	60 °C	20 °C/sec	
	Elongation	25 sec	72 °C	20 °C/sec	
Schmelzkurve	Denaturierung	30 sec	95 °C	20 °C/sec	1
	Fluoreszenzmessung	30 sec	60 °C	20 °C/sec	
	Denaturierung		95 °C	0,1 °C/sec	
	Kühlen	30 sec	40 °C	20 °C/sec	1

2.4.3 Berechnung von mRNA-Halbwertszeiten

Unter Verwendung des Actinomycin D-Assays, zur Hemmung der zellulären *de novo* RNA-Synthese (siehe 2.2.2.4), wurde die Degradation zellulärer mRNAs analysiert. Die Quantifizierung definierter Transkripte erfolgte mittels qRT-PCR (siehe 2.4.2). Die Halbwertszeit von mRNAs ist definiert als die Zeitspanne, in der sich die Quantität der Ausgangs-mRNA auf die Hälfte des anfänglichen Wertes reduziert hat. Sie variiert je nach Transkript zwischen wenigen Minuten und mehreren Tagen. Die Abbaugeschwindigkeit bzw. die Halbwertszeit ($T_{1/2}$) der mRNA kann durch Quantifizierung der Transkriptmenge über einen bestimmten Zeitraum hinweg bestimmt werden, wenn die DNA-abhängigen *de novo* RNA-Synthese inhibiert wird (*RNA synthesis inhibitor-chase method*; Egyhazi 1974a/b/1976; Sehgal *et al.*, 1978; siehe 2.2.2.4). Dadurch wird keine neue mRNA synthetisiert und die gemessene mRNA repräsentiert ausschließlich RNA-Moleküle, die bereits vor der Actinomycin D-Applikation synthetisiert wurden. Die gemessene RNA-Menge zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Zugabe (0 min) wurde als 100 % definiert. Über einen Zeitraum von 3-4 h wurden Proben im Abstand von 30 min entnommen. Die im zeitlichen Verlauf gemessenen relativen Transkriptmengen wurden in Bezug zur Anfangs-mRNA-Menge gesetzt und halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Halbwertszeit der entsprechenden mRNA wurde innerhalb des Zeitraums ihrer kontinuierlichen Degradation durch exponentielle Regression bestimmt und mit Hilfe der Formel: $y = a * e^{b*x}$ berechnet (y -Anzahl der Moleküle zu einem bestimmten Zeitpunkt x ; e -eulerische Zahl; a und b -Zerfallskonstanten; x -Zeitpunkt). Unter Einbezug der errechneten Konstanten wurde daraufhin die Halbwertszeit ($T_{1/2}$) berechnet (Excel Version 2007, Microsoft, Redmond, USA). Zur Analyse des Degradationsverlaufs bestimmter mRNAs wurde neben dem geschilderten Verfahren auch das sogenannte Actinomycin D-Endpunkt Assay verwendet (siehe 2.2.2.4). Dieses quantifiziert lediglich die relativen Transkriptmengen zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Applikation und eines Endpunktes. Hierbei wird keine Halbwertszeit berechnet. Durch den Studentischen T-Test wurden Unterschiede in den residualen mRNA-Mengen verschiedener Datensätze auf statistische Signifikanz geprüft.

2.4.4 DNA-Sequenzierung

Sequenzierreaktionen wurden von den Firmen SeqLab (Göttingen, Deutschland) und Eurofins Genomics (Luxemburg, Luxemburg) durchgeführt und die Ergebnisse mittels der Clone Manager Suite (Scientific & Educational Software, Morrisville, NC, USA) und ChromasLite (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australien) ausgewertet.

2.4.5 cDNA-Einzelstrangsynthese durch reverse Transkription

Die aus eukaryotischen Zellen gewonnene RNA wurde durch reverse Transkription in einzelsträngige DNA umgeschrieben. Das entstehende Produkt, die cDNA (*complementary DNA*), dient zur Quantifizierung der RNA-Transkription bzw. zur Klonierung von humanen Genen. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels RevertAid Reverse Transkriptase (ThermoFisher Scientific) in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer mit Oligo-(dT)-Primer (polyadenylierte mRNAs) oder genspezifischer *reverse* Primer. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 20 µl. 1 µg der entsprechenden RNA wurde mit 1 µl des jeweiligen Primers (10 pmol) auf ein Volumen von 12 µl mit RNase freiem H₂O aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 80 °C erhitzt, gefolgt von einer 5-minütigen Inkubation bei 60 °C und anschließender Lagerung auf Eis. In einem separaten Reaktionsgefäß wurden 4 µl des 5 x RT-Puffers mit 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 µl RNase freien Wassers sowie 0,2 µl RNase-Inhibitor (Ribolock) und 0,3 µl RevertAid Reverse Transkriptase gemischt und anschließend zum Transkriptionsansatz gegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42 °C für 1 Stunde. Zur Denaturierung wurden die Ansätze anschließend für 10 min bei 70 °C inkubiert. Die cDNAs wurden als Matrize für weitere Analysen mittels quantitativer *real-time*-PCR (qRT-PCR; siehe 2.4.2) oder zur Genamplifikation für Klonierungen verwendet.

2.5 Molekularbiologische Methoden zum Arbeiten mit RNA

Alle Lösungen zum Arbeiten mit RNA wurden mit RNase-freiem Wasser in RNase freien Reaktionsgefäßen angesetzt. Hitzestabile Lösungen oder Geräte wurden autoklaviert bzw. hitzelabile Lösungen steril-filtriert und Geräte mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt. Zusätzlich wurden bei allen Arbeiten Handschuhe getragen und den Reaktionen gegebenenfalls RNase-Inhibitor zugesetzt.

2.5.1 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen

Die Präparation von RNA aus eukaryotischen Zellen (Chomczynski *et al.*, 1987) erfolgte aus Zellen, wie in 2.2.2.6 beschrieben. Die mit Trypsin gewonnenen Zellen wurden anschließend mit 1 ml Trizol-Lösung je 10⁶ Zellen versetzt, vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde den Proben 200 µl Chloroform je 1 ml Trizol zugesetzt und für weitere 2-3 min inkubiert, gefolgt von 15 min

Zentrifugation bei 4 °C und 13000 upm. Die obere Phase des Zentrifugats enthielt die extrahierte RNA und wurde mit 1 µl Glykogen als Fällungshilfe versetzt. Zur RNA-Fällung wurden 500 µl Isopropanol zugegeben (je 1 ml eingesetztem Trizol), vorsichtig invertiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach schloss sich eine Zentrifugation für 10 min, bei 4 °C und 13000 upm an. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde mit 70%igen Ethanol (v/v) gewaschen und für 5 min bei 4 °C und 7500 upm sedimentiert. Nach der Zentrifugation wurde der Ethanol-Überstand abgenommen und das RNA-Pellet für 15 min getrocknet und dann in 20-50 µl RNase-freien Wasser gelöst.

Trizol:

0,8 M Guanidiniumthiocyanat
0,4 M Ammoniumthiocyanat
0,1 M Natriumacetat pH 5,0
5 % Glycerin
38 % Phenol (wassergesättigt, stabilisiert)

2.5.1.1 RNA-Reinigung über Phenol-Chloroform Extraktion

RNA kann mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt werden (Colter *et al.*, 1962). Dies geschah im Rahmen dieser Arbeit für präparative *in vitro* Transkriptionen (siehe 2.5.2). Die zu reinigende Probe wurde gegebenenfalls mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und mit 1 VT Phenol (wassergesättigtes, saures Phenol) versetzt. Nach Inkubation für 2 min unter starkem Schütteln wurde die Probe für 5 min bei 13000 upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Zur Extraktion wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit je 1 VT Chloroform unter starkem Schütteln gemischt sowie erneut für 5 min bei 13000 upm zentrifugiert. Zur Fällung der RNA wurde die wässrige Phase mit 2,5 VT Ethanol_{absolut} und 0,18 VT einer 6 M Ammoniumacetat Lösung versetzt und invertiert. Nach einer Inkubation von mindestens 20 min bei -20 °C wurde die Probe für 20 min bei 13000 upm und 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 70%igen (v/v) Ethanol gewaschen und für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für ca. 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in RNase-freiem Wasser gelöst. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

2.5.1.2 RNA-Reinigung mit kommerziellen Systemen

Die Verwendung kommerzieller Systeme diente der Gewinnung reiner RNA aus präparativen *in vitro* Transkriptionen. Dafür wurde das *Nucleospin RNA II Kit* von der Macherey-Nagel GmbH (Weilmünster, Deutschland) oder das *GeneJET RNA Purification Kit* von ThermoFisher Scientific entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

2.5.2 *in vitro*-Transkription zur Herstellung von RNA

Die *in vitro*-Transkription ermöglicht das direkte Umschreiben einer linearisierten DNA-Matrize oder von PCR-Produkten in RNA in einem zellfreien System (Melton *et al.*, 1984). Als DNA-Matrize zur Herstellung von RNA dienten Plasmide, die mit Restriktionsendonukleasen linearisiert wurden. Mit Hilfe der RNA-Polymerase T7 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) wurden die RNA-Transkripte in einem Volumen von 40 µl aus 1-3 µg linearisierter DNA synthetisiert. Diese Lösung wurde mit rNTP-Mix, Transkriptionspuffers sowie Dithiothreitol (DTT) und RNase-Inhibitor (RiboLock) versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der RNA-Polymerase gestartet und bei 37 °C für 2,5 h inkubiert. Darauf folgte ein 1-stündiger DNase I-Verdau (20 U) bei 37 °C. Nach anschließender Denaturierung der DNase I bei 70 °C für 15 min wurde die RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.5.1.1) isoliert und mit Ethanol präzipitiert. Diese Methode wurde für die Generierung subgenomischer Replikon-RNA verwendet. Für die *in vitro* Transkription von WNV-Replikon-RNA wurde zusätzlich ein *cap*-Analog (Jena Bioscience, Jena, Deutschland) verwendet. Dazu wurde m7GpppG in einer Endkonzentration von 0,8 mM zugesetzt. Die rGTP-Konzentration wurde reduziert (0,5 mM).

in vitro Transkriptionsansatz:

1 µg Plasmid_{linearisiert}
 8 µl 5 x Transkriptionspuffer
 4 µl 10 mM rNTPs-Mix
 4 µl 100 mM DTT
 1 µl RiboLock (40 U/µl)
 50 U RNA-Polymerase (T7, T3, SP6)
 ad 40 µl H₂O

2.6 Proteinbiochemische Methoden

Alle Lösungen zum Arbeiten mit Proteinen wurden mit RNase-freiem Wasser in RNase freien Reaktionsgefäßen (Eppendorf) angesetzt. Hitzestabilen Lösungen oder Geräte wurden autoklaviert, hitzelabile Lösungen sterilfiltriert und Geräte mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt. Es wurde bei 4 °C gearbeitet.

2.6.1 Verwendete Antikörper

Eine Auflistung aller verwendeten Antikörper findet sich im Anhang (Tab. 5, siehe 7.1).

2.6.2 Herstellung von Gesamtzelllysat und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Zur Herstellung von Gesamtzelllysat (RIPA-Puffer, IP-Lysepuffer) oder zytoplasmatischem Zellextrakt (Zelllysispuffer) wurden Zellen pelletiert und zur Zelllyse mit dem entsprechenden Puffer versetzt und durch pipettieren resuspendiert. Dabei wurde 0,5 ml

RIPA-Puffer oder IP-Lysepuffer bzw. 0,3 ml Zellysispuffer je 10^7 Zellen verwendet. Nach einer Inkubation für 15 min bei 4 °C wurde das Lysat für 15 min bei 14000 upm (RIPA-Puffer, IP-Lysepuffer) bzw. 3000 upm (Zellysispuffer) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

<u>RIPA-Puffer (pH 8,0)</u>	<u>IP-Lysepuffer:</u>	<u>Zellysispuffer (pH 8,0):</u>
50 mM Tris-HCl	20 mM HEPES pH 7,9	50 mM Tris/HCl
150 mM NaCl	100 mM NaCl	100 mM NaCl
1 % (v/v) NP-40	1 % (v/v) NP-40	0,5 % (v/v) NP-40
0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat	5 mM MgCl ₂	5 mM MgCl ₂
0,1 % (w/v) SDS	1 mM PMSF	1 mM PMSF
		1 mM DTT

Proteinlysate können durch Proteinfällung aufkonzentriert werden. Dafür wurde das Lysat mit einer 50%igen Trichloressigsäure-Lösung (TCA) versetzt, sodass diese anschließend 12%ig im Lysat vorlag. Daraufhin wurde das Proteingemisch 30 min bei 4 °C gefällt und anschließend für 30 min bei 4 °C und 13000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das proteinhaltige Pellet wurde dreimal mit 500 µl eisgekühltem Aceton gewaschen und vorsichtig invertiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 4 °C wurde die Lösung jeweils für 10 min bei 4 °C und 13000 upm zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde nach Entfernung des Überstandes 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 20-25 µl 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert.

2.6.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Um Proteine und ihre Lokalisation innerhalb von Zellen spezifisch nachzuweisen diente die indirekte Immunfluoreszenz. Dabei wurden die permeabilisierten Zellen mit einem primären Antikörper inkubiert, und dieser mit einem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen, der spezifisch gegen den primären Antikörper gerichtet war. Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf sterilen 12 mm Deckgläschen (Konfluenz von 50-70 %). Das Medium wurde abgenommen und die Zellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Durch die anschließende 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur in 4 % Paraformaldehyd/PBS wurden die Zellen fixiert. Nach Entfernung der Fixierlösung wurden die Zellen erneut mit PBS (3 x) gewaschen und bei 4 °C für 15 Minuten in 0,5 % N-Octylglycopyranoside/PBS (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen und bei Raumtemperatur für 20 min in Blockierungslösung geschwenkt, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Im Anschluss folgte die Inkubation mit der spezifischen primären Antikörperlösung bei 37 °C für 1 h. Nach Entfernung des primären Antikörpers wurden die Zellen dreimal für je 5 min in 0,05 % Tween® 20/PBS gewaschen, gefolgt von einer Inkubation mit der sekundären Antikörperlösung unter Lichtausschluss bei 37 °C (1 h). Die Antikörper wurden in

Blockierungslösung entsprechend verdünnt. Die Zellen wurden anschließend dreimal für je 5 min, mit 0,05 % Tween® 20/PBS gewaschen, gefolgt von Waschschritten mit 1 x PBS, sterilem H₂O_{bidest} und Ethanol_{absolut}. Die Deckgläschen wurden daraufhin getrocknet und mit Hilfe von je 5 µl *ProLong® Gold*-Lösung auf Objektträgern fixiert. Diese enthielt den DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI, der die DNA und somit die Zellkerne sichtbar macht. Die fixierten Deckgläschen wurden im Anschluss unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Axiovert 200M/Axiovision, Zeiss, Jena, Deutschland).

1 x PBS (pH 7,4):

140 mM NaCl
2,7 mM KCl
1,5 mM KH₂PO₄
6,5 mM Na₂HPO₄

Blockierungslösung:

5 % (w/v) fötales Kälberserum (FCS)
0,05 % (v/v) Tween® 20
1 x PBS pH 7,4

2.6.4 Immunpräzipitation (IP) und Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP)

Die Immunpräzipitation (IP) dient der spezifischen Anreicherung von Proteinen und gegebenenfalls ihren Interaktionspartnern. Dabei wird ein spezifisches Immunglobulin (Antikörper) an eine Matrix (Protein A-, Protein G-Agarose) gekoppelt. Die Proteine A aus der *Staphylococcus aureus* Zellwand und Protein G aus *Streptococcus* binden den Fc-Teil der IgG-Moleküle oder das Immunglobulin wird über chemische Bindungen kovalent an Agarose gebunden. Die gekoppelte Matrix wird mit dem Proteingemisch versetzt, um das nachzuweisende Protein anzureichern. Durch unterschiedlich stringente Waschschriffe werden unspezifische Bindungspartner entfernt. Da die Antigen-Antikörper Bindungen spezifisch sind, ist es möglich ein Protein nach seiner Affinität zu reinigen (IP) oder auch Interaktionspartner eines Proteins zu ko-präzipitieren (Ko-IP). Das in dieser Arbeit angewendete *ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel* (Sigma-Aldrich) diente dazu, Proteine mit FLAG-Fusionsprotein gezielt anzureichern. Diese Proteine müssen in Zellen durch Transfektion von Plasmiden homolog exprimiert werden. Zur Anreicherung von FLAG-TIA1 Varianten (Fusionsprotein aus FLAG und *T-cell restricted intracellular antigen 1*) wurde dieses in Huh7-Zellen transfiziert und FLAG-TIA1 exprimiert. Die Zellen wurden geerntet, in IP-Zelllysepuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde bei 13000 upm bei 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit *ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel* versetzt und mindestens 4 h oder über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Gegebenenfalls wurden 0,1 mg/ml RNase A zugesetzt oder der NaCl-Gehalt erhöht. Das *ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel* wurde vor Verwendung dreimal mit IP-Puffer gewaschen und bei 5000 upm für 1 min bei 4 °C zentrifugiert. Die immunpräzipitierten FLAG-Fusionsproteine wurden viermal mit 500 µl IP-Puffer gewaschen und bei 5000 upm, 4 °C für 1 min zentrifugiert und anschließend in 4 x SDS-Probenpuffer aufgenommen oder mittels FLAG-Peptid eluiert. Zur Elution der Proteine von dem *ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel* wurden 90 µl Elutionspuffer zugegeben und mit 500 ng/µl 3 x FLAG®-Peptid (Sigma-

Aldrich) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 4 °C. Die eluierten FLAG-Fusionsproteine wurden durch Zentrifugation für 1 min bei 5000 upm und 4 °C von der ANTI-FLAG® M2-Agarose getrennt. Das Eluat wurde direkt in 4 x SDS-Probenpuffer aufgenommen oder mittels TCA-Fällung aufkonzentriert (siehe 2.6.2). Alternativ wurde für die Präzipitation von endogenem TIA1 ein spezifischer Antikörper gegen TIA1 an Sepharose-*beads* gekoppelt. Dafür wurden 30 µl Protein-G-Sepharose-*beads* (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) dreimal mit je 500 µl IP-Puffer gewaschen und dann mit 2 µg polyklonalem Ziege IgG anti-TIA1 Antikörper versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Die Zentrifugation nach jedem Waschschrift wurde bei 2000 upm bei 4 °C für 1 min durchgeführt. Im Anschluss wurden die gekoppelten Protein-G-Sepharose-*beads* dreimal mit je 500 µl IP-Puffer gewaschen und dann mit 500 µl Proteinlösung in IP-Lysepuffer versetzt.

<u>IP-Lysepuffer:</u>	<u>IP-Puffer:</u>	<u>Elutionspuffer:</u>
20 mM HEPES pH 7,9	20 mM HEPES pH 7,6	20 mM HEPES pH 7,6
100 mM NaCl	150 mM NaCl	100 mM KCl
1 % (v/v) NP-40	1 % (v/v) NP-40	3 mM MgCl ₂
5 mM MgCl ₂	1 mM EDTA pH 8,0	0,01 % Tween 20
1 mM PMSF	1 mM PMSF	

2.6.5 Inkubation humaner Zellen unter Hypoxie und Verwendung des HIF1 α -Inhibitors

Um Zellen hypoxischen Bedingungen auszusetzen wurden das Anaerobiosesystem Anaerocult® A mit Anaerotest® nach Angaben des Herstellers verwendet (Merck, Darmstadt, Deutschland). Das System enthält chemische Komponenten, um eine anaerobe, CO₂ angereicherte Atmosphäre zu schaffen. Diese Komponenten wurden zusammen mit den in 6-*well*-Platten kultivierten Zellen in luftdichten Reaktionsbeuteln verschlossen und im Brutschrank bei 37 °C bis zur Ernte inkubiert. Zuvor wurde die Abdeckung der 6-*well*-Platten entfernt. Die Zugabe des HIF1 α -Inhibitors (LW6-Hypoxie induzierbarer Faktor-1 α Inhibitor, Merck, Darmstadt) erfolgte mittels 1 ml-Spritzen. Dafür wurde die Kanüle (Sterican®, Braun, Melsungen, Deutschland) durch den Reaktionsbeutel gestochen, um die Inhibitorlösung zu applizieren. Das entstandene Einstichloch wurde sofort mit Klebeband verschlossen und die Zellen wurden bei 37 °C im anaeroben Milieu inkubiert. Der Inhibitor ist eine zellpermeable, amido-phenolische Komponente, welche selektiv die HIF1 α Proteinakkumulation blockiert, nicht jedoch die *HIF1 α* -Transkription.

2.6.6 Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Untersuchungen zu möglichen Modifikationen des TIA1vl-Proteins, wurden in Zellen der persistenten HCV-Zelllinie bzw. naiven Huh7-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem FLAG-TIA1vl-Plasmid (FLAG-TIA1vl_pcDNA3) transfiziert (siehe 2.2.2.1). Nach 24 h bzw. 48 h wurde Gesamtzellextrakt gewonnen und

anschließend FLAG-TIA1vl mittels FLAG-IP (siehe 2.6.4) isoliert. Das mit FLAG-Peptid eluierte FLAG-TIA1vl wurde in einer 10%igen SDS-PAGE (siehe 2.6.8) aufgetrennt. Die entsprechende Proteinbande wurde ausgeschnitten und zur Analyse an die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Schierhorn für die massenspektrometrischen Analysen weitergeleitet (Institut für Biochemie und Biotechnologie, Serviceeinheit für Massenspektrometrie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland). Die Gelstücke wurden mittels Trypsin, Chymotrypsin oder Trypsin mit Elastase verdaut. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte an einem Ultraflex-II TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen). Zur Auswertung und Dokumentation wurde die Software Flex Control 2.4, Flex Analysis 2.4 und Biotoools 3.0 genutzt. Die Analyse von möglichen Bindepartnern des TIA1 Variante I Proteins wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Ruppert (Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg, *Core Facility for Mass Spectrometry and Proteomics*, Heidelberg, Deutschland) mittels Massenspektrometrie analysiert. Dafür wurden Bindepartner des FLAG-TIA1 Variante I Proteins unter Niedrigsalz-Bedingungen mittels FLAG-IP (siehe 2.6.4) ko-präzipitiert. Die isolierte Proteinfraction wurde mit 0,3 VT 50%iger Trichloressigsäure präzipitiert und das Pellet 3-mal mit Aceton gewaschen, um die Proteinlösung aufzukonzentrieren (siehe 2.6.2). Das finale Pellet in 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und an Dr. Ruppert versandt. Die Proben mittels MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie identifiziert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Scaffold 4.0.7 (Proteome Software Inc., Portland, OR, USA).

2.6.7 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zum Nachweis des VEGF Proteins aus transient mit HCV-Replikons transfizierten Zellen wurde das *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) human *VEGF ELISA Core Kit* (Komabiotek Inc., Seoul, Korea) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der ELISA ist ein kompetitiver immunologischer Enzym-Test zum Nachweis von Proteinen. Die Konzentration des untersuchten Proteins wird photospektrometrisch (*microplate reader*, 450 nm) bestimmt und mittels *Gen 5 Data Analysis Software* (beides BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) analysiert.

2.6.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische und präparative Auftrennung von Proteinen erfolgte anhand ihres Molekulargewichts mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) bei denaturierenden Bedingungen. Als elektrolythaltiger SDS-Laufpuffer wurde ein Tris-Glycin-Puffersystem nach Laemmli verwendet (Laemmli, 1970). Die SDS-Gele bestehen aus 4%igen Sammelgel (SG) und 10 %-12%igen Trenngel (TG). Der Trennbereich des Gels hängt vom Vernetzungsgrad ab und kann zwischen 10 und 220 kDa liegen. Das Trenngel wurde entsprechend gemischt, gegossen und mit 2 ml

Isopropanol überschichtet (Tab. 4). Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol abgenommen, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und ein entsprechender Probenkamm luftblasenfrei eingesteckt. Nach dem Auspolymerisieren wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die SDS-Gelelektrophoresekammer eingespannt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf die SDS-PAGE mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 96 °C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Die SDS-PAGE lief bei maximaler Spannung und 25-50 mA.

<u>1 x Laemli-Puffer:</u>	<u>4 x SDS-Probenpuffer (pH 6,8):</u>	<u>4 x SG-Puffer:</u>	<u>4 x TG-Puffer:</u>
25 mM Tris	20 mM Tris/HCl	250 mM Tris/HCl	1,5 M Tris/HCl
190 mM Glycin	40 % (w/v) Glycerin	20 % (w/v) SDS	40 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) SDS	10 % (v/v) β -Mercaptoethanol	pH 6,8	pH 8,8
	12 % (w/v) SDS		
	0,02 % (w/v) Bromphenolblau		

Tab. 4: Pipettierschema für SDS-Polyacrylamidgel

Sammelgel 4 %	Trenngel 10 % / 12 %
25 % 4 x Sammelgel-Puffer	25 % 4 x Trenngel-Puffer
4 % Acrylamid (Rotiphorese 30)	10 % / 12 % Acrylamid (Rotiphorese 30)
0,14 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)	0,15 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)
0,07 % N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin (TEMED)	0,07 % N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin (TEMED)

2.6.9 Immunoblot

Der Immunoblot wurde verwendet, um Proteine nach erfolgter SDS-PAGE (siehe 2.6.8) mittels elektischem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran zu übertragen und über spezifische Immunglobulin Bindung nachzuweisen (Kyhse-Andersen, 1984). Dafür wurden 2 Lagen Gel Blotpapier (Whatman; Maidstone, England), die Nitrozellulose Membran (Protran®, Sigma-Aldrich), das SDS-Gel und wiederum 2 Lagen Gel Blotpapier luftblasenfrei übereinander gelegt. Das SDS-Gel, die Membran und Blotpapier wurden im Vorfeld in 1 x Transferpuffer getränkt. Durch Anlegen einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Blotfläche für 2 h bei 9 V wurden die Proteine im *semi-dry* Verfahren auf die Nitrozellulose Membran übertragen. Zur immunologischen Detektion der Proteine wurde die Membran zur Absättigung in Blockierungslösung eingelegt und für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Darauf folgend wurde die Membran für 2 h in der entsprechenden primären Antikörperlösung in Blockierungslösung geschwenkt, um die Immunglobuline an die Proteine zu koppeln. Danach wurde die Membran 3 x 5 min in 1 x TBST-Lösung gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für 1 h in der sekundären Antikörperlösung in Blockierungslösung inkubiert. Danach wurde die Membran erneut für 3 x 15 min in 1 x TBST-Lösung gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte entweder mit dem SuperSignal® West Pico Detection Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)

bei Verwendung sekundärer Antikörper, die *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt waren oder bei Verwendung fluoreszenzmarkierter, sekundärer Antikörper mittels Li-Cor Nahinfrarots scanner (Li-cor Biosciences GmbH, Bad Homburg, Deutschland). Bei chemilumineszenten Nachweis erfolgte die Visualisierung der Proteine durch Entwicklung eines CL-Xposure™ Films (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) in der Dunkelkammer.

<u>Transferpuffer:</u>	<u>TBST-Puffer:</u>	<u>Blockierungslösung:</u>	<u>Ponceau-S-Lösung:</u>
48 mM Tris/HCl	150 mM NaCl	7,5 % Milchpulver	0,5 % Ponceau-S
39 mM Glycin	20 mM Tris/HCl	150 mM NaCl	1 % Essigsäure
1,3 mM SDS	0,05 % Tween® 20	20 mM Tris/HCl	
20 % (v/v) Methanol	pH 7,5	0,05 % Tween® 20	

2.7 Histochemie

Zur Analyse von Gewebsschnitten wurden histochemische Untersuchungen von Dr. Hendryk Aurich (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden in Paraffin eingelegte Tumorschnitte mit einer Dicke von 4 µm fixiert und mit Hämatoxylin sowie Eosin angefärbt, um zwischen nekrotischem und gesundem Gewebe zu unterscheiden. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff und wird in Form des Hämalauns zur Blau-Färbung saurer, basophiler Strukturen verwendet. Eosin hingegen ist ein synthetischer Farbstoff, der acidophile Strukturen rot färbt.

2.8 Rekombinante Reinigung von TIA1vl aus *E.coli*

Die Sequenz der TIA1vl-Isoform wurde in den Expressionsvektor pETSUMOadapt kloniert. Das resultierende Plasmidkonstrukt wurden in den Expressionsstamm transformiert (*E. coli* BL21-Star(DE3); siehe 2.2.1.2). Die Anzucht einer 50 ml Vorkultur erfolgte in LB-Medium unter Zusatz von Chloramphenicol über Nacht bei 37 °C. Die zu 1 % mit der Vorkultur angeimpfte Hauptkultur wurde bei 37 °C ohne Zugabe von Antibiotika bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 1 angezogen und die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Carl Roth, Karlsruhe) induziert. Nach 4 h Inkubation erfolgte die Zellernte mittels Zentrifugation für 20 min bei 6000 upm und 6 °C (SORVALL RC 6 Plus, Rotor: SLC 3000). Das Zellpellet wurde direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Aufreinigung des Proteins mittels Chromatographie-Säulen erfolgte mit einer FPLC (*fast protein liquid chromatography*) (ÄKTApurifier 100, GE Healthcare, Fairfield, CT, USA) und wurde von PD Dr. Ralph Golbik und Aniseh Poshtgohian Madi durchgeführt (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland).

2.9 *in vitro* Phosphorylierungsstudien

Für Phosphorylierungsstudien wurde das rekombinant gereinigte TIA1vl verwendet. Es sollte untersucht werden, ob TIA1vl Phosphorylierungsstellen besitzt, die über

rekombinant gereinigte Protein Kinase R (PKR) phosphoryliert werden können. Rekombinant gereinigte PKR wurde von Paul Knick (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Zunächst wurde PKR mit rATP und poly Polyinosin:Polycytidin (poly(I:C)) in Phosphorylierungspuffer für 1 h bei 30 °C präinkubiert. Dadurch wurde eine Autophosphorylierung der PKR durch doppelsträngige RNA (poly (I:C)) induziert und PKR in einen aktivierten Zustand überführt. Im Anschluss wurde weiteres rATP zugegeben sowie rekombinant gereinigtes TIA1. Dieser Ansatz wurde wiederum für 1 h bei 27 °C inkubiert mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.6.8). Als Positivkontrolle wurde der rekombinant gereinigte eukaryotische Initiations-Faktor 2 α (eIF2 α) als Substrat der PKR verwendet (Dr. René Geißler, Martin Luther Universität Halle-Wittenberg, Deutschland). Als Negativkontrolle wurde bovines Serum-Albumin (BSA; NEB, Ipswich, MA, USA) eingesetzt. Das Experiment wurde mit radioaktiv markiertem [γ -³²P]-ATP (Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte mittels Autoradiographie mit dem Kodak *Storage Phosphor Screen S 230* (GE Healthcare, Buckinghamshire, England). Dafür wurde das SDS-Gel in Fixier-Lösung für 30 min leicht geschüttelt und anschließend für 10 min in Geltrockner-Lösung inkubiert. Das Gel wurde dann auf Whatman®-Papier vakuumgetrocknet (Unigeldryer 3545, UniEquip, Planegg, Deutschland) und einer Autoradiographie unterzogen. Nach der Exposition des *screens* wurde dieser mit einem *Phosphor Imager* (Storm 860) eingelesen und mittels *Image Quant 5.0 ausgewertet* (beides Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA, USA).

Phosphorylierungsansatz:

100 nM PKR
 0,1 nM rATP
 20 ng poly (I:C)
 ad 20 μ l Phosphorylierungspuffer \rightarrow 60 min, 30 °C
 0,1 nM rATP/ 20 μ Ci [γ -³²P]-ATP
 500 nm Substrat (TIA1/eIF2 α /BSA) \rightarrow 60 min, 27 °C

Phosphorylierungspuffer:

20 mM Tris/HCl pH 7.5
 50 mM KCl
 2 mM MgCl₂
 2 mM MnCl₂
 5 % Glycerin

Fixier-Lösung:

40 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure

Geltrockner-Lösung:

7 % (v/v) Methanol
 7 % (v/v) Essigsäure
 7 % (v/v) Glycerin

2.10 *in vivo* Phosphorylierungsstudien

Die *in vivo* Phosphorylierung humaner Zellen wurde unter Verwendung von *orthophosphoric acid* ³²P (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Dafür wurden subkonfluent gewachsene Huh7-Zellen für 18 h in phosphatfreiem DMEM mit 10% FCS,

1% Penicillin/Streptomycin und 0.1% d-Biotin/ Hypoxanthin kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen in 1 ml phosphatfreiem DMEM-Komplettmedium mit 0,25 mCi *orthophosphoric acid* ^{32}P ($\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$) bei 37 °C für 4 h inkubiert. Das radioaktiv markierte Phosphat wurde während der *in vivo* Proteinsynthese in die Proteine eingebaut. Die Ernte der Zellen erfolgte bei 4 °C. Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und diese mit eiskaltem 1 x TBS gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurden je 10 cm Zellkulturplatte 500 µl IP-Lysepuffer zugegeben, die Zellen darin resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Extrakt für 30 min bei 4 °C und 13000 upm zentrifugiert. Der Überstand entspricht dem Gesamtzelllysat. Zur Analyse zellulärer Proteine wurde aus dem Gesamtzellextrakt durch Immunpräzipitation (siehe 2.6.4) mit entsprechenden Immunglobulinen das zu untersuchende Protein isoliert und durch SDS-PAGE (siehe 2.6.8) aufgetrennt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel in Fixier-Lösung für 30 min fixiert, leicht geschüttelt und anschließend für 10 min in Geltrockner-Lösung inkubiert. Das Gel wurde dann auf Whatman®-Papier vakuumgetrocknet (Unigeldryer 3545, UniEquip, Planegg). Die Visualisierung erfolgte mittels Autoradiographie auf den Kodak *Storage Phosphor Screen S 230* (GE Healthcare, Buckinghamshire, England). Der *screen* wurde mit einem *Phosphor Imager* eingelesen und mittels *Image Quant 5.0* ausgewertet (Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA, USA).

<u>1 x TBS:</u>	<u>IP-Lysepuffer:</u>	<u>Fixier-Lösung:</u>	<u>Geltrockner-Lösung:</u>
20 mM Tris/HCl	20 mM HEPES pH 7.9	40 % (v/v) Methanol	7 % (v/v) Methanol
150 mM NaCl	300 mM NaCl	10 % (v/v) Essigsäure	7 % (v/v) Essigsäure
pH 7.5	1 % (v/v) NP-40		7 % (v/v) Glycerin
	5 mM MgCl ₂		
	1 mM PMSF		

2.11 Statistik

Alle Datenpunkte, die in Balkendiagrammen oder Liniendiagrammen dargestellt sind, zeigen Mittelwerte biologischer Replikate und dazugehörige Standardabweichungen (Fehlerbalken) auf. Um die interexperimentelle Variabilität zu Normieren wurden die Werte der zu untersuchenden Probe auf den Wert der Kontrolle (z.B. unbehandelte Probe) beziehungsweise der Null-Werte (zeitabhängige Experimente) bezogen und als 100 % oder 1 definiert. Dadurch weisen die Kontrollwerte keine Varianz auf. Durch dieses Verfahren konnte keine statistische Auswertung der Signifikanzen erfolgen und Daten, die auf diese Weise generiert wurden, sind ausschließlich mit der Standardabweichung dargestellt. Daten die eine statistische Auswertung erlauben, wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Experimente mindestens drei Mal und unabhängig voneinander durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der HCV-Replikation auf die Expression verschiedener zellulärer Referenzgene

Für die durchgeführten Studien zur Untersuchung der viralen Replikation und deren Auswirkungen auf die zelluläre Genexpression wurden HCV- und WNV-Replikons als Modellsysteme verwendet, welche in Huh7-Zellen etabliert sind. Diese ermöglichen *in cellulo*-Analysen durch Transfektion von replikationsaktiver, nicht infektiöser Virus-RNA.

3.1.1 Verwendung von HCV- und WNV-Replikons

Zunächst wurde die Funktionalität der verwendeten HCV- und WNV-Replikons, auf qualitativer und quantitativer Ebene, hinsichtlich ihrer RNA-Replikation und Translation der viralen Proteine überprüft. Anwendung fanden die bicistronischen Replikons des Hepatitis-C-Virus und für Kontrolluntersuchungen das monocistronische Replikon des West-Nil-Virus (Abb. 6). Das vom HCV-Genom abgeleitete Replikon ist bekannt als JFH1-Replikon (pSGR-JFH1, *japanese fulminant hepatitis 1*-Replikon) und besitzt den Genotyp 2a (Kato *et al.*, 2001/2003a/2005). Es wird im Folgenden als HCV-Replikon (HCV) bezeichnet. Das vom WNV-Genom abgeleitete WNV-Replikon (NY2000-crow3356; Shi *et al.*, 2002) wird im Folgenden als WNV-Replikon (WNV) bezeichnet. Neben diesen replikationsaktiven Replikons (HCV, WNV) wurden korrespondierende, replikationsdefiziente Varianten verwendet, die im Folgenden als HCV-mut- und WNV-mut-Replikon bezeichnet werden. Diese Replikons (HCV-mut, WNV-mut) enthalten jeweils eine Punktmutation in der für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) kodierenden Sequenz (siehe 2.2). Die viralen Genome des HCV und WNV, sowie deren abgeleitete Replikons, weisen eine ähnliche strukturelle Organisation auf (Abb. 6). Ein Großteil der Strukturproteine kodierenden Sequenzen, die zur Assemblierung der Virushülle notwendig sind, ist in den HCV- und WNV-Replikons deletiert. Nur Teile des *core*-Proteins (HCV-, WNV-Replikon) bzw. des *envelope*-Proteins (WNV-Replikon) werden noch kodiert. Dadurch können keine infektiösen Virionen gebildet werden. Die virale RNA wird jedoch effizient repliziert, da die Replikon-RNA alle RNA-Elemente enthält und für alle Proteine kodiert, die für eine autonome RNA-Replikation notwendig sind (Lohmann *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2002). Zudem besitzen HCV- sowie WNV-Replikons an ihrem 3'-Ende eine authentische, virale 3'-UTR. Um die Generierung einheitlicher 3'-Termini zu gewährleisten, ist stromabwärts das Ribozym des Hepatitis-Delta-Virus (HDVr) kodiert (Abb. 6). Im Fall des bicistronischen HCV-Replikons wurden die viralen Proteine C, E1, E2, p7 und NS2 fast vollständig deletiert und durch den eine Geneticin-/Neomycin-Resistenzkassette (NEO, kodiert den Selektionsmarker Neomycin-Phosphotransferase II) sowie die IRES des Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV-IRES) ersetzt. Die EMCV-IRES

vermittelt die Translation der Nichtstrukturproteine NS3-NS5B als Polyprotein, welches durch virale und zelluläre Proteasen ko- und posttranslational prozessiert wird. Die HCV-5'-UTR und Teile der *core*-Protein kodierenden Sequenz beinhalten die HCV-IRES, welche die Translation der Neomycin-Phosphotransferase II-RNA vermittelt. Das monocistronische WNV-Replikon besteht aus einem einzelnen *open-reading frame* (ORF), welcher die Nichtstrukturproteine NS1-NS5 kodiert. Flankiert wird der ORF von authentischen WNV-UTRs, wobei die Translationsinitiation durch eine am 5'-Ende gelegene *cap*-Struktur (*cap*) vermittelt wird.

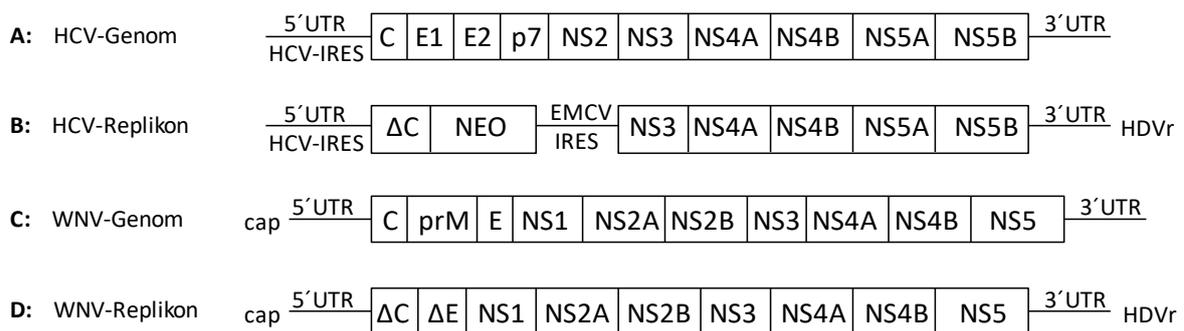


Abb. 6: Strukturelle Organisation der genomischen RNA und Replikon-RNA des Hepatitis-C-Virus und West-Nil-Virus

Darstellung der viralen Genome des Hepatitis-C-Virus (HCV) und des West-Nil-Virus (WNV) mit den abgeleiteten Replikons. Proteinkodierende Regionen sind eingerahmt, die nichttranslatierten Bereiche sind als schwarze Linien dargestellt. **A:** RNA-Genom des HCV aus Struktur- (C, E1, E2, p7) und Nichtstrukturproteinen (NS2-NS5B) sowie flankierenden, nichttranslatierten Regionen (5'-UTR mit HCV-IRES und 3'-UTR). **B:** Bei dem bicistronischen HCV-Replikon wurden die viralen Strukturproteine bis auf einen Teil des *core*-Proteins (ΔC) deletiert und durch eine Geneticin-/Neomycin-Resistenzkassette (NEO) sowie EMCV-IRES ersetzt. Die N-terminal gelegene 5'-UTR kodiert zusammen mit ΔC die HCV-IRES. Die Translation der viralen NS-Proteine (NS3-NS5B) wird an der heterologen IRES des EMCV initiiert. C-terminal werden die NS-Proteine von der 3'-UTR mit Ribozym des Hepatitis-Delta-Virus (HDVr) flankiert. **C:** Das RNA-Genom des WNV ist einzelsträngig und von positiver Orientierung. Es ist ca. 11 kb lang und kodiert für Struktur- (C= *core*-Protein, prM= *premembrane*-Protein, E= *envelope*) und NS-Proteine (NS1-NS5) sowie die flankierenden 5'- bzw. 3'-UTRs. Am 5'-Ende trägt die WNV-RNA eine *cap*-Struktur (*cap*) zur Initiation der Translation. Der ORF kodiert für ein Polyprotein. **D:** Bei dem monocistronischen WNV-Replikon ist der Großteil der kodierenden Sequenz für die Strukturproteine deletiert. Der ORF wird von der 5'-UTR mit *cap*-Struktur bzw. der 3'-UTR mit HDVr flankiert.

Die Präparation viraler Replikon-RNA sowie deren transiente Transfektion in humane Zellen ist bereits etabliert worden (Kato *et al.*, 2003b; Lohmann *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2002). Dennoch soll zum besseren Verständnis der Nachweis viraler RNA in transfizierten Zellen exemplarisch dargestellt werden. Nach der *in vitro*-Transkription von Replikon-RNA aus cDNA-kodierenden Plasmiden (siehe 2.5.2) wurde die strukturelle Integrität der RNA-Produkte durch elektrophoretische Auftrennung überprüft (Abb. 7). Anschließend wurden 3 µg der viralen Replikon-RNA mittels Elektroporation in Huh7-Zellen transfiziert (siehe 2.2.2.2.3) und die Zellen bis zur Probenentnahme kultiviert (siehe 2.2.2). Wird im Folgenden von transienter Transfektion gesprochen, sind über Elektroporation transfizierte Zellen gemeint, die maximal 96 h nach der Transfektion des Virus-Replikons geerntet wurden. Zur Etablierung einer persistenten HCV-Zelllinie (HCV-pers.) wurden die

mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen weiter kultiviert und durch Geneticin Zugabe auf HCV-RNA replizierende Zellen selektiert (siehe 2.2.2). Die Etablierung dieser persistenten HCV-Zelllinie erfolgte durch Dr. René Geißler (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland). Um den Verlauf der viralen Replikation nachzuweisen, können virale Proteine oder virale RNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion detektiert werden. Der Nachweis und die Quantifizierung der viralen RNA erfolgte durch quantitative *real-time*-PCR (qRT-PCR; siehe 2.4.2). Dafür wurde RNA aus den transfizierten Zellen isoliert (siehe 2.2.2.6) und mittels virus-spezifischer Primer (JFH-fwd/-rev, WNV-NS5-fwd/-rev; siehe Anhang 7.1, Tab. 7) in cDNA umgeschrieben (siehe 2.4.5).

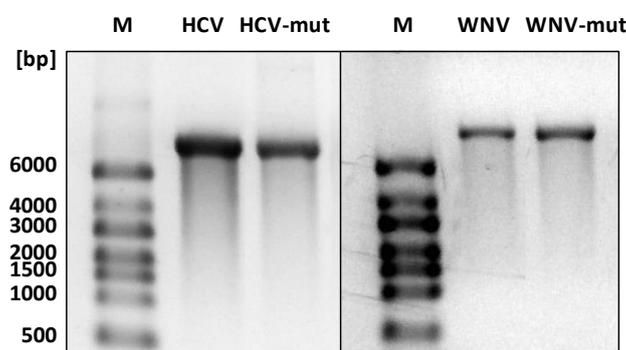


Abb. 7: Nachweis der HCV- und WNV-Replikon-RNA

Von den *in vitro* transkribierten Replikon-RNAs wurden je 500 ng RNA-Produkte auf einem 1%igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Die replikationsaktiven (HCV) und replikationsdefizienten (HCV-mut) HCV-Replikons haben eine Länge von ca. 8000 bp und die entsprechenden WNV-Replikons (WNV, WNV-mut) von ca. 9000 bp. Die Größen des RNA-Markers (M: RiboRuler *High Range* RNA Marker) sind indiziert.

Zur Berechnung der relativen, RNA-Quantitäten wurde die ΔC_T -Methode verwendet (siehe 2.4.2). Als internes Referenzgen wurde Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gemessen. Es handelt sich dabei um ein sogenanntes *house keeping* Gen, dessen Expressionslevel innerhalb der Zelle in der Regel auf einem gleichbleibenden Niveau gehalten wird (Watson *et al.*, 1972; Buehner *et al.*, 1973). Die gemessene Replikon-RNA-Menge zum Zeitpunkt der Transfektion (0 h *post transfectionem*; *p.t.*) wurde als 100 % bzw. 1 definiert, um die interexperimentelle Variabilität zu normieren. Die darauf folgenden Zeitwerte wurden relativ darauf bezogen (siehe 2.11). Abbildung 8 (A und B) zeigt exemplarisch den Verlauf der viralen Replikation. Erwartungsgemäß konnte nur in Zellen mit replikationsaktiven HCV- und WNV-Replikons (HCV, WNV) eine mit der Zeit ansteigende Menge an viraler Replikon-RNA nachgewiesen werden. Wobei die Menge an viraler Replikon-RNA bis 48 h *p.t.* kontinuierlich anstieg und danach wieder absank (Abb. 8, A und B). Dabei wies das WNV-Replikon eine ca. 10-fach stärkere virale RNA-Replikation auf, als das HCV-Replikon. Unmittelbar nach der Transfektion (0 h *p.t.*) konnten vergleichbare Quantitäten an viraler RNA in den Proben der replikationsaktiven (HCV, WNV) und replikationsdefizienten Replikons (HCV-mut,

WNV-mut) detektiert werden. Somit besaßen die Proben eine vergleichbare Ausgangsmenge an viraler RNA in den jeweiligen Experimenten, wodurch eine bessere Vergleichbarkeit ermöglicht wurde.

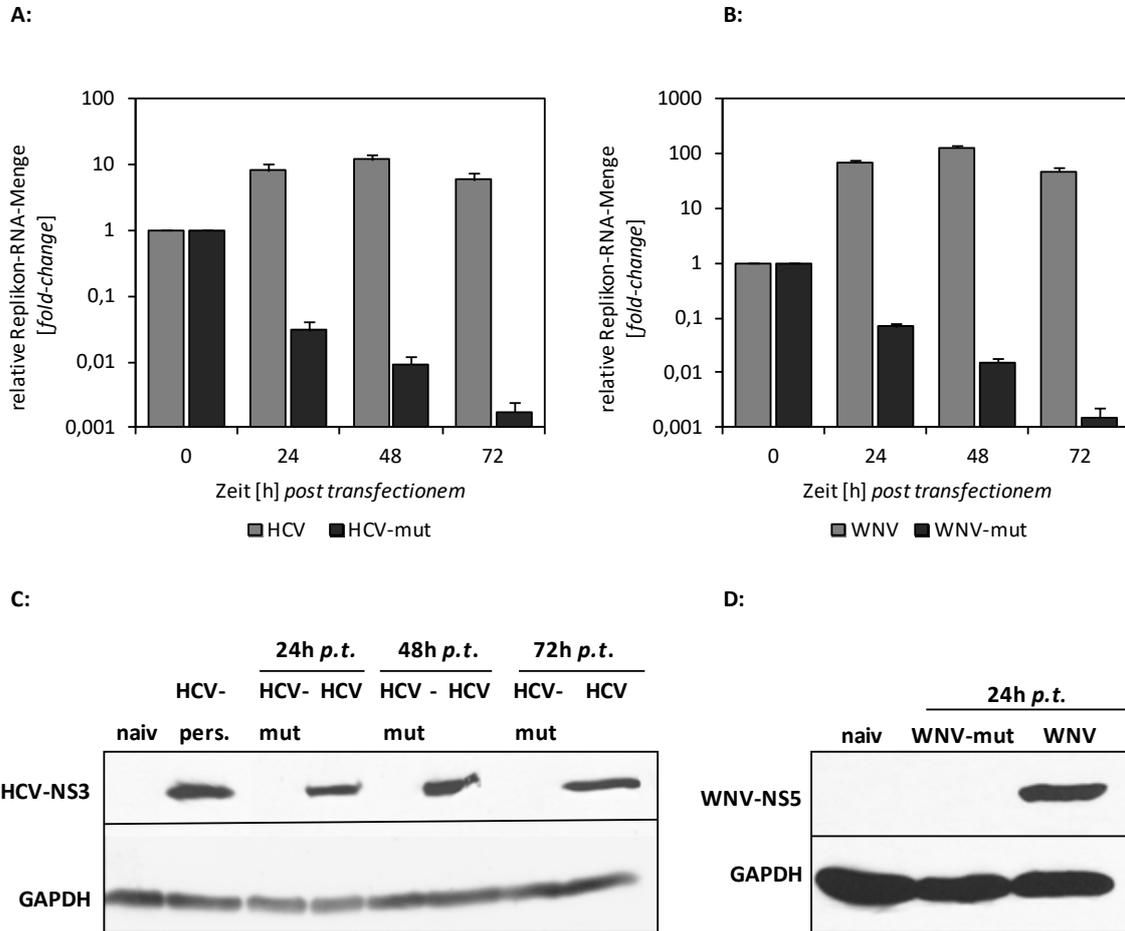


Abb. 8: Nachweis der Replikation der HCV- und WNV-Replikons in Huh7-Zellen

A: Huh7-Zellen wurden mit den HCV-Replikons (HCV, HCV-mut) transient transfiziert. Über einen Zeitraum von 72 h wurden alle 24 h Proben entnommen und die relative Menge an viraler Replikon-RNA (NS3-kodierender Bereich) wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Berechnung der zeitabhängigen Werte erfolgte über die ΔC_T -Methode. Der jeweilige Ausgangswert (0 h) wurde dabei 1 gleichgesetzt. Die nachfolgend gemessenen Quantitäten relativ darauf bezogen und als x-fache Änderung (*fold-change*) in einem halblogarithmisch aufgetragenen Diagramm angegeben. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von jeweils mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar. **B:** Analoge Experimente zur Detektion der WNV-NS5-RNA wurden mit Zellen durchgeführt, die mit dem WNV- bzw. WNV-mut-Replikon transfiziert wurden. **C:** Repräsentativer Western Blot zum Nachweis des viralen HCV-NS3-Proteins. Naive Huh7-Zellen wurden transient mit dem HCV- bzw. HCV-mut-Replikon transfiziert. Zusätzlich wurden naive Huh7-Zellen (naiv) sowie Zellen der persistenten HCV-Zelllinie (HCV-pers.) als Kontrollen mitgeführt. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde zytoplasmatisches Zelllysats gewonnen. Davon wurden 20 μ g Gesamtprotein mittels 10%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion des viralen HCV-NS3-Proteins erfolgte durch Immunoblot unter Verwendung des HCV-NS3-Antikörpers. Als Ladekontrolle wurde GAPDH mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Exposition des CL-Xposure™ Films zum Immunoblot betrug 5 sec. Die Bande des NS3-Proteins migriert auf einer Höhe von ca. 70 kDa, die des GAPDH-Proteins bei ca. 36 kDa. **D:** Analoger Nachweis des WNV-NS5-Proteins (130 kDa) 24 h p.t. in naiven sowie transient mit dem WNV- bzw. WNV-mut-Replikon transfizierten Huh7-Zellen. Protein-Marker: Page Ruler™ prestained ladder.

Aufgrund zellulärer Degradationsprozesse nahm die detektierbare Menge der nicht replikationsaktiven Replikon-RNA zu späteren Zeitpunkten stetig ab. Virale Proteine können durch Immunoblot und indirekter Immunfluoreszenz detektiert werden. In Abbildung 8 (C, D) ist der Nachweis der viralen HCV-NS3- und WNV-NS5-Proteine mittels Immunoblot exemplarisch dargestellt. Dafür wurde zytoplasmatisches Zellextrakt gewonnen (siehe 2.6.2) und über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, siehe 2.6.8) aufgetrennt. Die Detektion des HCV-NS3-Proteins und des WNV-NS5-Proteins erfolgte mittels Immunoblot (siehe 2.6.9). Bereits 24 h *p.t.* konnten die viralen Proteine HCV-NS3 (Abb. 8, C) und WNV-NS5 (Abb. 8, D) ausschließlich in den Zellen mit replikationsaktiven Replikons (HCV, WNV) nachgewiesen werden. Der alternative Nachweis viraler Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz (siehe 2.6.3) diente hauptsächlich zur Bestimmung der Transfektionsrate. Dafür wurden die entsprechenden Proben auf Deckgläschen fixiert, die viralen Proteine mittels fluoreszenzgekoppelter, spezifischer Antikörper markiert und mikroskopisch ausgewertet. Das Verhältnis der Anzahl positiv transfizierter Zellen zur Gesamtzellzahl ergibt die Transfektionsrate. Im Fall der HCV- und WNV-Replikons lag die Transfektionsrate innerhalb der Experimente bei 70-90 % (Daten nicht dargestellt). Da eine kontinuierliche Translation viraler Proteine eine effiziente virale Replikation voraussetzt, wurde von der Detektion viraler Proteine auch auf eine effiziente Replikation geschlossen.

Die HCV- und WNV-Replikonsysteme konnten in Huh7-Zellen demnach etabliert werden.

3.1.2 Einfluss der HCV-Replikation auf die mRNA-Synthese verschiedener zellulärer Referenzgene

Im Weiteren sollte überprüft werden, ob sich in Anwesenheit replizierender HCV-RNA die Quantitäten zellulären mRNAs verändern, die im Zusammenhang mit stressinduzierten Zellreaktionen, der HCV-Replikation bzw. der Entwicklung von Tumorgewebe stehen. Dafür wurden exemplarisch die mRNAs des *nuclear factor 90* (NF90), des *vascular endothelial growth-factor A* (VEGF-A, im Folgenden als VEGF bezeichnet) und der *mitogen-activated protein-kinase phosphatase 1* (MKP1) überprüft. NF90 kann an die HCV-RNA assoziieren und ist vermutlich an der Regulation der viralen Replikation beteiligt (Isken *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2014). MKP1 ist hingegen an stressinduzierten Signalkaskaden beteiligt, die auch im Zusammenhang mit Virusinfektionen auftreten können. Dabei werden MAP-Kinasen durch MKP1 inaktiviert. MKP1 agiert somit als negativer Regulator inflammatorischer Prozesse, die über *Toll-like-Rezeptoren* induziert wurden (Sun *et al.*, 1993; Chi *et al.*, 2006; Salojin *et al.*, 2006; Abraham *et al.*, 2006). Da HCV-Infektionen häufig zur Entstehung chronischer, hepatozellulärer Entzündungen und hepatozellulärer Karzinome führen, spielt in diesem Zusammenhang auch VEGF als pro-angiogenes Zytokin eine wichtige Rolle. Es konnte bereits eine erhöhte Synthese von VEGF in HCV-infizierten

Patienten nachgewiesen werden (Helaly und Shamaa, 2006). Daher könnte die Expression dieser Gene von besonderer Bedeutung für die Pathogenese von HCV-Infektionen sein (siehe Diskussion, 4.2, 4.3). Für die Analyse der mRNA-Quantitäten von VEGF, NF90 und MKP1 wurden Huh7-Zellen mit den HCV-Replikons (HCV, HCV-mut) transient transfiziert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 h kultiviert und zu den indizierten Zeiten nach der Transfektion mit Trizol lysiert (siehe 2.2.2.6). Daraufhin wurde die Gesamt-RNA extrahiert (siehe 2.5.1) und diese mit spezifischen Primern in cDNA transkribiert (siehe 2.4.5). Unter Verwendung der generierten cDNAs wurden die Quantitäten der VEGF-, NF90- und MKP1-mRNA mittels qRT-PCR zu den indizierten Zeitpunkten ermittelt. Die mRNA-Mengen wurden mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet (siehe 2.4.2). Dabei wird der Unterschied zwischen zwei Versuchsgruppen (HCV, HCV-mut) dargestellt. Die Messwerte zum Zeitpunkt der Transfektion (0 h) wurden 100 % gleichgesetzt und die folgenden Messwerte wurden prozentual darauf bezogen (siehe 2.11). Es konnte gezeigt werden, dass sich die relative Transkriptmenge von VEGF in den Zellen auf das ca. 6-Fache erhöht (48 h *p.t.*), die transient mit dem replikationsaktiven HCV-Replikon transfiziert wurden. Als Bezugswert diente die Transkriptmenge von VEGF in Zellen, die mit dem replikationsdefizienten HCV-mut-Replikon transfiziert wurden (Abb. 9, A). Dies korreliert mit bereits publizierten Daten, die jedoch eine schwächere Erhöhung der VEGF-mRNA-Menge zeigten (Nasimuzzaman *et al.*, 2007). Die relative Transkriptmenge von MKP1 war ebenfalls stark erhöht, während es keine Unterschiede in der NF90-mRNA-Menge zwischen den Versuchsgruppen gab (Abb. 9, A). Um zu überprüfen, ob die detektierten Anstiege in der MKP1- und VEGF-mRNA abhängig von der viralen HCV-Replikation sind, wurden analoge Experimente durchgeführt, bei denen die Zellen oxidativen Stress ausgesetzt wurden anstatt der HCV-Replikation. Dafür wurden naive Huh7-Zellen für 3 h mit 2,5 mM Di-Natriumhydrogen-Arsenat-Heptahydrat (Arsenatreagenz) behandelt (siehe 2.2.2.5). Arsenat löst in Zellen oxidativen Stress aus, wenn eine das physiologische Maß überschreitende Menge reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) in der Zelle vorhanden sind. Zusätzlich schädigt Arsenat, durch seine Strukturähnlichkeit mit Phosphat, die glykolytische ATP-Gewinnung (Wirth und Gloxhuber, 1993). Durch die Applikation des Arsenatreagenz wurde die Menge der MKP1-mRNA in naiven Huh7-Zellen auf das ca. 9-Fache gesteigert. Die Transkriptmengen von VEGF und NF90 verblieben hingegen unbeeinflusst (Abb. 9, D). Dies impliziert, dass die verstärkte Synthese der VEGF-mRNA in Zellen, die mit dem HCV-Replikon transfiziert wurden (Abb. 9, A), mit der Replikation viraler RNA assoziiert ist. Hingegen scheint es sich bei MKP1 um einen HCV-unspezifischen Effekt zu handeln. Analoge Transfektionsexperimente wurden mit den WNV-Replikons (WNV, WNV-mut) durchgeführt (Abb. 9, B). Hier zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung des relativen MKP1-Transkripts 24 h *p.t.* und 48 h *p.t.* in WNV-RNA-replizierenden Zellen im Bezug zu Zellen, die mit dem replikationsdefizienten WNV-mut-Replikon transfiziert wurden (Abb. 9, B). Allerdings änderte sich hier die relative Transkriptmenge der VEGF-

mRNA nicht. Die NF90-mRNA-Menge blieb ebenfalls unverändert. Parallel dazu wurde die VEGF-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie (HCV-persistent) analysiert. Dabei zeigte sich ebenso eine Steigerung der VEGF-Transkriptmenge (ca. 4-fach) im Vergleich zu naiven Huh7-Zellen (Abb. 9, C). Insgesamt fiel die relative Erhöhung der VEGF-Transkriptmenge in der persistenten HCV-Zelllinie etwas geringer aus, als in den transient transfizierten Zellen.

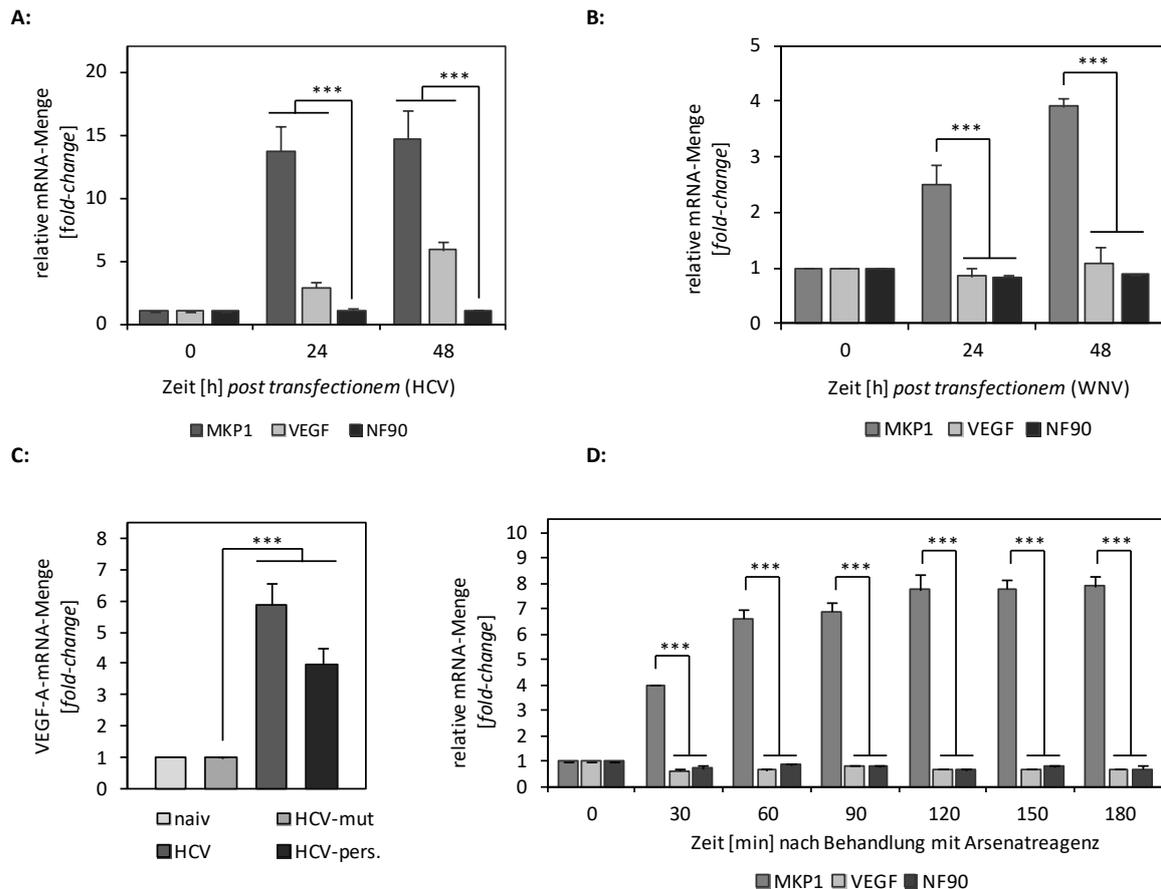


Abb. 9: Die VEGF-mRNA-Synthese ist unter dem Einfluss der HCV-Replikation spezifisch hochreguliert

Messung relativer Veränderungen der mRNA-Quantitäten von VEGF, MKP1 und NF90 mittels qRT-PCR. Die Probenentnahme erfolgte zu den indizierten Zeiten. Der jeweilige Ausgangswert (0 h bzw. 0 min bei A, B, D) oder Wert der Kontrollgruppe (Huh7 bei C) wurde dabei 100 % gleichgesetzt und die nachfolgenden Werte prozentual darauf bezogen. Es wurden jeweils ca. 8×10^6 Zellen eingesetzt. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von jeweils 4 unabhängigen Experimenten dar. Die Mittelwerte wurden mittels eines Studentischen T-Tests hinsichtlich signifikanter Abweichung überprüft. (***) $P \leq 0,0001$. **A und B:** Naive Huh7-Zellen wurden transient mit den HCV- (A) bzw. WNV-Replikons (B) transfiziert. Über einen Zeitraum von 48 h p.t. wurden Proben entnommen und die relative Transkriptmenge von VEGF, NF90 und MKP1 der zu untersuchenden Probe (HCV, WNV), bezogen auf das Zielgen der Kontrolle (HCV-mut, WNV-mut), bestimmt. Die Berechnung erfolgte mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode. **D:** Alternativ wurden naive Huh7-Zellen mit 2,5 mM Di-Natriumhydrogen-Arsenat-Heptahydrat (Arsenatreagenz) behandelt und die mRNA-Quantitäten von VEGF, NF90 und MKP1 über die ΔC_T -Methode bestimmt. **C:** Vergleich der relativen VEGF-mRNA-Menge (ΔC_T -Methode). Analysiert wurden naive und transient mit den HCV-Replikons (HCV, HCV-mut) transfizierte Huh7-Zellen sowie die persistente HCV-Zelllinie (HCV-pers.).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die relative Transkriptmenge von VEGF nur im Zusammenhang mit der Replikation von HCV-RNA erhöht wurde. Die relative Transkriptmenge von MKP1 konnte hingegen auch durch andere Stimuli, wie die Replikation der WNV-RNA oder oxidativem Stress gesteigert werden. Die Ergebnisse wurden als Indiz gewertet, dass es sich bei der quantitativen Erhöhung der VEGF-mRNA in den HCV-Replikon transfizierten Zellen um einen HCV-induzierten Effekt handelt, welcher spezifisch für HCV sein könnte. Die folgende Arbeit konzentrierte sich entsprechend darauf, die Ursachen der verstärkten Expression von VEGF zu untersuchen.

3.1.3 VEGF-Proteinexpression in transient HCV-RNA replizierenden Zellen

Aufgrund der spezifischen Erhöhung der VEGF-Transkriptmenge unter dem Einfluss der HCV-Replikation sollte nachfolgend untersucht werden, ob dies auch in einer verstärkten Translation von VEGF resultiert. Dafür wurde ein kommerziell erhältliches *enzyme-linked immunosorbent assay-kit* (ELISA; siehe 2.6.7) verwendet. Da es sich bei VEGF um ein von Zellen sekretiertes Protein handelt, wurde der Kulturüberstand naiver Huh7-Zellen und der persistenten HCV-Zelllinie sowie transient mit den HCV-Replikons transfizierter Huh7-Zellen (HCV, HCV-mut) untersucht. Als Kontrolle und zur Berechnung der Proteinkonzentrationen wurde eine Standardkurve mit gereinigtem VEGF-Protein erstellt. In den Versuchsansätzen wurden gleiche Gesamtproteinmengen eingesetzt, die zuvor mittels Bradford-Messung berechnet wurden (BIO-RAD Protein *assay*, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Innerhalb der Experimente wurde mit gleichen Zellzahlen (ca. 8×10^6 Zellen) als Ausgangsmaterial gearbeitet. Da sich jedoch die Wachstumsraten sowie die Quantität und Art der sekretierten Proteine zwischen den Zelllinien und den transient transfizierten Zellen aufgrund der Transfektionsstresses unterscheiden können, wurden die Messungen mit äquivalenten Gesamtproteingen an im Kulturüberstand befindlichen Proteinen durchgeführt. Wie in Abbildung 10 zu erkennen ist, wiesen naive Huh7-Zellen (Abb. 10, B) bereits eine basale Sekretion von VEGF auf. Im Vergleich dazu zeigte sich im Kulturüberstand der persistenten HCV-Zelllinie ein ca. 7-facher Anstieg der VEGF-Proteinmenge, auf ca. 1500 pg/ml (Abb. 10, B). Die Kulturüberstände der transient mit HCV-RNA transfizierten Zellen wurden 24 h bzw. 48 h *p.t.* geerntet und miteinander verglichen. In beiden Versuchsansätzen zeigten sich 24 h *p.t.* ähnliche Mengen an sekretiertem VEGF. In HCV-RNA replizierenden Zellen erhöhte sich die Menge des sekretierten VEGF 48 h *p.t.* auf das ca. 6-Fache. Verglichen mit Zellen die das replikationsdefiziente HCV-Replikon tragen, wiesen die HCV-RNA replizierenden Zellen die ca. zweifache VEGF-Konzentration im Kulturüberstand auf. Über den gesamten Verlauf der Experimente blieb die intrazellulär gemessene VEGF-Proteinmenge konstant (nicht dargestellt). Daher ist davon auszugehen, dass der gesteigerten Sekretion von VEGF eine verstärkte Translation der VEGF-mRNA zugrundeliegt.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der VEGF-Transkriptmenge (siehe 3.1.2) im Zuge der HCV-Replikation auch in einer verstärkten Translation des Proteins resultiert.

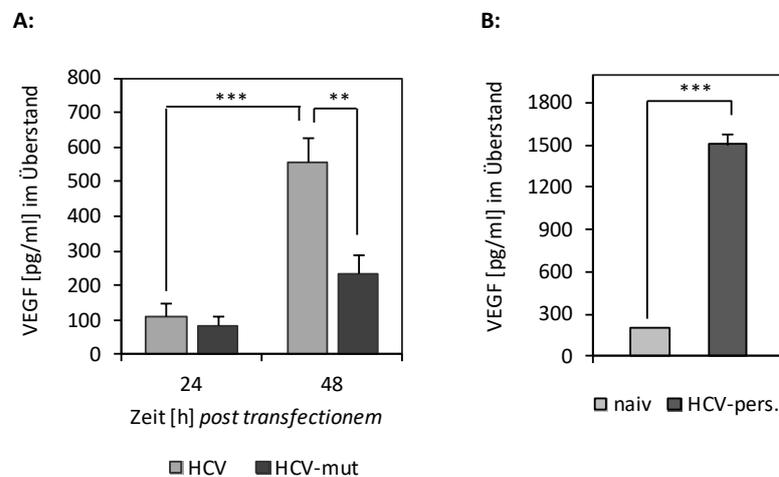


Abb. 10: Die HCV-Replikation ist assoziiert mit einer erhöhten Sekretion von VEGF in das Kulturmedium

A: Naive Huh7-Zellen wurden transient mit 3 µg Replikon-RNA (HCV, HCV-mut) transfiziert und über einen Zeitraum von 48 h kultiviert. Der Kulturüberstand wurde 24 h bzw. 48 h p.t. von den Zellen abgenommen. Die Quantität des sekretierten VEGF-Proteins wurde mittels ELISA (*human VEGF-ELISA Core-Kit*) analysiert. Es wurden gleiche Quantitäten Gesamtprotein eingesetzt. **B:** Analog dazu wurden die VEGF-Proteinmengen bestimmt, welche durch naive Huh7-Zellen bzw. die persistente HCV-Zelllinie (HCV-pers.) sekretiert wurden. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten dar. Die Mittelwerte wurden mittels eines Studentischen T-Tests hinsichtlich signifikanter Abweichung geprüft (***) $P \leq 0,0001$; (**) $P \leq 0,001$.

3.1.4 HCV-assoziierte hepatozelluläre Karzinome zeigen eine erhöhte VEGF-Expression und Vaskularisierung

Um im Weiteren zu untersuchen, ob die verstärkte *VEGF*-Genexpression auch bei der Entstehung von HCV-induzierten hepatozellulären Karzinomen (HCC) nachzuweisen ist, wurde ein *Xenograft*-Tiermodell verwendet. Die Entwicklung von HCC durch HCV wird maßgeblich durch Zytokine, wie VEGF, und deren Auswirkungen bei der Entstehung chronischer Leberentzündung sowie der Leberzellproliferation und Vaskularisierung unterstützt (Machida *et al.*, 2004; Spangenberg *et al.*, 2009). Um die Relevanz der HCV-Replikation im Kontext von Tumor Entstehung bzw. Nährstoffversorgung durch VEGF-induzierte Neovaskularisierung näher zu beleuchten, wurden naive Huh7-Zellen sowie Zellen der HCV-Zelllinie (HCV-pers.) in 7 Wochen alte, immundefiziente Mäuse (NU/NUFoxn1^{nu}) injiziert. Die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden von Dr. Hendryk Aurich und Alexander Mensch (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland) durchgeführt und die Ergebnisse freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Im Kontext dieser Arbeit sollen sie als ergänzendes Material verstanden werden. Die Injektion von Huh7-Zellen und Zellen der persistenten HCV-Zelllinie (jeweils 3×10^6 Zellen in 200 µl 1 x PBS) erfolgte subkutan in die Flanken der Mäuse. Aufgrund des Fehlens des Thymus sind die Tiere immundefizient und entwickelten daraufhin Tumore, welche 3

Wochen nach Zellinjektion entnommen und weiter analysiert wurden. Einerseits wurden 4 µm Paraffin-Gewebeschnitte für histochemische Untersuchungen genutzt bzw. einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) unterzogen. Andererseits wurden Proben für Immunoblot-Analysen aufgereinigt, um die intratumorale Präsenz von VEGF und HIF1α zu bestimmen. HIF1α wurde untersucht, da es Bestandteil des HIF1-Transkriptionsfaktors ist, welcher sich auf die Transkription des *VEGF*-Gens auswirkt. Nasimuzzaman und Kollegen beschrieben 2007 bereits die Stabilisierung der HIF1α-Untereinheit in Huh7-Zellen, die mit dem *full-length* HCV-Genom oder HCV-Replikons transfiziert wurden (Nasimuzzaman *et al.*, 2007). In Abbildung 11 wird deutlich, dass aus naiven Huh7-Zellen entstanden Tumore (Abb. 11, A, rechts) einen höheren Anteil an nekrotischem, abgestorbenem Gewebe (hellblau) aufwiesen als Tumorgewebe, welches aus Zellen der persistenten HCV-Zelllinie entstanden war (Abb. 11, A, links).

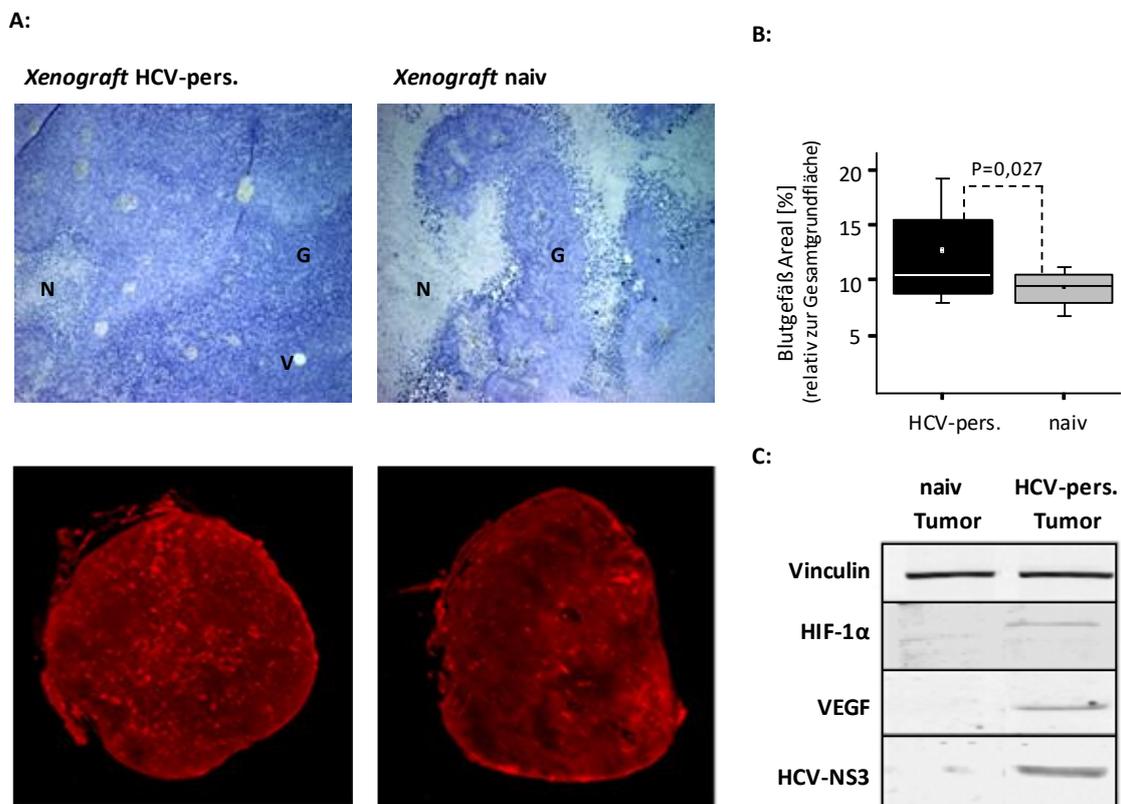


Abb. 11: Xenotumore aus der persistenten HCV-Zelllinie weisen eine erhöhte Vaskularisierung sowie erhöhte VEGF- und HIF1α-Proteinmengen auf

NU/NU-Foxn1^{nu}-Mäusen wurden naive Huh7-Zellen (naiv) bzw. Zellen der persistenten HCV-Zelllinie (HCV-pers.) subkutan injiziert, aus denen sich *Xenotumore* entwickelten. **A:** Aus den Tumoren wurden HE-Färbungen (**A, oben**) an 4 µm dicken Paraffin-Schnitten durchgeführt und in 100-facher Vergrößerung dargestellt. Nekrotisches Gewebe ist hellblau gefärbt (N), intaktes Gewebe weist eine dunkelblaue Färbung (G) auf und Blutgefäße sind mit V markiert. Neben der HE-Färbung wurden auch Infrarot Bilder (**A, unten**) der Gewebeschnitte bei 700 nm und 800 nm (Auflösung 21 µm) aufgezeichnet. **B:** Die relative Gesamtfläche der Blutgefäße wurde im *Boxplot* aufgetragen. **C:** Das Tumormaterial wurde zur Proteinisolierung verwendet und 30 µg Proteinlösung wurden durch 12%igen SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das virale HCV-NS3-Protein (68 kDa) sowie Vinculin (120 kDa), HIF1α (116 kDa) und VEGF (42 kDa) wurden im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Detektion der Signale erfolgte über den Li-Cor Nahinfrarot-scanner. Vinculin diente als interne Referenz. Die Experimente wurden mit 3 verschiedenen Mäusen durchgeführt.

Intaktes Gewebe (dunkelblau) befand sich verstärkt in der näheren Umgebung von Gefäßen, welche die Nährstoffversorgung gewährleisten. Beim Fehlen von Gefäßen wird durch Unterversorgung und hypoxische Bedingungen die Nekrose des Gewebes induziert. Tumore, die aus HCV-RNA replizierenden Zellen entstanden sind, wiesen im Vergleich zu Tumoren aus naiven Huh7-Zellen stellenweise großvolumige Gefäße und eine erhöhte Vaskularisierung auf. Neben den HE-gefärbten Schnitten wurde die verstärkte Vaskularisierung ebenfalls in Infrarot *scans* bei 700 nm und 800 nm (Abb. 11, A, unten) detektiert. Die relativen Gesamtflächen der Blutgefäße quantifiziert und im *Boxplot* aufgetragen. Tumore, die aus HCV-RNA replizierenden Zellen entstanden sind (HCV-pers.), wiesen eine etwa doppelte so große Fläche an Blutgefäßen auf verglichen mit Tumoren aus Huh7-Zellen (naiv; Abb. 11, B). Bei der Analyse der Tumorproben (Abb. 11, C) wurde deutlich, dass im Vergleich zu den Tumoren aus Huh7-Zellen, sowohl das VEGF- als auch das HIF1 α -Protein in den Tumoren aus HCV-RNA replizierenden Zellen erhöht war. Die Ergebnisse korrelierten mit den vorangegangenen Erkenntnissen zur erhöhten *VEGF*-Genexpression (siehe 3.1.2; 3.1.3) in HCV-RNA replizierenden Zellen.

Zusammenfassend konnte neben einer verstärkten Vaskularisierung auch die zuvor beschriebene Erhöhung der VEGF-Proteinmenge in HCV-assoziierten Tumoren des Maus-*Xenograft*-Modells detektiert werden. Verglichen mit Tumoren, die aus Huh7-Zellen entstanden sind, korrelierte dies mit verstärkt detektierbarem HIF1 α -Protein sowie mit einer Reduktion von nekrotischem Gewebe. Dies ist eine Indikation dafür, dass die HCV-Replikation in den Tumoren zu einer verstärkten *VEGF*-Genexpression und damit zu einer vermehrten Vaskularisierung sowie besserer Nährstoffversorgung des Tumors beiträgt. Somit hat die Replikation von HCV-RNA einen signifikanten Einfluss auf die Pathogenese von Leberzelltumoren und die Expression von VEGF. Die Daten deuten an, dass dies durch den HIF1 α -Signalweg induziert werden könnte.

3.2 Posttranskriptionelle Regulation der VEGF-mRNA

In den vorhergehenden Experimenten wurde eine Erhöhung der *VEGF*-Genexpression in Zellen detektiert, die mit dem replikationsaktiven HCV-Replikon transfiziert wurden. Es sollte im Folgenden differenziert werden, ob sich die Anreicherung der VEGF-mRNA unter viraler RNA-Replikation vorrangig auf Transkriptionseffekte zurückführen lässt oder möglicherweise auch auf verringerte Abbauraten der VEGF-mRNA (posttranskriptionelle Stabilisierung). Die transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation der Genexpression kann dabei gekoppelt oder einzeln vorliegen, wobei Mischeffekte schwierig zu differenzieren sind. In ungestressten Zellen mit normaler Nährstoffversorgung besitzt die VEGF-mRNA eine kurze, zelltypabhängige Halbwertszeit (Ikeda *et al.*, 1995; Claffey *et al.*, 1998). Die Halbwertszeit ist dabei definiert als Zeit, nach der sich die Quantität der Ausgangs-mRNA halbiert hat. Neben der 5'-*cap*-Struktur und

dem Poly-A-Ende wird die Stabilität von mRNAs durch Sequenzelemente bestimmt, die sich sowohl in der kodierenden Region sowie an den UTRs der mRNA befinden. So kann beispielsweise die Bindung von Proteinen an die mRNA den nukleolytischen Abbau der mRNA inhibieren oder fördern, was in einer Akkumulation bzw. Verringerung der entsprechenden mRNA resultiert (Garneau *et al.*, 2007). Für VEGF ist eine moderate, posttranskriptionelle Stabilisierung bereits in Brustkrebszellen beschrieben worden (Vumbaca *et al.*, 2008). Die Abgrenzung der posttranskriptionellen Regulation von mRNAs wird durch die Analyse der entsprechenden mRNA-Degradation ermöglicht. So kann die Halbwertszeit von mRNAs mit Hilfe von Inhibitoren, welche die zelluläre RNA-Synthese blockieren, und der *RNA synthesis inhibitor-chase method* bestimmt werden (Egyhazi 1974a, b/1976; Sehgal *et al.*, 1978; siehe 2.4.3). Durch die Hemmung der RNA-Synthese können Rückschlüsse auf den Abbau und die Stabilität von mRNAs gezogen werden, die bereits vor der Applikation des Inhibitors existierten.

3.2.1 Posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in transient HCV-RNA replizierenden Zellen

Entsprechend wurde untersucht, ob unter dem Einfluss der HCV-Replikation neben der quantitativen Erhöhung von VEGF und seiner mRNA auch eine posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA vorlag. Dafür wurde die Degradation der VEGF-mRNA unter Einwirkung von Actinomycin D *in cellulo* untersucht. Dieses blockiert die DNA-abhängige RNA-Synthese indem es in die *template*-DNA interkaliert. Actinomycin D hat dabei keinen Einfluss auf die virale RNA-Replikation, da diese von einer viruseigenen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (NS5B) gewährleistet wird, die nicht Actinomycin D-sensitiv ist. Zur Untersuchung des zellulären VEGF-mRNA-Abbaus wurden naive Huh7-Zellen mit den HCV- bzw. HCV-mut-Replikon transient transfiziert (siehe 2.2.2.2.3) und über einen Zeitraum von 48 h kultiviert. Im Anschluss wurde Actinomycin D (1,6 µM) in das Zellkulturmedium appliziert (siehe 2.2.2.4) und die Zellen für weitere 240 min inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Probenentnahme in Abständen von 30 min. Die gewonnenen Zellproben wurden, wie unter 2.5.1 beschrieben, mit Trizol aufgearbeitet. Die Quantifizierung der VEGF-Transkripte erfolgte mittels qRT-PCR (siehe 2.4.2, 2.4.5). Zur Berechnung der mRNA-Mengen wurde die ΔC_T -Methode verwendet. Die relativen Transkriptmengen wurden als prozentuale Werte berechnet, bezogen auf die mRNA-Ausgangsmenge (Zeitpunkt der Zugabe von Actinomycin D), welche als 100 % definiert wurde. Als Referenzgen wurde die mRNA von GAPDH gemessen. Die Berechnung der Halbwertszeit ($T_{1/2}$) der VEGF-mRNA erfolgte über exponentielle Regression, wie unter 2.4.3 beschrieben. Dafür wurden die Transkriptmengen gegen die Zeit halblogarithmisch aufgetragen. Zum Vergleich wurden naive Huh7-Zellen, Zellen der persistenten HCV-Zelllinie sowie transient mit den WNV-Replikons (WNV, WNV-mut) transfizierte Zellen in

analoger Form untersucht. Im Folgenden wird diese Methode auch als Actinomycin D-Assay bezeichnet. Es zeigt sich, dass die Degradation der VEGF-mRNA bis 180 min nach der Applikation von Actinomycin D kontinuierlich erfolgte. Über diesen Zeitpunkt hinaus konnte kein signifikanter Abbau der residualen mRNA-Menge nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Dies spricht dafür, dass über den längeren Messzeitraum nicht die komplette Menge an VEGF-mRNA der Degradation zugänglich ist. Bei der Berechnung der Halbwertszeit der VEGF-mRNA ist dies von großer Bedeutung. Die Betrachtung des gesamten Messzeitraumes über 240 min würde den Einfluss externer Faktoren auf die Degradation der VEGF-mRNA mitunter rechnerisch verringern, da eine kontinuierliche Degradation nur innerhalb der ersten 180 min detektierbar war. Daher wurde für die Berechnung der Halbwertszeit der Zeitraum von 0 min bis 180 min nach Actinomycin D-Applikation zugrunde gelegt, unter der Annahme, dass die VEGF-mRNA einer vollständigen Degradation unterliegt.

Im vorliegenden Experiment zeigte sich, dass signifikante Unterschiede in der residualen VEGF-mRNA-Menge nach 180 min Actinomycin D-Behandlung vorliegen. Während naive Huh7-Zellen und Zellen, die mit replikationsdefizienten Replikons (HCV-mut, WNV-mut) oder dem WNV-Replikon (WNV) transfiziert wurden, zu diesem Zeitpunkt eine residuale VEGF-mRNA-Menge von ca. 25-30 % des Ausgangswertes aufwiesen, konnten bei transient HCV-RNA replizierenden Zellen (HCV) ca. 60 % residuale VEGF-mRNA detektiert werden (Abb. 12, B). In Abbildung 12 ist zum einen der Degradationsverlauf der VEGF-mRNA in naiven und mit viraler Replikon-RNA transfizierten Zellen dargestellt (Abb. 12, A) und zum anderen die VEGF-Transkriptmenge nach 180 min, bezogen auf die VEGF-mRNA-Menge zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Zugabe (Abb., 12, B). In Huh7-Zellen wurde eine Halbwertszeit von 97 ± 6 min für die VEGF-mRNA bestimmt (Abb. 12, A). Bei der transienten Transfektion des replikationsdefizienten HCV-mut-Replikons ($T_{1/2}$ HCV-mut = 102 ± 4 min) sowie der WNV-Replikons ($T_{1/2}$ WNV = 100 ± 3 min bzw. $T_{1/2}$ WNV-mut = 103 ± 12 min) konnte kein signifikanter Einfluss auf die Halbwertszeit der VEGF-mRNA detektiert werden. Hingegen führt die transiente Transfektion des replikationsaktiven HCV-Replikons zur signifikanten Erhöhung der VEGF-mRNA-Halbwertszeit auf 227 ± 6 min (Abb. 12, A). Somit wurde die VEGF-mRNA in transient HCV-RNA replizierenden Zellen innerhalb der ersten 180 min nach Actinomycin D-Applikation langsamer abgebaut als in Zellen ohne transiente HCV-RNA-Replikation (naiv, HCV-mut) oder Zellen, die mit WNV-Replikons (WNV, WNV-mut) transfiziert wurden. Im Folgenden wird dieser beobachtete Einfluss auf die Degradation der VEGF-mRNA auch als posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA bezeichnet. Diese Stabilisierung der VEGF-mRNA trat jedoch nur in Zellen auf, die transient HCV-RNA replizieren. In Zellen der persistenten HCV-Zelllinie (HCV-pers.) wurde nach 180 min Actinomycin D-Behandlung eine residuale VEGF-mRNA-Menge von ca. 25 % ermittelt, was einer Halbwertszeit von 97 ± 10 min entspricht und mit der Halbwertszeit der VEGF-mRNA in naiven Huh7-Zellen vergleichbar ist.

Daraus konnte geschlossen werden, dass nur in den Zellen, die transient replizierende HCV-RNA enthielten, eine HCV-induzierte, verlangsamte Degradation der VEGF-mRNA vorliegt. Analoge Experimente, bei denen die Actinomycin D-Applikation zwischen 16 und 72 h nach der Transfektion des HCV-Replikons erfolgte, zeigten, dass der stärkste Einfluss auf die Degradation der VEGF-mRNA 48 h *p.t.* zu verzeichnen war (nicht dargestellt). Da sich die Bestimmung von mRNA-Halbwertszeiten mittels der beschriebenen Methode als sehr kosten- und zeitintensiv darstellt, wurde in nachfolgenden Experimenten auf eine Berechnung der Halbwertszeiten weitestgehend verzichtet. Um die Degradation der VEGF-mRNA in verschiedenen Experimenten dennoch zu vergleichen, wurde die VEGF-mRNA-Menge zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Applikation und 180 min danach bestimmt, dies wird als Actinomycin D-Endpunkt-Assay bezeichnet.

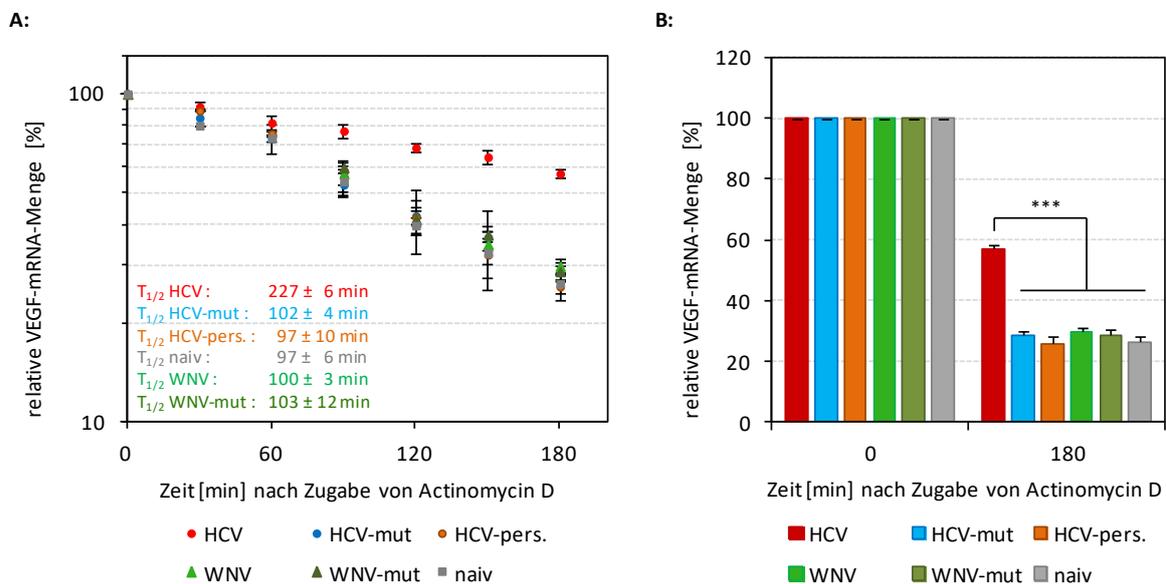


Abb. 12: Degradation der VEGF-mRNA in cellulo

Vergleich der VEGF-mRNA-Degradation in naiven Huh7-Zellen (naiv), Zellen der persistenten HCV-Zelllinie (HCV-pers.) und transient mit den HCV-Replikons (HCV, HCV-mut) bzw. WNV-Replikons (WNV, WNV-mut) transfizierten Zellen. Der Abbau der VEGF-mRNA wurde 48 h *p.t.* mittels Inhibition der DNA-abhängigen RNA-Transkription (1,6 μ M Actinomycin D) über einen Zeitraum von 3 h untersucht. Die Transkriptmenge von VEGF wurde durch qRT-PCR ermittelt und über die ΔC_T -Methode berechnet. Dabei diente die mRNA von GAPDH als interne Kontrolle, auf welche die gemessenen Werte der VEGF-mRNA normiert wurden. Für jeden Probensatz wurde die gemessene VEGF-mRNA-Menge zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Applikation (0 min) als 100 % definiert. Die im zeitlichen Verlauf gemessenen Quantitäten sind als relative Transkriptmengen dargestellt, die prozentual auf den Ausgangswert bezogen wurden. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von jeweils 5 unabhängigen Experimenten dar. **A:** Actinomycin D-Assay zur Untersuchung der VEGF-mRNA-Degradation. Durch halblogarithmisches Auftragen der relativen Transkriptmengen gegen die Zeit und exponentielle Regression wurde die jeweilige Halbwertszeit ($T_{1/2}$) der VEGF-mRNA ermittelt. **B:** Analyse des VEGF-mRNA Abbaus durch Actinomycin D-Endpunkt-Assay. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte der jeweiligen residualen VEGF-mRNA-Menge, die 180 min nach Actinomycin D-Applikation gemessen wurden. Unterschiede zwischen den Probensätzen wurden mittels Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (***) $P < 0,0001$

Um im Weiteren den Einfluss von unspezifischem Stress auf die posttranskriptionelle Regulation der VEGF-mRNA zu analysieren, wurden Actinomycin D-Endpunkt-Assays in

naiven Huh7-Zellen durchgeführt, denen 30 min vor der Applikation von Actinomycin D der Stressinduktor Di-Natriumhydrogen-Arsenat-Heptahydrat (2,5 mM, Arsenatreagenz) zugesetzt wurde (Abb. 13, A; siehe 2.2.2.5). In den mit Arsenatreagenz behandelten Zellen zeigte sich keine posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA (Abb. 13, A). Die VEGF-mRNA war nach 180 min Actinomycin D-Behandlung auf ca. 30 % des Ausgangswertes abgebaut. Dies entsprach den gemessenen Werten in unbehandelten Huh7-Zellen, wodurch kein signifikanter Einfluss von Di-Natriumhydrogen-Arsenat-Heptahydrat auf die Degradation der VEGF-mRNA nachgewiesen werden konnte. Auch analog mit Arsenatreagenz behandelte Zellen der persistenten HCV-Zelllinie wiesen keine posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA auf (nicht dargestellt). Demnach konnte nur unter dem Einfluss der transienten HCV-Replikation eine posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA detektiert werden.

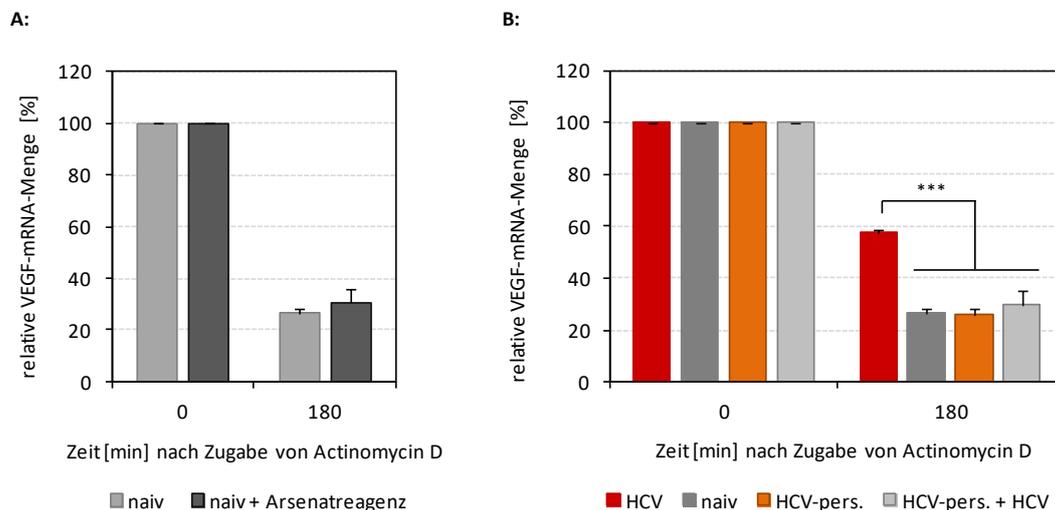


Abb. 13: Degradation der VEGF-mRNA in mit Di-Natriumhydrogen-Arsenat behandelten Huh7-Zellen und subsequent mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen der persistenten HCV-Zelllinie

Actinomycin D-Endpunkt-Assay zur Analyse der VEGF-mRNA Degradation. Die VEGF-mRNA-Menge wurde durch qRT-PCR ermittelt und über die ΔC_T -Methode berechnet. Die mRNA von GAPDH diente als interne Kontrolle. Für jeden Probensatz wurde die gemessene VEGF-mRNA-Menge zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Applikation (0 min) als 100 % definiert. Die 180 min nach Actinomycin D-Zugabe gemessenen Werte sind als relative Transkriptmengen dargestellt, die prozentual auf den Ausgangswert bezogen wurden. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von jeweils 4 unabhängigen Experimenten dar. Quantitative Unterschiede zwischen den jeweiligen Mittelwerten wurden mittels Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (***) $P < 0,0001$. **A:** Bestimmung des VEGF-mRNA Abbaus in durch Di-Natriumhydrogen-Arsenat-Heptahydrat (Arsenatreagenz; 2,5 mM) gestressten Huh7-Zellen. Die Stressinduktion erfolgte durch die Applikation der Arsenatreagenz für 30 min. Anschließend erfolgte die Applikation von Actinomycin D (1,6 μ M). **B:** Die persistente HCV-Zelllinie wurde transient mit 3 μ g des replikationsaktiven HCV-Replikon transfiziert (HCV-pers. + HCV). Als Kontrollen wurden unbehandelte naive Huh7-Zellen (Huh7) und die persistente HCV-Zelllinie (HCV-pers.) sowie transient mit HCV-RNA transfizierte Zellen (HCV) mitgeführt. Actinomycin D (1,6 μ M) wurde 48 h *p.t.* zu den Zellen gegeben.

Es bestanden demnach zwei Möglichkeiten, durch welche die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA innerhalb der persistenten HCV-Zelllinie verhindert wird. Zum einen könnte die HCV-RNA Mutationen aufweisen und so zum Auftreten von Quasispezies führen, zum anderen könnte eine zelluläre Adaptation vorliegen. Diese zelluläre Adaptation könnte ein Schutzmechanismus der Zelle sein, um ihre Vitalität bei persistenter Replikation von HCV-RNA und der damit verbundenen Expression viraler Proteine zu gewährleisten. Dabei könnte die Interaktion viraler Replikationsprodukte mit zellulären Faktoren inhibiert werden, wodurch die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in der HCV-Zelllinie ebenfalls inhibiert werden würde. Um die erste Möglichkeit näher zu untersuchen, wurde mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay geprüft, ob die Stabilisierung der VEGF-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie durch eine subsequente, transiente Transfektion von replikationsaktiver HCV-Replikon-RNA wiederhergestellt werden kann. Dafür wurden die Zellen transient mit 3 µg HCV-Replikon-RNA transfiziert und für 48 h kultiviert (HCV-pers. + HCV; siehe 2.2.2.2.3; 2.2.2.4). In Abbildung 13 (B) wird deutlich, dass die erneute Transfektion von HCV-Replikon-RNA in die persistente HCV-Zelllinie keinen signifikanten Einfluss auf die Degradation der VEGF-mRNA hatte. Die relative VEGF-mRNA Menge lag 180 min nach Actinomycin D-Zugabe auch hier bei ca. 30 % des Ausgangswertes.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Degradation der VEGF-mRNA nur in Huh7-Zellen, in welchen das HCV-Replikon transient repliziert, signifikant reduziert ist. Dabei ist der stärkste Einfluss 48 h p.t. zu beobachten (Zeitpunkt der maximalen, viralen Replikation). In der persistenten HCV-Zelllinie ließ sich hingegen keine Stabilisierung der VEGF-mRNA nachweisen. Zuvor konnten jedoch erhöhte Quantitäten der VEGF-mRNA in Zellen detektiert werden, die transient oder persistent HCV-RNA replizieren (siehe 3.1.2). Dies ist ein Indiz dafür, dass die erhöhte Transkriptmenge der VEGF-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie durch einen reinen Transkriptionseffekt zu erklären ist. Da durch die transiente Transfektion von replikationsaktiver HCV-RNA in die persistente HCV-Zelllinie keine Rekonstitution der VEGF-mRNA-Stabilisierung erreicht werden konnte, wurde vermutet, dass die Stabilisierung in der persistenten HCV-Zelllinie durch eine zelluläre Adaptation inhibiert sein könnte. In Zellen, die HCV-RNA transient replizieren konnte hingegen eine signifikante Erhöhung der VEGF-mRNA-Menge sowie eine signifikant verlangsamte Degradation der VEGF-mRNA detektiert werden. Daher kann angenommen werden, dass es sich bei der Erhöhung der VEGF-mRNA-Menge in diesen Zellen um einen gekoppelten Effekt aus Induktion der *VEGF*-Transkription und posttranskriptioneller Stabilisierung handelt. Inwieweit die insgesamt in den transient mit HCV-RNA transfizierten Zellen zu beobachtende Erhöhung der VEGF-Transkriptmenge bzw. Erhöhung der VEGF-Proteinmenge auf die posttranskriptionelle Stabilisierung zurückzuführen ist, ließ sich nicht differenzieren.

3.2.2 Regulation verschiedener Isoformen der VEGF-mRNA

Vom humanen VEGF-A existieren mehrere Isoformen, die sich in ihrer Rezeptorspezifität und Funktion unterscheiden. Diese werden durch alternatives Spleißen der prä-mRNA eines einzelnen *VEGF-A*-Gens generiert (Neufeld *et al.*, 1999; Arcondéguy *et al.*, 2013). Bisher wurden folgende Isoformen beschrieben: VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆. Die Proteine unterscheiden sich durch Domänen im C-terminalen Bereich. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu Heparin und Heparansulfat an der Zelloberfläche bzw. der extrazellulären Matrix, wodurch die Bioverfügbarkeit der Isoformen in der Zelle variieren kann. (Arcondéguy *et al.*, 2013; Neufeld *et al.*, 1999). Das für die Analysen verwendete VEGF-spezifische Primerpaar erkennt die cDNAs aller Isoformen. Daher sollte untersucht werden, ob sich die gemessene transkriptionelle Induktion und posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA auf alle oder nur einige der VEGF-mRNA Isoformen auswirkt. Dafür wurden analog zu vorangegangenen Experimenten naive Huh7-Zellen transient mit den HCV-Replikons (HCV/HCV-mut) transfiziert (siehe 2.2.2.2.3) und für 48 h kultiviert. Für die Analyse des mRNA-Abbaus und der Halbwertszeiten mittels qRT-PCR (siehe 2.4.2, 2.4.3) wurden die Zellen 48 h *p.t.* für 3 h mit Actinomycin D behandelt (siehe 2.2.2.4) und stündlich Proben genommen. Parallel dazu wurde in Huh7-Zellen das natürlich vorkommende Verhältnis der VEGF-mRNA Isoformen zueinander bestimmt, um zu untersuchen welche Isoform beim alternativen Spleißen bevorzugt wird. Die mRNAs von VEGF₁₁₁ und VEGF₁₆₂ konnten mittels qRT-PCR nicht eindeutig nachgewiesen werden. Entsprechend konzentrierten sich die Untersuchungen auf die restlichen Isoformen VEGF₁₂₁₋₂₀₆. Die Berechnung erfolgte über die ΔC_T -Methode, wobei GAPDH als internes Referenzgen diente. In Huh7-Zellen waren die mRNAs der VEGF-Isoformen in unterschiedlichen Quantitäten vorhanden. In Abbildung 14 (A) wird ersichtlich, in welchem Verhältnis die Isoformen der VEGF-mRNA zueinander stehen. Die mRNA von VEGF₁₆₅ war am stärksten vertreten und machte ca. die Hälfte (48,7 %) der Gesamtmenge an VEGF-mRNA aus, gefolgt von der VEGF₁₂₁-mRNA (30,4 %). Die mRNAs von VEGF₁₄₈ und VEGF₁₈₉ waren mit 13 % (VEGF₁₄₈) bzw. 7,1 % (VEGF₁₈₉) schwächer vertreten. Auch die mRNAs der Isoformen VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₃ und VEGF₂₀₆ traten in geringer Quantität auf und machten zusammen weniger als 1 % der Gesamtmenge an VEGF-mRNA aus. Somit konnte bestätigt werden, dass in humanen Zellen die mRNA von VEGF₁₆₅, die am stärksten vertretene Variante von VEGF darstellt (Neufeld *et al.*, 1999; Takahashi und Shibuya, 2005). Um zu untersuchen, ob die VEGF-mRNA Isoformen unter dem Einfluss der HCV-RNA-Replikation alle in gleichem Maße transkriptionell und posttranskriptionell reguliert werden, wurden deren Transkriptmengen 48 h *p.t.* in transient transfizierten Zellen bestimmt. Bezogen auf die entsprechenden Werte in nicht HCV-RNA replizierenden Zellen waren in transient HCV-RNA replizierenden Zellen alle untersuchten Isoformen der VEGF-

mRNA signifikant auf das ca. 4-Fache erhöht (Abb. 14, B). Naive Huh7-Zellen und Zellen, die das HCV-mut-Replikon trugen wiesen erwartungsgemäß gleiche Transkriptmengen der einzelnen VEGF-mRNA-Isoformen auf (Abb. 14, B).

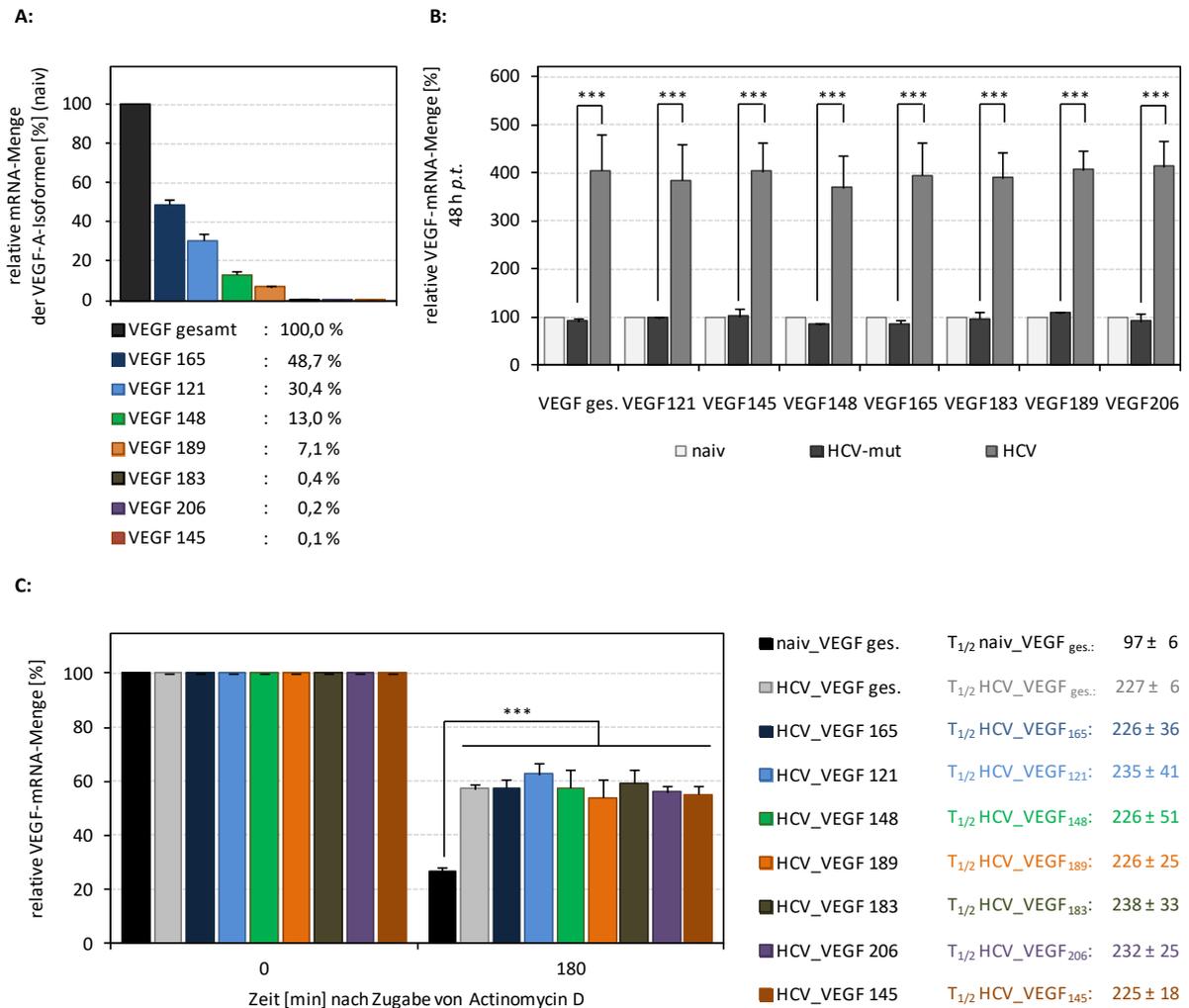


Abb. 14: Transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation der mRNA-Isoformen von VEGF

A: Die relativen Transkriptmengen der einzelnen VEGF-mRNA-Isoformen (VEGF_{121, 145, 148, 165, 183, 189, 206}) wurden in naiven Huh7-Zellen mittels qRT-PCR bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die Berechnungen erfolgten über die ΔC_T -Methode. Dabei diente GAPDH als internes Referenzgen. Die Gesamtmenge aller gemessenen VEGF-mRNAs (VEGF gesamt) wurde 100 % gleichgesetzt und die Messwerte der einzelnen Isoformen darauf bezogen. **B:** In naiven und transient mit 3 μ g HCV- bzw. HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen wurden 48 h *p.t.* die relative Transkriptmenge der VEGF-Isoformen analog bestimmt. Die Quantitäten der jeweiligen mRNA-Isoformen in Huh7-Zellen wurde 100 % gesetzt. Die Messwerte aus den transfizierten Zellen wurden prozentual darauf bezogen. **C:** Analyse des Abbaus der VEGF-mRNA-Isoformen mittels Actinomycin D-Assay in transient mit dem HCV-Replikon (HCV) transfizierten Zellen 48 h *p.t.*. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte der jeweiligen residualen VEGF-mRNA-Menge, die 180 min nach Actinomycin D-Applikation (1,6 μ M) gemessen wurden. Die Halbwertszeiten der VEGF-mRNA-Isoformen wurden durch halblogarithmisches Auftragen der relativen Transkriptmengen gegen die Zeit (nicht dargestellt) und exponentielle Regression ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von jeweils 4 unabhängigen Experimenten (A, B, C) dar. Quantitative Unterschiede zwischen den jeweiligen Mittelwerten wurden mittels Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (***) $P < 0,0001$.

Somit wurde durch den Einfluss der HCV-Replikation das relative Prozessierungsverhältnis der VEGF-prä-mRNA in die entsprechenden mRNAs nicht verändert. Alle Isoformen von VEGF zeigten in transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen eine gleichmäßige Erhöhung ihrer relativen Transkriptmengen. In diesen Zellen konnte außerdem bei jeder getesteten Isoform der VEGF-mRNA eine posttranskriptionelle Stabilisierung (48 h *p.t.*) detektiert werden (Abb. 14, C). Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Ergebnisse als Actinomycin D-Endpunkt-Assay dargestellt und die Degradation der Gesamt-VEGF-mRNA in naiven Huh7-Zellen (naiv_VEGF_{ges.}) wurde als Vergleich aufgetragen. Die residuale mRNA-Menge von VEGF war in HCV-RNA replizierenden Zellen für jede untersuchte Isoform auf jeweils ca. 60 % der entsprechenden Ausgangsmenge abgebaut (HCV_VEGF₁₂₁₋₂₀₆). Die Halbwertszeiten wurden mittels exponentieller Regression berechnet und lagen zwischen 225 ± 18 min (VEGF₁₄₅) und 238 ± 33 min (VEGF₁₈₃) (Abb. 14, C).

Demnach wurden alle Isoformen der VEGF-mRNA in transient HCV-RNA replizierenden Zellen in ähnlichem Maße posttranskriptionell stabilisiert.

3.2.3 Nicht alle zellulären mRNAs mit IRES-Struktur werden durch die HCV-Replikation posttranskriptionell stabilisiert

Bei zellulären Stressbedingungen, wie z.B. viraler Replikation wird die 5'-*cap*-abhängige Translationsinitiation durch Phosphorylierung der eIF2 α -Untereinheit blockiert. Einige zelluläre mRNAs besitzen jedoch spezielle Sekundär- und Tertiärstrukturen, welche eine alternative Translationsinitiation zum 5'-*cap* gestatten, sogenannte interne ribosomale Eintrittsstellen (IRES). Durch sie wird die Bindung der mRNA an Ribosomen ermöglicht und eine 5'-*cap*-unabhängige Translation wird vermittelt, die unabhängig von den meisten Initiationsfaktoren ist und auch unter zellulären Stresssituationen ablaufen kann (Pelletier und Sonenberg 1988; Hellen und Sarnow, 2001). IRES-haltige mRNAs spielen in der Zelle oft eine wichtige Rolle, z.B. bei der Expression von *house-keeping* Proteinen, Zellzyklus- assoziierter Proteine oder stressinduzierter *heat-shock* Proteine (Rubtsova *et al.*, 2003; Pyronnet *et al.*, 2000). Die VEGF-mRNA besitzt als Wachstumsfaktor ebenfalls zwei solcher IRES-Strukturen (Huez *et al.*, 1998). Daher sollte überprüft werden, ob unter HCV-assoziiertes Inhibition der *cap*-abhängigen Translation insgesamt eine posttranskriptionelle Stabilisierung von IRES-haltigen mRNAs zu beobachten ist. Dafür wurde der mRNA-Abbau anderer zellulärer, IRES-haltiger mRNAs mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay analysiert. Zu diesen gehörten der NF- κ B *repressing factor* (NRF), der *cysteine-rich, angiogenic inducer 61* (Cyr61) sowie das *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP), das Glucose regulierte Protein 78 (GRP78) und der *cytokine induced apoptosis inhibitor 1* (CIAP). Naive Huh7-Zellen wurden transient mit dem HCV-Replikon transfiziert und 48 h *p.t.* mit Actinomycin D (180 min) behandelt (siehe 2.2.2.2.3, 2.2.2.4).

Die Berechnung der Transkriptmengen erfolgte über qRT-PCR (siehe 2.4.2). Als Kontrolle wurden naive Huh7-Zellen verwendet. Bei Cyr61 (Abb. 15, D) und NRF (Abb. 15, C) konnte kein signifikanter Unterschied im Abbau der jeweiligen mRNA zwischen den Vergleichsgruppen detektiert werden. Nach der Actinomycin D-Behandlung waren die mRNAs in beiden Probensätzen (naiv, HCV) auf ca. 30 % (NRF) bzw. 17 % (Cyr61) vom Ausgangswert reduziert. Hier lag demnach keine HCV-assoziierte, posttranskriptionelle Stabilisierung der mRNA vor. Im Vergleich mit naiven Huh7-Zellen wies die mRNA von XIAP hingegen eine signifikant verzögerte Degradation in Zellen auf, die transient HCV-RNA replizieren (Abb. 15, B). Das *XIAP*-Transkript war 180 min nach Actinomycin D-Zugabe in diesen Zellen auf ca. 85 % der Ausgangsmenge reduziert. In naiven Huh7-Zellen war die *XIAP*-mRNA-Menge im gleichen Zeitraum bereits auf ca. 50 % des Ausgangswertes abgebaut. Demnach konnte unter dem Einfluss der HCV-Replikation bei *XIAP* und VEGF (Abb. 15, B, A), eine posttranskriptionelle Stabilisierung seiner mRNA detektiert werden.

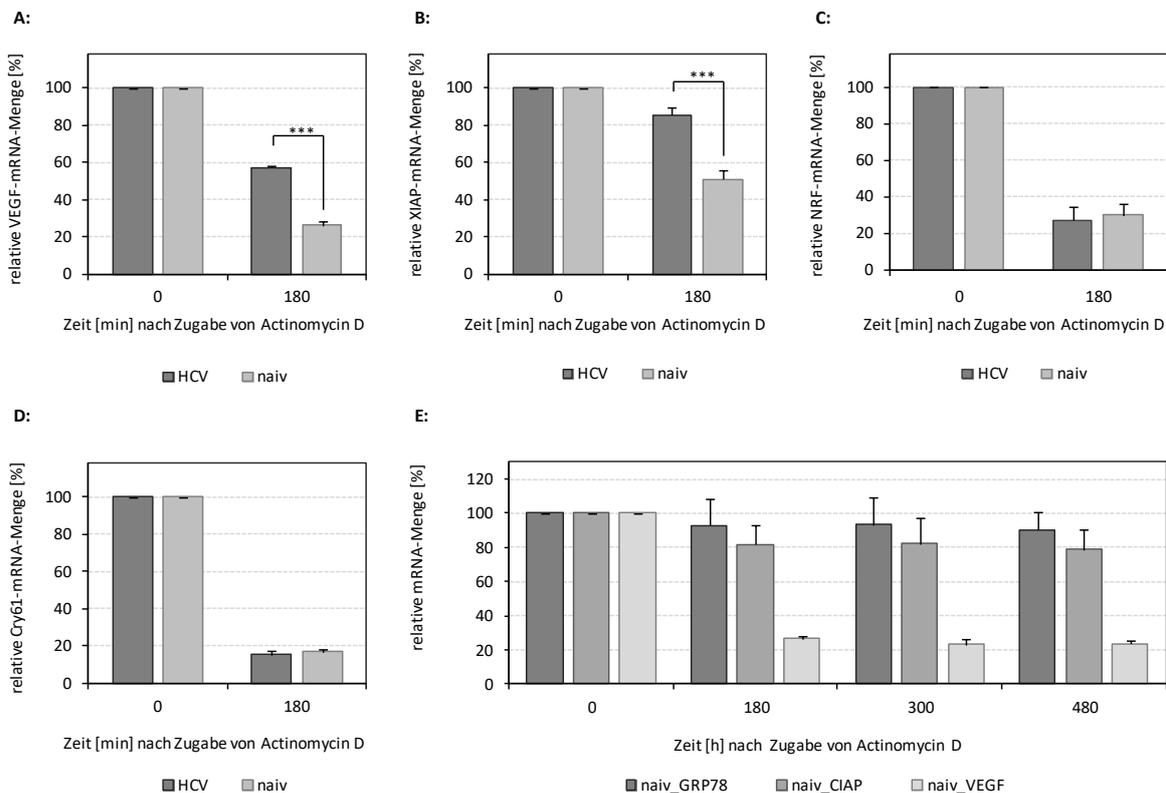


Abb. 15: Actinomycin D-Endpunkt-Assay IRES-haltiger mRNAs

Die Degradation von zellulären IRES-haltigen mRNAs wurde mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay bestimmt. Naive bzw. transient transfizierte Huh7-Zellen (HCV) wurden 48 h *p.t.* mit Actinomycin D (1,6 μ M) behandelt. Mittels qRT-PCR wurden die relativen Transkriptmengen der indizierten mRNAs bestimmt (ΔC_T -Methode). Die jeweiligen Transkriptmengen zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Applikation wurden 100 % gleichgesetzt und die Messwerte prozentual darauf bezogen. Die mRNAs von VEGF (A), XIAP (B), NRF (C) und Cyr61 (D) wurden über einen Zeitraum von 180 min analysiert, die von GRP78 und CIAP wurden über einen Zeitraum von 8 h (E). Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von 4 (A-D) bzw. 3 (E) unabhängigen Experimenten dar. Abgebildet sind die relativen Mittelwerte der jeweiligen residualen mRNA-Menge nach Actinomycin D-Behandlung. Unterschiede zwischen den Probensätzen wurden mittels Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (***) $P < 0,0001$.

Neben den bereits beschriebenen mRNAs wurden auch noch weitere zelluläre mRNAs untersucht, die eine IRES-Struktur aufweisen. Bei vielen dieser mRNAs konnte in naiven Huh7-Zellen unter den gewählten Bedingungen nur ein geringer Abbau dieser mRNAs detektiert werden, da hier wahrscheinlich Halbwertszeiten von mehr als 8 h vorliegen. Exemplarisch ist in Abbildung 15 (E) der mRNA-Abbau von GRP78 und CIAP sowie VEGF (Vergleichskontrolle) über einen Zeitraum von 8 h dargestellt. Die mRNAs von GRP78 und CIAP wurden nur moderat degradiert und verblieben nach 180 min Actinomycin D-Behandlung auf einem gleichbleibenden Niveau. Wie bereits in 3.2.1 erwähnt, verbleibt auch die residuale Transkriptmenge von VEGF nach mehr als 180 min Actinomycin D-Behandlung auf einem gleichbleibenden Niveau.

Die Untersuchung von IRES-haltigen mRNAs mit kürzeren Halbwertszeiten (Cyr61, NRF) zeigte, dass die Replikation der HCV-RNA und die damit verbundene Inhibition der *cap*-abhängigen Translation nicht prinzipiell zur posttranskriptionellen Stabilisierung IRES-haltiger mRNAs führt. Die Stabilisierung der VEGF- und eventuell auch der XIAP-mRNA scheint jedoch spezifisch mit der HCV-Replikation assoziiert zu sein.

3.3 Einfluss viraler HCV-Proteine auf die Stabilisierung der VEGF-mRNA

In vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die VEGF-mRNA in Abhängigkeit der transienten HCV-Replikation posttranskriptionell stabilisiert wurde. Die Virus-Replikation ist mit der Vermehrung viraler RNA sowie der Expression viraler Proteine assoziiert. Daher sollte untersucht werden, ob die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA durch die Expression einzelner, viraler HCV-Proteine induziert werden kann. Die Degradation der VEGF-mRNA wurde mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay bestimmt. Dafür wurden die kodierenden Bereiche von HCV-NS3, NS4A, NS4B, und NS5A sowie NS5B mittels PCR aus dem HCV-JFH_pUC18-Plasmid amplifiziert und in den pCite2a-Vektor kloniert (siehe 2.3). N-Terminal wurde die kodierende Sequenz des FLAG-tags integriert, um die Detektion mittels spezifischen FLAG-Antikörpers zu ermöglichen. Analog wurde die cDNA der kodierenden Sequenz der Neomycin-Phosphotransferase II-Kassette (NEO) mit einem Teil des *core*-Proteins (Δ *core*) ebenfalls in den pCite2a-Vektor kloniert (Δ *core*-NEO). Der pCite2a-Vektor ermöglicht die Expression rekombinanter Proteine unter Kontrolle eines T7-Promoters. Zur heterologen Expression dieser Proteine wurde das MVA-T7-Expressionssystem verwendet (siehe 2.2.2.3). Der pCite2a-Leervektor diente als Negativkontrolle (NK). Zunächst wurden Huh7-Zellen zur Expression der T7-Polymerase mit dem MVA-T7-Virus infiziert. Anschließend erfolgte die Transfektion mit den pCite2a-Plasmiden, die für die NS-Proteine bzw. Δ *core*-NEO kodieren (siehe 2.2.2.1). Die Expression der HCV-Proteine und des Δ *core*-NEO-Proteins wurde nach 24 h mittels Immunoblot untersucht (siehe 2.6.9). Vinculin diente als Ladekontrolle. Der Abbau der VEGF-mRNA wurde 24 h bzw. 48 h nach der

Plasmidtransfektion mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay bestimmt. Die relativen Transkriptmengen der VEGF-mRNA wurden mittels qRT-PCR bestimmt (siehe 2.4.2). Wie in Abbildung 16 (A) erkenntlich wird, wurden die einzelnen HCV-Proteine effizient exprimiert. Die Quantitäten der heterolog exprimierten Proteine wurden nicht exakt bestimmt. Sie wurden jedoch nach grober Abschätzung in vergleichbaren Mengen exprimiert (Abb. 16, A, oben). Für die Neomycin-Phosphotransferase II mit einem Teil des *core*-Proteins konnte eine sehr starke Proteinexpression detektiert werden (Abb. 16, A).

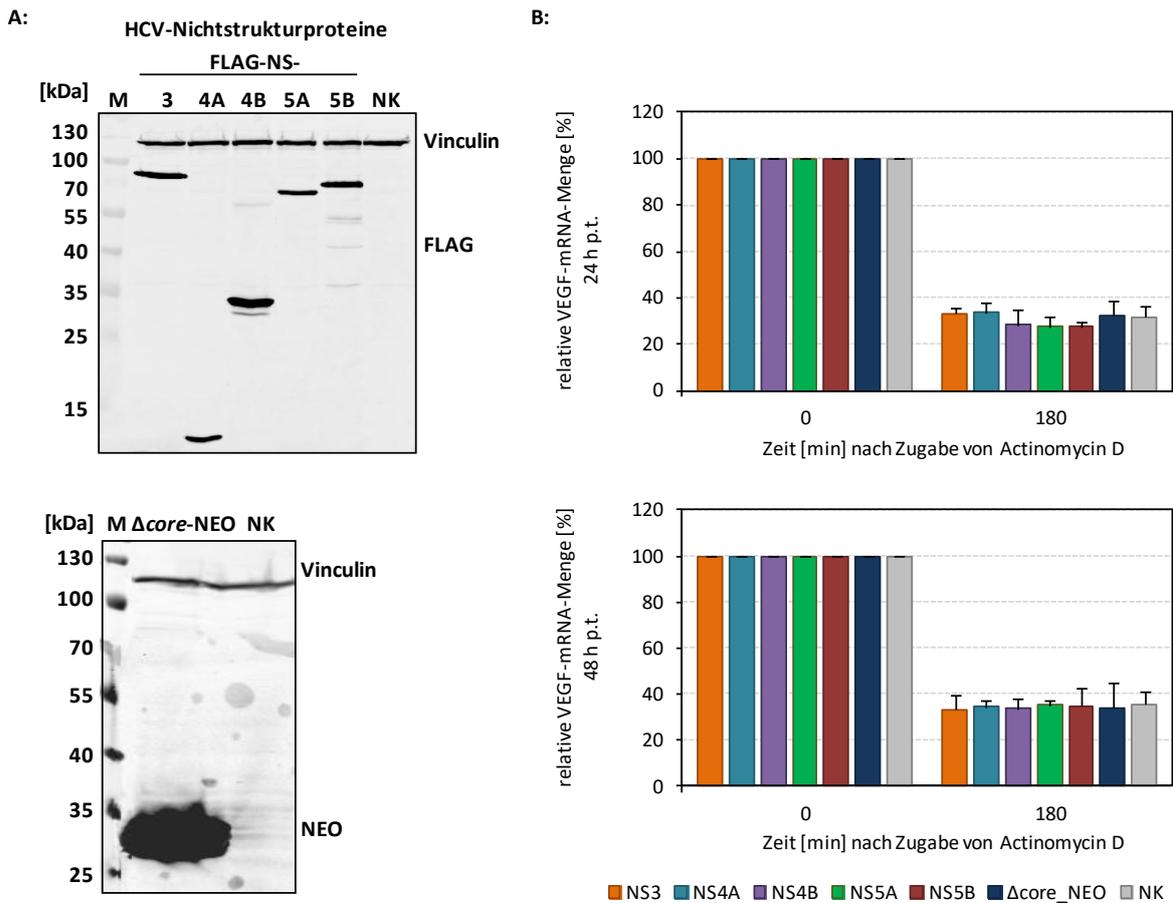


Abb. 16: Einfluss der Expression einzelner HCV-Proteine auf die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA

Die Nichtstrukturproteine HCV-NS3, -4A, -4B, -5A und -5B (mit N-terminalen FLAG-tag) sowie Δ core-NEO (Teil des *core* Proteins mit Neomycin-Phosphotransferase II) wurden in den pCite2a-Vektor kloniert. Die Proteine sowie eine Leervektor-Kontrolle wurden homolog in naiven Huh7-Zellen über das MVA-T7-System exprimiert. **A:** Der Nachweis der HCV-Proteine erfolgte 24 h p.t. aus Gesamtzelllysat. Jeweils 30 μ g Gesamtprotein wurden durch eine 12%iger SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörpern gegen FLAG (FLAG-HCV-Proteine) bzw. NEO und Vinculin. Die Detektion erfolgte durch Immunoblot und Nahinfrarot-scan bei 700 bzw. 800 nm. Protein-Marker: Page Ruler™ prestained ladder. **B:** Parallel dazu wurde 24 h und 48 h nach der Plasmid-Transfektion die Degradation der VEGF-mRNA mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay untersucht (Actinomycin D: 1,6 μ M). Die mRNA-Quantitäten wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Die Berechnung der relativen Transkriptmengen erfolgte über die ΔC_T -Methode, wobei die mRNA-Quantitäten zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Applikation (0 min) 100 % gleichgesetzt wurden. Die mRNA von GAPDH diente als interne Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von je 3 unabhängigen Experimenten dar.

Verglichen mit der Negativkontrolle trat während der Expression der einzelnen HCV-Proteine bzw. von $\Delta core$ -NEO weder 24 h *p.t.* noch 48 h *p.t.* ein signifikant veränderter Abbau der VEGF-mRNA auf (Abb. 16, B). Die relative VEGF-mRNA-Menge war in allen Probensätzen 180 min nach der Zugabe von Actinomycin D auf ca. 30 % der Ausgangsmenge reduziert. Die Präsenz einzelner HCV-Proteine bzw. des $\Delta core$ -NEO führte demnach nicht zur posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA.

Diese Daten favorisierten die Idee, dass nicht einzelne, virale Proteine sondern der virale RNA-Replikationsprozess eine entscheidende Rolle bei der beobachteten Änderung der Degradationseigenschaften der VEGF-A-mRNA spielt. Diese Idee wurde in Studien von Frau Dr. Anika Penzel (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland) weiterverfolgt. In dieser Arbeit wurde sich nachfolgend auf zelluläre Signalwege konzentriert, welche im Zusammenhang mit der HCV-assoziierten, posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA stehen könnten.

3.4 Einfluss von Hypoxie auf die Stabilisierung der VEGF-mRNA

Hypoxie beschreibt den Zustand der Mangelversorgung mit Sauerstoff. In Blut und Gewebe dokumentiert sich dies durch einen verminderten Sauerstoffpartialdruck. In Abhängigkeit von Umfang und Dauer des Sauerstoffmangels kann es zu schwerwiegenden Zellschädigungen kommen. Dabei tritt hypoxisches Gewebe besonders häufig bei Krebserkrankungen auf und den daraus resultierenden Tumoren (Warburg, 1925; Masson und Ratcliffe, 2014). Von Liu und Kollegen wurde beschrieben, dass Hypoxie eine transkriptionelle Steigerung von VEGF hervorruft (Liu *et al.*, 1995). Da auch die Replikation von HCV-RNA zu Hypoxie-ähnlichen Bedingungen führt (Vrancken *et al.*, 2012), sollte überprüft werden, ob Hypoxie auch im vorliegenden System kausal mit der beobachteten Erhöhung der VEGF-mRNA-Menge und der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA zusammenhängt.

3.4.1 Hypoxie erhöht die VEGF-mRNA-Menge in naiven Huh7-Zellen

Im Hinblick darauf, dass in den HCV-assoziierten Tumoren des Maus-*Xenograft*-Modells (siehe 3.1.4) erhöhte HIF1 α -Proteinmengen nachgewiesen wurden, sollte untersucht werden, ob die VEGF-mRNA-Menge auch unter Hypoxie in Huh7-Zellen erhöht ist. HIF1 α wird unter normoxischen Bedingungen proteolytisch abgebaut. Unter Hypoxie wird HIF1 α jedoch stabilisiert und ist Bestandteil des funktionsfähigen Transkriptionsfaktors HIF1, welcher unter anderem die *VEGF*-Transkription induzieren kann (Forsythe *et al.*, 1996; Chun *et al.*, 2002). Zur Analyse des HIF1 α -Proteins und der VEGF-mRNA wurden naive Huh7-Zellen und Zellen, die transient mit den HCV-Replikons transfiziert wurden verglichen. Die Probenentnahme erfolgte 48 h *p.t.*, wobei die Zellen innerhalb der letzten 24 h unter Hypoxie kultiviert wurden (siehe 2.6.5). Die Proben wurden mittels Trizol bzw.

RIPA-Puffer geerntet (siehe 2.2.2.6; 2.6.2). Die Transkriptmenge von VEGF wurde durch qRT-PCR (siehe 2.4.2) analysiert. Der Nachweis des HIF1 α -Proteins erfolgte aus Gesamtproteinextrakt mittels SDS-PAGE und Immunoblot (2.6.8, 2.6.9; Abb. 17).

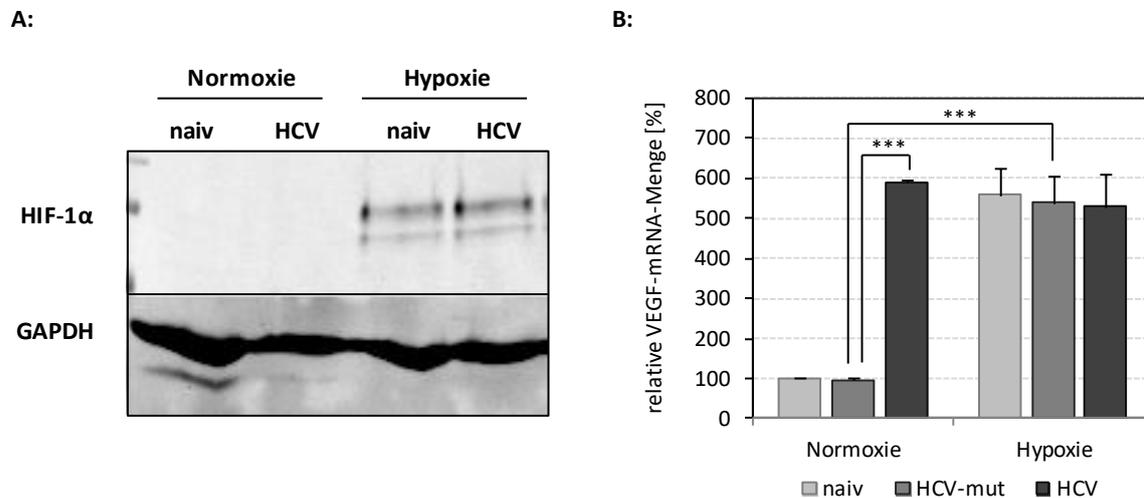


Abb. 17: Erhöhung der VEGF-Transkriptmenge durch Hypoxie

A: Unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen wurde das HIF1 α -Protein (116/120 kDa) in 30 μ g Gesamtprotein aus naiven Huh7-Zellen und transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen detektiert. Die Proteine wurden mittels 10%iger SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot nachgewiesen. Als interne Ladekontrolle wurde GAPDH (36 kDa) verwendet. Der Nachweis der Proteine erfolgte nach 24 h unter Hypoxie (48 h *p.t.*) mittels spezifischer Antikörper. Die Detektion erfolgte durch einen Nahinfrarot-scan bei 700 bzw. 800 nm. Protein-Marker: *Page Ruler™ prestained ladder* **B:** Bestimmung der VEGF-mRNA-Menge unter Normoxie und Hypoxie. Naive Huh7-Zellen und transient mit den HCV-Replikons transfizierte Zellen (HCV, HCV-mut) wurden für 48 h normoxisch kultiviert bzw. nach einem Tag für weitere 24 h hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Die relativen Transkriptmengen von VEGF wurden mittels qRT-PCR bestimmt und über die ΔC_T -Methode berechnet. Die in Huh7-Zellen unter Normoxie gemessenen Werte wurden 100 % gleichgesetzt und die anderen Werte prozentual darauf bezogen. GAPDH diene als internes Referenzgen. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von jeweils 4 unabhängigen Experimenten dar. Unterschiede zwischen den Probensätzen wurden mittels Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (***) $P < 0,0001$.

Wie erwartet konnte unter Normoxie kein HIF1 α -Protein in naiven Huh7-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 17, A). Nach 24 h unter hypoxischen Bedingungen konnte sowohl in Huh7-Zellen auch als auch in den mit HCV-Replikon transfizierten Zellen (48 h *p.t.*) ein deutliches Signal für HIF1 α detektiert werden. Es zeigte sich, dass unter Normoxie die VEGF-mRNA (48 h *p.t.*) nur in mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen signifikant erhöht war (Abb. 17, B). Die Kombination aus der Replikation von HCV-RNA und Hypoxie steigerte die VEGF-Transkriptmenge nicht über das Maß der relativen (ca. 6-fachen) Erhöhung gegenüber dem Einfluss der HCV-RNA-Replikation unter Normoxie. Die Transkriptmenge von VEGF wurde unter Hypoxie, wie erwartet, auch in den Zellen signifikant erhöht, die keine HCV-RNA-Replikation aufwiesen (naiv, Huh7-mut; Abb. 17, B). Hingegen konnte in den vorliegenden Experimenten das HIF1 α -Protein nicht in normoxischen Zellen nachgewiesen werden, die transient mit dem HCV-Replikon transfiziert wurden (Abb. 17, A). Allerdings beschrieben Nasimuzzaman und Kollegen 2007 bereits eine Stabilisierung des HIF1 α -Proteins in Huh7-Zellen, die mit HCV infiziert

wurden, sowie in Zelllinien mit subgenomischen HCV-Replikons. Diese HIF1 α -Stabilisierung assoziierten sie mit einer verstärkten *VEGF*-Genexpression (Nasimuzzaman *et al.*, 2007). Andere Arbeitsgruppen verknüpften die Stabilisierung des HIF1 α -Proteins hingegen mit der Expression des HCV-*core*-Proteins (Abe *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2009) oder der Expression des *full-length* HCV-Genoms (Wilson *et al.*, 2012). Möglicherweise lag die Menge, des mittels Immunoblot analysierten HIF1 α -Proteins, unterhalb der Detektionsgrenze.

Daher könnte die Erhöhung der VEGF-Transkriptmenge in hypoxischen Huh7-Zellen ein Indiz dafür sein, dass die HCV-assoziierte Steigerung der VEGF-Transkriptmenge ebenfalls über HIF1 α -abhängige Signalwege verlaufen könnte. Dies sollte in nachfolgenden Experimenten näher analysiert werden.

3.4.2 Einfluss von HIF1 α auf die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA

Da die VEGF-mRNA-Menge auch in naiven Huh7-Zellen unter Hypoxie erhöht wurde, sollte weiterführend der Einfluss von HIF1 α auf die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in HCV-RNA replizierenden Zellen untersucht werden. Dafür wurde in zwei separaten Experimenten entweder die HIF1 α -mRNA durch die Applikation spezifischer siRNA depletiert oder das HIF1 α -Protein mit Hilfe des Wirkstoffs LW6 (Merck, Darmstadt, Deutschland) inhibiert. Es wurde sich dabei auf Untersuchungen in Zellen beschränkt, die mit den HCV-Replikons (HCV, HCV-mut) transfiziert wurden. Die Arbeiten fanden unter normoxischen Bedingungen statt. Wenn HIF1 α an der HCV-assoziierten Regulation der VEGF-mRNA beteiligt wäre, sollte bei Applikation der HIF1 α -spezifischen siRNA bzw. des HIF1 α -Inhibitors (LW6) die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA sowie die VEGF-Transkriptmenge reduziert sein. Für die siRNA-vermittelte Depletion von HIF1 α wurde zunächst in naiven Huh7-Zellen das HIF1 α -Protein depletiert, durch Zugabe einer spezifischen siRNA gegen die HIF1 α -mRNA (siehe 2.2.2.2). Die Transfektion der viralen HCV-Replikons erfolgte 24 h nach der siRNA-Applikation (siehe 2.2.2.3). Nach weiteren 48 h wurden die Zellen zur Bestimmung der VEGF-Transkriptmenge geerntet oder zur Untersuchung der VEGF-mRNA-Degradation mit Actinomycin D behandelt (Actinomycin D-Endpunkt-Assay; siehe 2.2.2.4). Die Transkriptmenge von VEGF wurde mittels qRT-PCR bestimmt (siehe 2.4.2). Neben der siRNA, die spezifisch gegen die mRNA von HIF1 α (siHIF1a) gerichtet ist, wurde als Kontrolle eine siRNA gegen das *green-fluorescent protein* (siGFP) verwendet. Diese besitzt keine komplementäre Zielsequenz für mRNAs in Huh7-Zellen. Verglichen mit der Kontrolle (siGFP) konnte in den mit dem HCV- bzw. HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen durch siRNA-Transfektion (siHIF1a) eine effiziente Reduktion der HIF1 α -mRNA auf ca. 20 % des Ausgangswertes erzielt werden (Abb. 18, A). Ein Nachweis auf Proteinebene war nicht möglich, da HIF1 α bei ausreichender Sauerstoffverfügbarkeit soweit abgebaut wird, dass

es immunologisch nicht mehr nachweisbar ist. Die Erhöhung der VEGF-Transkriptmenge in Zellen, die transient HCV-RNA replizieren, wurde durch die HIF1 α -Depletion (HCV siHIF1a) nicht beeinflusst (Abb. 18, B). Unabhängig von der HIF1 α -Depletion stieg die VEGF-Transkriptmenge in Zellen mit transient replizierender HCV-RNA um das ca. 4-5-Fache an, verglichen mit Zellen, die mit dem HCV-mut-Replikon transfiziert wurden (Abb. 18, B). Die Untersuchung zur mRNA-Degradation zeigte, dass die VEGF-mRNA in mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen, trotz HIF1 α -Depletion, posttranskriptionell stabilisiert wurde (Abb. 18, C). Die residuale Menge an VEGF-mRNA lag hier, wie auch in Zellen die mit der Kontroll-siRNA behandelt wurden, bei ca. 60 % des Ausgangswertes.

Diese Ergebnisse indizieren, dass die HCV-assoziierte Induktion und posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA unabhängig von HIF1 α sind.

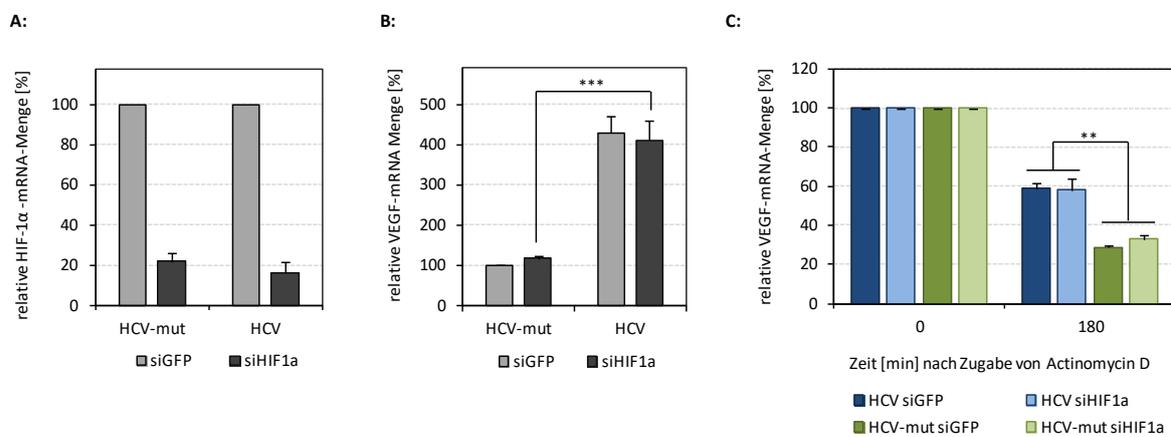


Abb. 18: Die siRNA-vermittelte Depletion von HIF1 α beeinflusst nicht die HCV-assoziierte posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA

A, B: HIF1 α wurde durch die Applikation einer spezifischen siRNA (siHIF1a) in transient mit HCV- und HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen depletiert. Als Kontrolle wurde eine siRNA gegen GFP (siGFP) eingesetzt. Dafür wurden naive Huh7-Zellen mit der entsprechenden siRNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit den HCV-Replikons transfiziert und für weitere 48 h kultiviert. Die relative Depletion der HIF1 α -mRNA sowie die relative Transkriptmenge von VEGF wurden durch qRT-PCR überprüft. **C:** Parallel dazu wurde die Depletion der VEGF-mRNA mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay analysiert. Alle Messungen erfolgten mittels qRT-PCR, die Berechnungen durch die ΔC_T -Methode. GAPDH wurde als internes Referenzgen verwendet und die Werte der Kontrollen (HCV siGFP, HCV-mut siGFP (A); HCV-mut siGFP (B)) bzw. Messwerte zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Applikation (0 min (C)) wurden 100 % gleichgesetzt. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von jeweils 4 unabhängigen Experimenten dar. Unterschiede zwischen den Probensätzen wurden mittels Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (***) $P < 0,0001$; (**) $P < 0,001$.

Zur Absicherung dieser Ergebnisse wurde in einem zweiten Experiment das HIF1 α -Protein alternativ mittels des Wirkstoffs LW6 (HIF1 α -Inhibitor, Merck, Darmstadt, Deutschland) inhibiert (siehe 2.6.5). Es handelt sich dabei um eine zellpermeable, amidophenolische Substanz, welche selektiv die Akkumulation des HIF1 α -Proteins blockiert und damit die hypoxieinduzierte Transkriptionsaktivität von HIF1 inhibiert. Der Inhibitor beeinflusst dabei nicht die *HIF1*-Transkription. Seine Funktionalität wurde zunächst immunologisch überprüft. Naive Huh7-Zellen wurden für 24 h unter Hypoxie kultiviert und anschließend mit 75 μ M oder 125 μ M HIF1 α -Inhibitor (gelöst in DMSO) bzw. dem entsprechenden

Volumen DMSO (Negativkontrolle) versetzt. Nach weiteren 24 h unter Hypoxie wurden die Proben geerntet. Das Gesamtproteinextrakt wurde isoliert, durch eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt und das HIF1 α -Protein mittels Immunoblot detektiert (siehe 2.6.2, 2.6.8, 2.6.9). In den mit DMSO behandelten Proben der Negativkontrolle konnte das HIF1 α -Protein deutlich detektiert werden (Abb. 19, A). In den Proben mit Inhibitor war die Menge an HIF1 α reduziert. Dabei wurde die Akkumulation des HIF1 α -Proteins bei der Verwendung von 125 μ M LW6 stärker blockiert als bei 75 μ M LW6 (Abb. 19, A). Daher wurden für die weiteren Experimente 125 μ M HIF1 α -Inhibitor verwendet. Bei den Untersuchungen zur Degradation der VEGF-mRNA (Actinomycin D-Endpunkt-Assay) wurde sich auf normoxische Zellen beschränkt, die transient mit den HCV-Replikons (HCV, HCV-mut) transfiziert wurden. Nach 24 h wurde der HIF1 α -Inhibitor bzw. DMSO zugegeben und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Die Transkriptmengen wurden mittels qRT-PCR bestimmt (siehe 2.4.2). In Zellen, die HCV-RNA replizieren, wurde weder die VEGF-Transkriptmenge (Abb. 19, B) noch die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA durch die Wirkung des HIF1 α -Inhibitors verändert (Abb. 19, C).

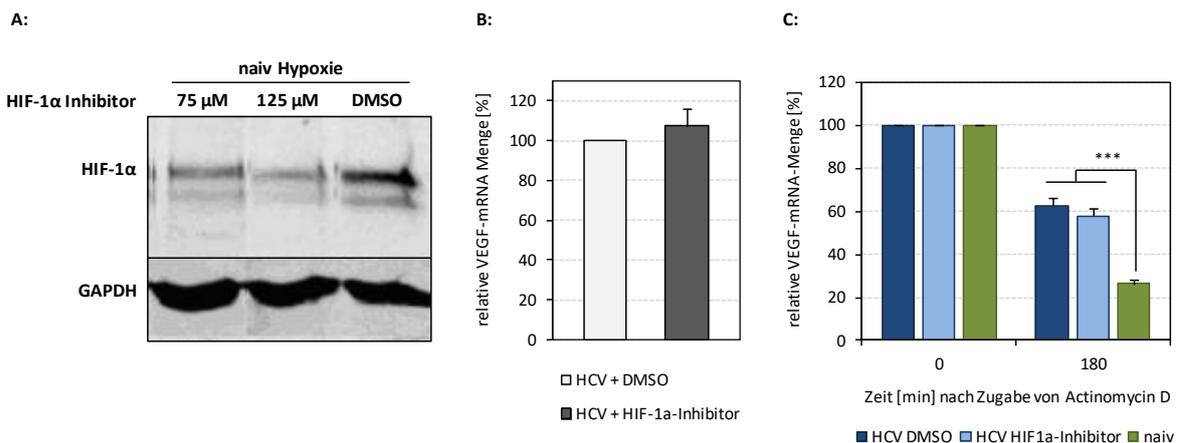


Abb. 19: Die Inhibition von HIF1 α hat keinen Einfluss auf die HCV-assoziierte transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation der VEGF-mRNA

A: Funktionsprüfung des HIF1 α -Inhibitors (LW6, gelöst in DMSO). Naive Huh7-Zellen wurden für 24 h unter Hypoxie inkubiert, dann mit HIF1 α -Inhibitor (75 μ M, 125 μ M) behandelt und für weitere 24 h unter Hypoxie inkubiert. Als Kontrolle wurden äquivalente Volumina von DMSO verwendet. Der Nachweis von HIF1 α (116/120 kDa) und GAPDH (36 kDa, Ladekontrolle) erfolgte aus 30 μ g Gesamtprotein über eine 10%ige SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot. Detektiert wurden die Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper und einem Nahinfrarot-*scan* bei 700 nm. Protein-Marker: *Page Ruler™ prestained ladder* **B:** Bestimmung der relativen VEGF-mRNA-Menge mittels qRT-PCR unter Normoxie. Huh7-Zellen wurden transient mit dem HCV-Replikon transfiziert und nach 24 h mit dem HIF1 α -Inhibitor bzw. DMSO behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet und die relative VEGF-mRNA-Menge bestimmt. **C:** Untersuchung der Degradation der VEGF-mRNA in naiven Huh7-Zellen (naiv) und transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen. Die Zellen wurden wie beschrieben mit dem HIF1 α -Inhibitor bzw. DMSO behandelt. Mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay und qRT-PCR wurde der relative Abbau der VEGF-mRNA analysiert. Alle Berechnungen erfolgten durch die ΔC_T -Methode. GAPDH wurde als internes Referenzgen verwendet und die Werte der Kontrolle (HCV+DMSO (B); 0 min (C)) 100 % gleichgesetzt. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von jeweils 5 unabhängigen Experimenten dar. Unterschiede zwischen den Probensätzen wurden mittels Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft (C). (***) $P < 0,0001$.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die relative Transkriptmenge von VEGF in Huh7-Zellen sowohl unter dem Einfluss der HCV-RNA-Replikation sowie von Hypoxie erhöht war. Allerdings führte die siRNA-vermittelte Depletion bzw. LW6-vermittelte Inhibition des HIF1 α -Proteins nicht zum Verlust der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA oder zur Reduktion der VEGF-mRNA-Menge (HCV). Die anfängliche Vermutung, dass die HCV-assoziierte, posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA sowie die erhöhte VEGF-Transkriptmenge mit der Wirkung von HIF1 α assoziiert sind, konnte daher nicht bestätigt werden.

3.5 HCV-RNA-Replikation und Assemblierung von *stress granules*

Während zellulären Stresssituationen, zu denen auch virale Infektionen gehören, können Zellen sogenannte *stress granules* (SGs) ausbilden (siehe 1.6.3). Es handelt sich dabei um zytoplasmatische, granuläre Strukturen, die reversibel aggregieren können. In ihnen ist der translational reprimierte Präinitiationskomplex mit gebundener mRNA enthalten. Möglicherweise wird die in SGs enthaltene mRNA vor nukleolytischem Abbau geschützt (Beckham und Parker, 2008; Kedersha *et al.*, 1999/2002; Anderson und Kedersha, 2006). Garaigorta und Kollegen beschrieben, dass auch HCV-Infektionen zur Assemblierung solcher SGs führen (Garaigorta *et al.*, 2012; Ruggieri *et al.*, 2012). Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass die HCV-assoziierte, posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA durch Lagerung der mRNA in SGs vermittelt worden sein könnte. Daher sollte im Weiteren untersucht werden, ob die Assemblierung von SGs auch bei der transienten Replikation des subgenomischen HCV-Replikons auftritt. Der Nachweis von SG-spezifischen Proteinen, wie *insulin-like growth-factor binding-protein 1* (IGF2BP1) (Stöhr *et al.*, 2006), dem *T-cell-restricted intracellular-antigen 1* (TIA1) und dem *TIA1-related protein* (TIAR) (Gilks *et al.*, 2004) erfolgte über indirekte Immunfluoreszenz.

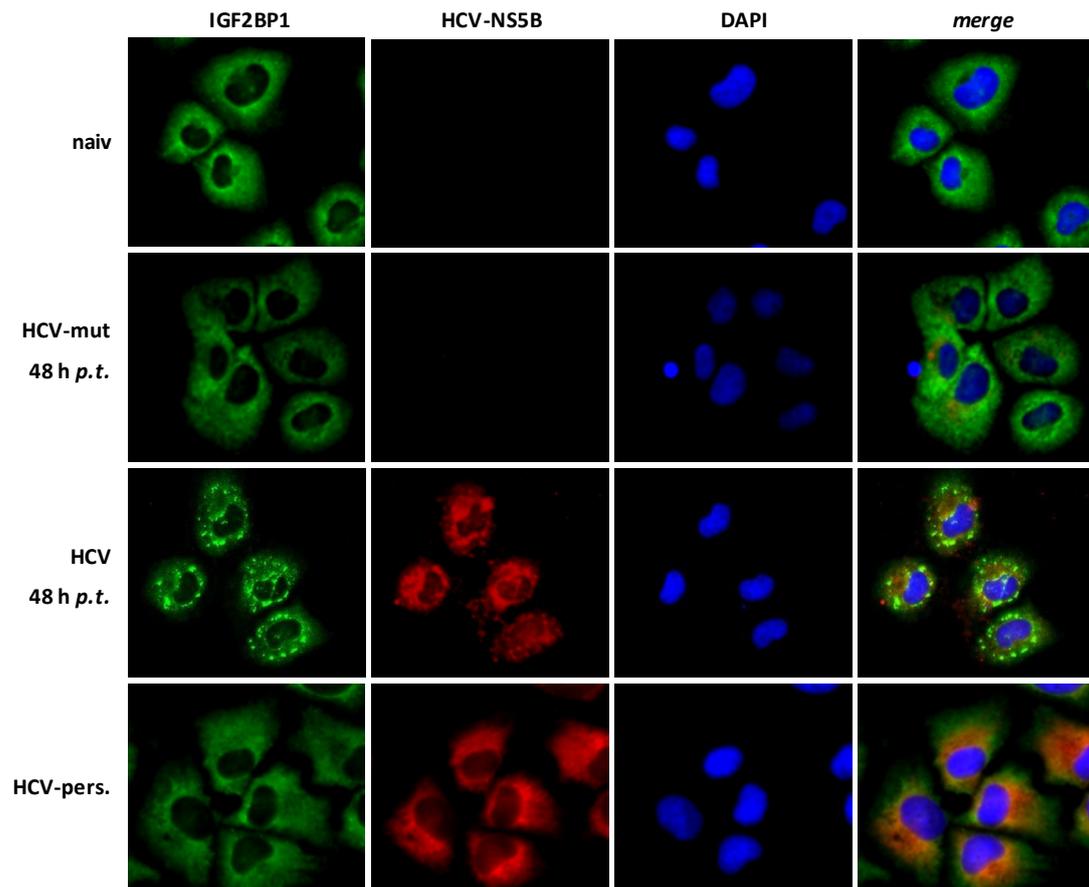
3.5.1 Die HCV-RNA-Replikation induziert die Assemblierung von SGs in transient transfizierten Huh7-Zellen

Da die Zwischenlagerung von mRNAs in *stress granules* (SGs) deren Halbwertszeit erhöhen könnte, sollte analysiert werden, ob SGs auch in Zellen detektierbar sind, in denen HCV-RNA repliziert und ob das Auftreten von SGs mit der Stabilisierung der VEGF-mRNA assoziiert sein könnte. Dafür wurden Huh7-Zellen transient mit dem HCV- bzw. HCV-mut-Replikon transfiziert und auf Deckgläschen ausgesät (siehe 2.2.2.2.3). Zusätzlich wurden naive Huh7-Zellen und Zellen der persistenten HCV-Zelllinie analysiert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 70 h kultiviert und Proben nach 8 h, 20 h, 24 h, 28 h, 32 h, 48 h und 70 h mit Formalin fixiert, permeabilisiert und einer indirekten Immunfluoreszenz unterzogen (siehe 2.6.3). Der Nachweis des zytoplasmatischen SG-Markerproteins IGF2BP1 und des HCV-spezifischen NS5B-Proteins erfolgte mit Hilfe spezifischer, primärer Antikörper gegen diese Proteine und fluoreszenzgekoppelter

sekundärer Antikörper (siehe Anhang 7.1, Tab. 5). Die effiziente Replikation der HCV-RNA und die damit verbundene Expression viraler Proteine wurden durch die Detektion des viralen HCV-NS5B-Proteins nachgewiesen. Die DNA in den Zellkernen wurde durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. In Abbildung 20 (A) sind exemplarisch mikroskopische Aufnahmen 48 h *p.t.* dargestellt. In Zellen, die transient HCV-RNA replizieren, war IGF2BP1 deutlich in zytoplasmatischen Granula lokalisiert. Dass es sich dabei um SGs handelte, konnte durch die Detektion anderer Proteine, die spezifisch in SGs akkumulieren (TIA1, TIAR), bestätigt werden (nicht dargestellt). Bei naiven Huh7-Zellen und den mit dem HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen sowie der persistenten HCV-Zelllinie wurde hingegen ersichtlich, dass IGF2BP1 nicht in granulären Strukturen akkumuliert. IGF2BP1 war hier gleichmäßig über das gesamte Zytoplasma verteilt (Abb. 20, A). Parallel dazu wurde in Zellen, die das HCV-Replikon tragen die Transfektionseffizienz und die Anzahl der Zellen mit SGs über den oben genannten Zeitraum von 70 h bestimmt (siehe Abb. 20, B). Die Zellen, in denen das HCV-NS5B-Protein (Indiz der HCV-Replikation) bzw. granuläre SG-Strukturen (IGF2BP1) spezifisch nachgewiesen werden konnten, wurden gezählt und ins Verhältnis zur Anzahl aller Zellen im Bildausschnitt gesetzt (Nachweis nukleärer DNA über DAPI). In transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen (HCV) lag die Transfektionsrate bei ca. 75 % (siehe 3.7, Abb. 24). Die Assemblierung von SGs konnte nur in den Zellen festgestellt werden, die eine effiziente transiente HCV-RNA-Replikation aufwiesen. Dabei stieg die Anzahl SG-haltiger Zellen mit der Zeit an und erreichte das Maximum zwischen 28 h und 48 h *p.t.* Innerhalb dieses Zeitrahmens wiesen ca. 60 % aller transient HCV-RNA replizierender Zellen SGs auf (Abb. 20, B). In der persistenten HCV-Zelllinie lag die Transfektionsrate bei 100 % (nicht dargestellt). Wie schon beschrieben konnte in diesen Zellen jedoch keine Formierung von SGs detektiert werden (Abb. 20, A). Demnach korreliert in transient HCV-RNA replizierenden Zellen die Assemblierung von SGs mit der zuvor gemessenen, posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA und dem Maximum der HCV-RNA-Replikation. In der persistenten HCV-Zelllinie, bei der zuvor keine posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA gemessen wurde, war auch keine zytoplasmatische SG-Assemblierung zu detektieren.

Dies ist ein Indiz dafür, dass die Assemblierung von SGs an der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA beteiligt sein könnte und in der persistenten HCV-Zelllinie adaptive Mechanismen vorliegen, die eine derartige Stabilisierung der mRNA nicht erlauben.

A:



B:

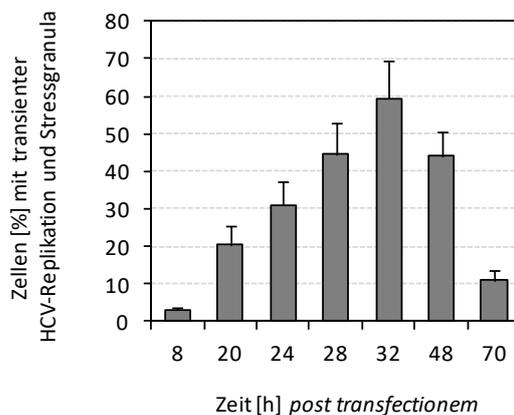


Abb. 20: Assemblierung von *stress granules* im Zytoplasma transient HCV-RNA replizierender Zellen

A: Naive Huh7-Zellen, Zellen der persistenten HCV-Zelllinie (HCV-pers.) und mit den HCV-Replikons (HCV, HCV-mut) transient transfizierte Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät. Über einen Zeitraum von 70 h wurden Proben entnommen. Die Zellen wurden mit Formalin fixiert, permeabilisiert und einer indirekten Immunfluoreszenz unterzogen. Die Detektion von IGF2BP1 und des viralen HCV-NS5B-Proteins erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen diese Proteine und fluoreszenzgekoppelter sekundärer Antikörper. Die Färbung der DNA im Zellkern erfolgte durch *ProLong® Gold antifade reagent* mit DAPI. Die Aufnahmen wurden in 400-facher Vergrößerung (40 x-Objektiv) mit dem Axiovert 200M gemacht. **B:** Bestimmung der relativen Anzahl an Zellen mit SG-Assemblierung mittels indirekter Immunfluoreszenz. Zu den indizierten Zeiten wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, welche SGs aufwiesen und ins Verhältnis gesetzt zur Anzahl aller Zellen im Bildausschnitt, in denen das virale HCV-NS5B-Protein nachgewiesen werden konnte. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten dar.

3.5.2 Fehlende SG-Assemblierung in der persistenten HCV-Zelllinie ist nicht durch Modifikation der HCV-RNA bedingt

Vorangegangene Experimente zeigten, dass in der persistenten HCV-Zelllinie keine posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA und keine SG-Assemblierung auftreten (siehe 3.2.1 und 3.5.1). Bei der Verwendung von Tumor-Zelllinien mit persistent replizierender, viraler RNA besteht jedoch das Risiko, dass Subklone entstehen bzw. Quasispezies des viralen Genoms. Trotz des klonalen Ursprungs von Zelllinien kann es mit zunehmenden Passagen zur deren genetischen Heterogenität kommen. Ebenfalls können die Zellen Adaptationen in ihrer Genregulation aufweisen, als Anpassung an die persistente Replikation viraler RNA. Andererseits kann in Zelllinien, die persistent virale RNA replizieren, auch das virale Genom Mutationen aufweisen (Quasispezies). Dies wird begünstigt, da virale RNA-Polymerasen zumeist keine Korrekturlesefunktion aufweisen (Quentmeier *et al.*, 2016; Bartenschlager und Pietschmann, 2005; Krieger *et al.*, 2001; Simmonds, 1995). Daher sollte die Sequenz der HCV-RNA aus der persistenten HCV-Zelllinie mit der Sequenz des HCV-Replikons verglichen werden. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die SG-Assemblierung in der HCV-Zelllinie durch subsequente transiente Transfektion des HCV-Replikons rekonstituiert werden kann. Dafür wurden naive Huh7-Zellen und Zellen der persistenten HCV-Zelllinie mit 3 µg des HCV-Replikons transient transfiziert (HCV; HCV-pers. + HCV, siehe 2.2.2.2.3), auf Deckgläschen ausgesät und 48 h *p.t.* einer indirekten Immunfluoreszenz unterzogen (siehe 2.6.3). Die Detektion von TIA1, TIAR und HCV-NS5A erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen diese Proteine. Die DNA in den Zellkernen wurde durch DAPI angefärbt und die Proben mikroskopisch untersucht. Das TIA1-Protein konnte in allen Proben im Zellkern und im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden (Abb. 21, A). In den transient transfizierten Huh7-Zellen (HCV) aggregierte TIA1 wie erwartet in zytoplasmatischen, granulären Strukturen (SGs). In den transient transfizierten Zellen der persistenten HCV-Zelllinie (HCV-pers. + HCV) war TIA1 hingegen gleichmäßig im Zytoplasma bzw. Zellkern verteilt und war nicht in granulären Strukturen lokalisiert. Somit konnte in der persistenten HCV-Zelllinie die Assemblierung von SGs durch subsequente Transfektion des HCV-Replikons nicht rekonstituiert werden (Abb. 21, A). Dies ergänzte die Ergebnisse in Abschnitt 3.2.1. (Abb. 13). Parallel dazu wurden Sequenzanalysen der HCV-RNA aus Zellen der persistenten HCV-Zelllinie durchgeführt (siehe 2.4.4). Dabei wurden keine Veränderungen zur Sequenz des HCV-Replikons festgestellt (nicht dargestellt). Die Ergebnisse deuten an, dass der Verlust der SG-Assemblierung in der HCV-Zelllinie auf eine zelluläre Adaptation zurückzuführen ist und nicht auf Mutationen der HCV-RNA. Um dies näher zu untersuchen, wurden naive Huh7-Zellen mit 50 µg Gesamt-RNA aus der persistenten HCV-Zelllinie bzw. aus naiven Huh7-Zellen transient transfiziert (siehe 2.2.2.2.3). Dadurch sollte überprüft werden, ob die isolierte HCV-RNA prinzipiell in der Lage ist die SG-

Assemblierung zu induzieren. Die Detektion von TIAR und HCV-NS5A erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz (siehe 2.6.3). Die transiente Transfektion von Gesamt-RNA aus naiven Huh7-Zellen induzierte keine SG-Assemblierung (Abb. 21, B). Die Transfektion von Gesamt-RNA aus der persistenten HCV-Zelllinie führte hingegen zur SG-Assemblierung (Abb. 21, B).

Demnach ist die HCV-RNA aus HCV-pers. prinzipiell im Stande die Assemblierung von SGs zu induzieren. Dadurch wird die Vermutung bestärkt, dass in der HCV-Zelllinie eine Form der zellulären Adaptation vorliegt, welche die HCV-assoziierte Assemblierung von SGs und die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA inhibieren könnte.

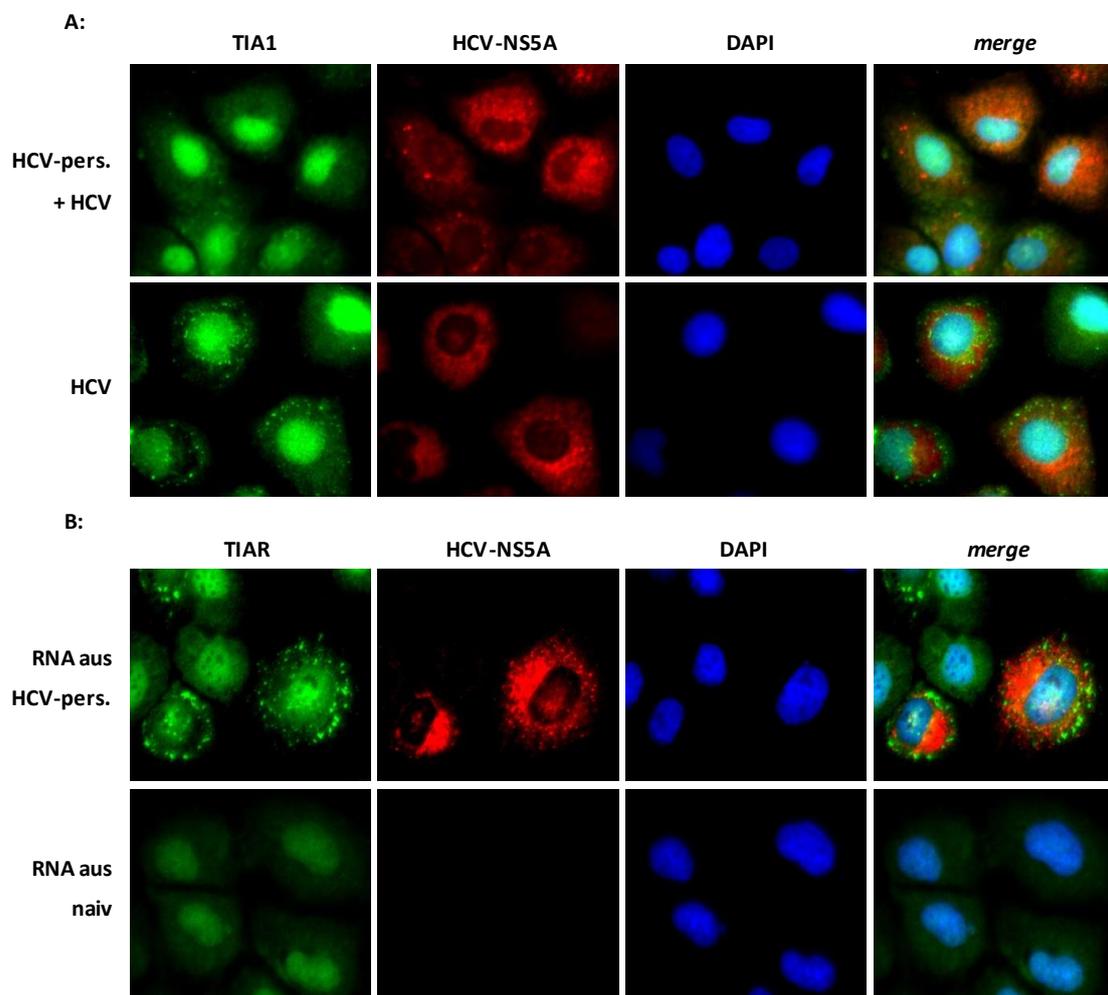


Abb. 21: Der Verlust der SG-Assemblierung in der persistenten HCV-Zelllinie wird durch zelluläre Adaptation bedingt

A: Naive Huh7-Zellen und Zellen der persistenten HCV-Zelllinie wurden mit dem HCV-Replikon (3 µg) transient transfiziert. Die Proben wurden auf Deckgläschen ausgesät und für 48 h kultiviert. Anschließend wurden sie mit Formalin fixiert, einer indirekten Immunfluoreszenz unterzogen und mikroskopisch untersucht. Das virale HCV-NS5A-Protein sowie TIA1 und TIAR wurden mittels spezifischer Antikörper gegen diese Proteine und fluoreszenzgekoppelter sekundärer Antikörper detektiert. Die Färbung der DNA im Zellkern erfolgte durch *ProLong® Gold antifade reagent* mit DAPI. Die Aufnahmen erfolgten in 400-facher Vergrößerung (40 x-Objektiv; Axiovert 200M). **B:** Analog wurden naive Huh7-Zellen untersucht, die mit 50 µg Gesamt-RNA aus Huh7-Zellen bzw. 50 µg Gesamt-RNA aus der persistenten HCV-Zelllinie transfiziert wurden. Die Experimente wurden 3-mal unabhängig voneinander durchgeführt.

3.6 Depletion von SG-Komponenten beschleunigt den VEGF-mRNA-Abbau

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die HCV-assoziierte, posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA mit der Assemblierung von SGs korrelierte. Die Vermutung lag nahe, dass der Stabilitätsunterschied der VEGF-mRNA in naiven und mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen über SGs reguliert werden könnte. Daher sollte untersucht werden, ob die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA durch siRNA-vermittelte Depletion von Proteinen, die in SGs akkumulieren und für die SG-Assemblierung wichtig sind, aufgehoben werden kann. Dafür wurden das *T-cell restricted intracellular antigen 1* (TIA1), das *TIA1-related protein* (TIAR) sowie das *GTPase 3 activating binding protein 1* (G3BP1) ausgewählt (Anderson und Kedersha, 2008). Die siRNAs waren gegen die mRNAs aller bekannten Isoformen dieser Proteine gerichtet (siehe Anhang 7.1, Tab. 5). Um eine Beeinträchtigung der HCV-Replikation durch die simultane Depletion von TIA1, TIAR und G3BP1 auszuschließen, wurden die Expression von HCV-NS5A sowie die HCV-RNA-Menge bestimmt. Da die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA nur in transient transfizierten Zellen zu beobachten war, wurden die Untersuchungen ausschließlich mit diesen Zellen durchgeführt. Für die simultane Depletion der SG-Proteine wurden die spezifischen siRNAs gegen TIA1, TIAR und G3BP1 vereinigt (siSG). Der Ansatz aus den 3 siRNAs (siSG) wurde in naive Huh7-Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit den HCV- bzw. HCV-mut-Replikon transient transfiziert (siehe 2.2.2.2.3) und für weitere 48 h kultiviert. Die Effizienz der Depletion wurde auf Proteinebene mittels Immunoblot verifiziert (siehe 2.6.9), wobei Vinculin als Referenz detektiert wurde. Als Kontrolle wurde eine siRNA gegen die mRNA des *green-fluorescent protein* (siGFP) appliziert. Die Effizienz der HCV-RNA-Replikation wurde durch Messung der viralen RNA mittels qRT-PCR und Detektion von HCV-NS5A durch Immunoblot bestimmt. Im Weiteren wurde untersucht, ob die simultane Depletion von TIA1, TIAR und G3BP1 zu Veränderungen im Abbau der VEGF-mRNA führt. Die Analysen wurden mittels Actinomycin D-Assay (siehe 2.2.2.4) und qRT-PCR (siehe 2.4.2) durchgeführt. Die Proteine TIA1, TIAR und G3BP1 konnten durch die Applikation der siRNAs deutlich depletiert werden (Abb. 22, A). Bei Betrachtung der Kontrolle (HCV siGFP) wird ersichtlich, dass die längere Isoform von TIA1 in deutlich größerer Quantität in der Zelle vorliegt als die kürzere Isoform (Abb. 22, A). Die Menge an detektierbaren HCV-NS5A-Protein (Abb. 22, A) und HCV-RNA (nicht dargestellt) blieb in allen Proben konstant. Dies deutete darauf hin, dass die simultane Depletion von TIA1, TIAR und G3BP1 keinen Einfluss auf die HCV-Replikation hat. Die Berechnung der Halbwertszeit der VEGF-mRNA erfolgte wie unter 2.4.3 beschrieben. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Ergebnisse als Actinomycin D-Endpunkt-Assay dargestellt. Zellen, welche mit dem HCV-Replikon und der Kontroll-siRNA transfiziert wurden, zeigten die bereits beschriebene, posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA (Abb. 22, B).

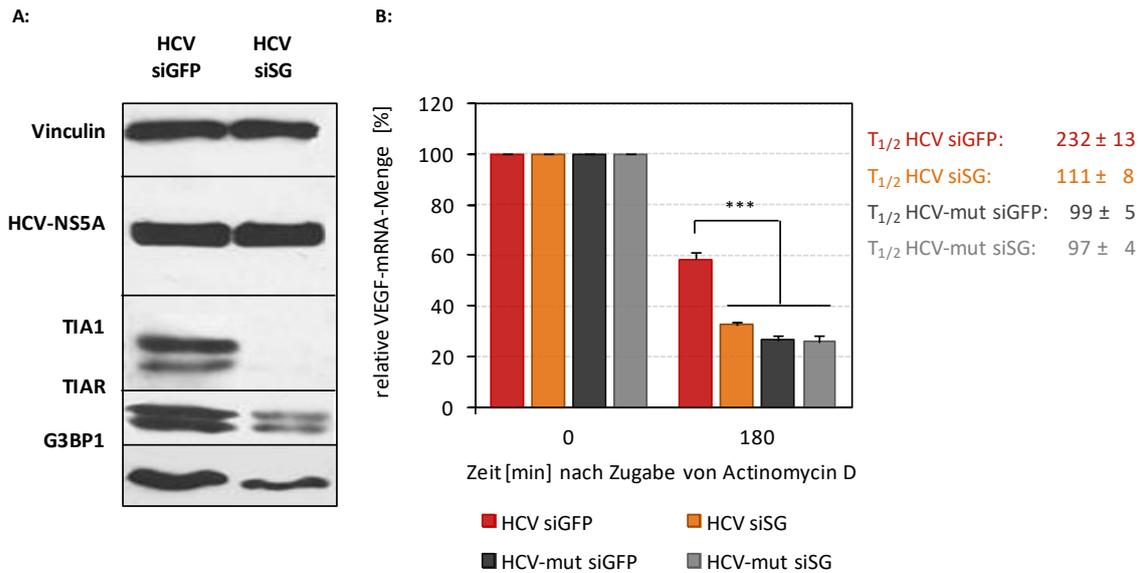


Abb. 22: Simultane Depletion von TIA1, TIAR und G3BP1 führt zum Verlust der VEGF-mRNA-Stabilisierung

A: Die SG-Komponenten TIAR (42/43 kDa), G3BP1 (52 kDa) und TIA1 (42/43 kDa) wurden durch simultane siRNA Applikation (siSG) in Huh7-Zellen depletiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit HCV- bzw. HCV-mut-Replikon transient transfiziert. Als Kontrolle wurde eine siRNA gegen GFP (siGFP) verwendet. Die Depletion wurde 48 h *p.t.* mittels Immunoblot und spezifischen Antikörper gegen die Proteine TIA1, TIAR und G3BP1 verifiziert. Exemplarisch dargestellt sind die Proben aus Zellen, die HCV-RNA replizieren. Die Detektion erfolgte aus 30 µg Gesamtprotein einen Nahinfrarot-scan bei 700 bzw. 800 nm. Als Referenz wurde Vinculin (120 kDa) detektiert. Zur Überprüfung der Replikation der HCV-RNA wurde die Expression des HCV-NS5A-Proteins (56 kDa) mittels Immunoblot analysiert. Protein-Marker: *Page Ruler™ prestained ladder*. **B:** Parallel dazu wurde der Abbau der VEGF-mRNA mittels Actinomycin D-Assay untersucht und die Halbwertszeiten ($T_{1/2}$) durch halblogarithmisches Auftragen der relativen Transkriptmengen gegen die Zeit und exponentielle Regression bestimmt. Die Ausgangswerte wurden 100 % gleichgesetzt. Die mRNA von GAPDH diente als interne Referenz. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die relativen Mittelwerte als Actinomycin D-Endpunkt-Assay dargestellt. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten dar. Unterschiede zwischen den Probenansätzen wurden mittels Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (***) $P < 0,0001$

Bei simultaner Depletion von TIA1, TIAR und G3BP1 (siSG) wurde in diesen Zellen hingegen ein verstärkter Abbau der VEGF-mRNA und damit einen Rückgang ihrer posttranskriptionellen Stabilisierung detektiert (Abb. 22, B). Die Halbwertszeit der VEGF-mRNA verringerte sich von 232 ± 13 min (HCV siGFP) auf 111 ± 8 min (HCV siSG). Dabei blieb die Induktion der VEGF-Transkription unbeeinflusst (nicht dargestellt). Die simultane Depletion von TIA1, TIAR und G3BP1 in mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen führte demnach zum Verlust der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA. Mit dem HCV-mut-Replikon transfizierte Zellen wiesen wie erwartet keine Stabilisierung der VEGF-mRNA auf (Abb. 22, B; $T_{1/2}$ HCV-mut siGFP: 99 ± 5 min; $T_{1/2}$ HCV-mut siSG: 97 ± 4 min). Daher sollte in einem analogen Experiment ermittelt werden, ob der Verlust der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA in der simultanen Depletion von TIA1, TIAR und G3BP1 begründet lag oder auch durch die Depletion jedes einzelnen Proteins induziert werden kann (Abb. 23). Dafür wurden die entsprechenden siRNAs separat in Huh7-Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit dem HCV-Replikon transfiziert (siehe 2.2.2.2.3) und für weitere 48 h kultiviert.

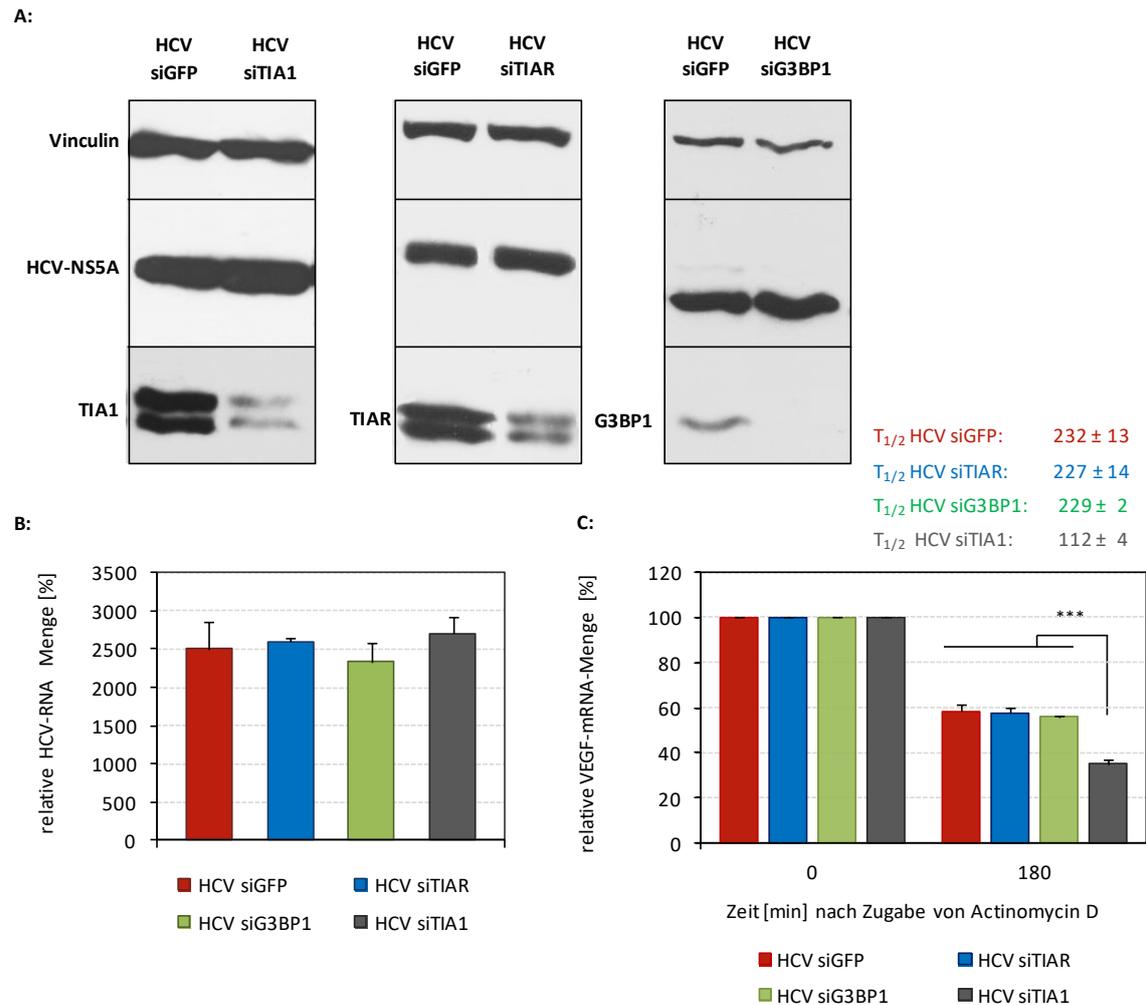


Abb. 23: Die Depletion von TIA1 führt zu zum Verlust der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA

Die Proteinmenge von TIA1 (42/43 kDa), TIAR (42/43 kDa) und G3BP1 (52 kDa) wurde in naiven Huh7-Zellen durch siRNA-vermittelte Depletion reduziert. Nach 24 h wurden die Zellen transient mit dem HCV- bzw. HCV-mut-Replikon transfiziert. **A:** Die Effizienz der Depletion wurde 48 h *p.t.* aus 30 µg Gesamtprotein mittels Immunoblot analysiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über fluoreszenzgekoppelte sekundäre Antikörper durch einen Nahinfrarot-*scan* bei 700 bzw. 800 nm. Als Kontrolle wurde eine siRNA gegen GFP (siGFP) verwendet. Zur Überprüfung der HCV-RNA-Replikation wurde HCV-NS5A (56 kDa) und als Ladekontrolle Vinculin (120 kDa) detektiert. Protein-Marker: *Page Ruler™ prestained ladder*. **B:** Parallel dazu wurde die Effizienz der HCV-RNA-Replikation durch Messung der HCV-RNA mittels qRT-PCR bestimmt. **C:** Untersuchung des VEGF-mRNA-Abbaus. Die Halbwertszeit der VEGF-mRNA wurde mittels Actinomycin D-Assay bestimmt (qRT-PCR) und über die ΔC_T -Methode ausgewertet. Als Referenzgen diente GAPDH. Die Ausgangswerte wurden 100 % gleichgesetzt. Exemplarisch wurden die relativen Mittelwerte der residualen VEGF-mRNA-Menge als Actinomycin D-Endpunkt-Assay dargestellt. Unterschiede zwischen den Probensätzen wurden mittels Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (***) $P < 0,0001$. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten dar.

Von allen getesteten Proteinen (TIA1, TIAR, G3BP1) hatte ausschließlich die Depletion von TIA1 einen Einfluss auf die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA (Abb. 23, C). So war die Halbwertszeit der VEGF-mRNA nach Transfektion des HCV-Replikons in TIA1-depletierten Zellen um die Hälfte reduziert ($T_{1/2}$ HCV siTIA1 = 112 ± 4 min) im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden ($T_{1/2}$ HCV siGFP = 232 ± 13 min; Abb. 23, C). Die Depletion von TIAR und G3BP1 hatte hingegen keinen Einfluss

auf die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA ($T_{1/2}$ HCV siTIAR = 227 ± 14 min, $T_{1/2}$ HCV siG3BP1 = 229 ± 2 min; Abb. 23, C). Die Replikation der HCV-RNA blieb dabei unbeeinflusst (Abb. 23, A und B).

Dies lässt darauf schließen, dass die separate Depletion von TIA1, TIAR und G3BP1 keinen Einfluss auf die HCV-RNA-Replikation bzw. EMCV-IRES-abhängige Translation der HCV-Proteine hat. Die Ergebnisse implizieren, dass die Präsenz von TIA1 essentiell für die HCV-vermittelte, posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA ist. Dies ist besonders interessant, da es sich hierbei um den Einfluss eines einzelnen Proteins handelt.

3.7 Assemblierung von SGs in TIA1-depletierten Zellen, unter oxidativen Stress und der Replikation von WNV-RNA

In den vorangehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass TIA1 an der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA beteiligt ist. Zudem ist TIA1 als Faktor für die Assemblierung von Stress-induzierten SGs beschrieben (Gilks *et al.*, 2004). Daher sollte überprüft werden, ob die Depletion von TIA1, neben der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA, auch die HCV-induzierte SG-Assemblierung inhibiert. Dafür wurden naive Huh7-Zellen mit siRNA gegen TIA1 (siTIA) bzw. mit Kontroll-siRNA (siGFP) transfiziert und für 24 h kultiviert. Danach wurde das HCV-Replikon in die Zellen transfiziert und diese auf Deckgläschen ausgesät. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und einer indirekten Immunfluoreszenz unterzogen (siehe 2.6.3). Die HCV-RNA-Replikation wurde durch Detektion des HCV-NS5A-Proteins verifiziert und ermöglichte die Bestimmung der Transfektionsrate. Die Depletion von TIA1 wurde mittels eines TIA1-spezifischen Antikörpers nachgewiesen und die SG-Assemblierung über einen TIAR spezifischen Antikörper. Die Transfektionsrate des HCV-Replikons lag bei ca. 75 % (Abb. 24). Alle Zellen, die über TIAR- bzw. TIA1-Antikörper markierte SGs aufwiesen, waren auch positiv für die Detektion von HCV-NS5A. Die Anzahl dieser Zellen wurde ins Verhältnis gesetzt zur Gesamtanzahl HCV-NS5A-positiver Zellen im Bildausschnitt. Dadurch wurde einerseits die Effizienz der TIA1-Depletion ermittelt (TIA1-Antikörper), andererseits wurde bestimmt, wie viele der Zellen, die eine effiziente HCV-RNA-Replikation und TIA1-Depletion aufweisen (HCV siTIA1), dennoch SGs bildeten (TIAR-Antikörper). Circa 70 % der Zellen, die mit der Kontroll-siRNA und dem HCV-Replikon transfiziert wurden, wiesen SGs auf (HCV siGFP), welche mittels TIA1- oder TIAR-Antikörper detektiert werden konnten (Abb. 24). In TIA1-depletierten Zellen konnten TIA1-markierte SGs nur in 20 % der mit HCV-Replikon transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 24). Der Nachweis von TIAR-markierten SGs war hingegen ebenfalls in etwa 70 % der Zellen möglich. Somit konnte TIA1 effizient depletiert werden, jedoch war die HCV-induzierte Assemblierung von SG durch die Depletion von TIA1 offenbar nicht beeinflusst.

Dies ist eine Indikation dafür, dass die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA zwar von TIA1, aber nicht von der SG-Bildung abhängt. Zudem korreliert es mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass eine siRNA-vermittelte TIA1-Depletion im Prostatakarzinomzellen nicht zur Inhibierung der hypoxieinduzierten SG-Formierung führt (Gottschald *et al.*, 2010). Besonders interessant ist dies, da TIA1 als RNA-Bindeprotein und dynamische SG-Komponente beschrieben wird, deren Lokalisation kontinuierlich zwischen Zytoplasma und SGs variieren kann (Kedersha *et al.*, 2000; Gilks *et al.*, 2004). Somit kann es vermutlich auch weitere Funktionen innerhalb der Zelle übernehmen. Eine weitere, hieraus resultierende Hypothese war demzufolge, dass TIA1 auch teilweise im nicht SG-assoziierten Zustand vorliegen könnte und somit an der Stabilisierung der VEGF-mRNA im Zytoplasma der Zelle beteiligt sein könnte.

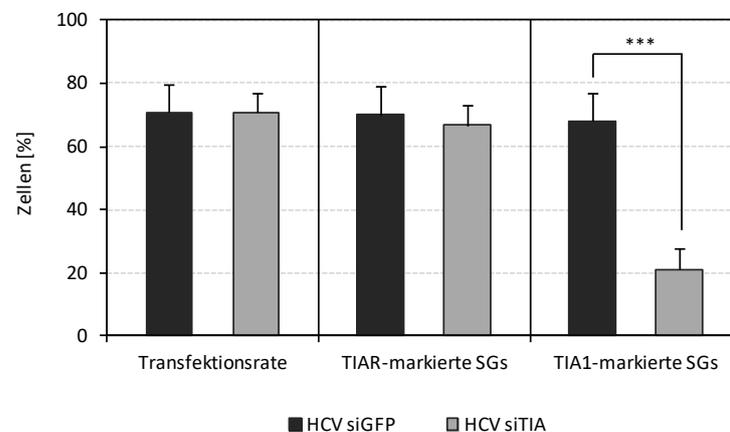


Abb. 24: Depletion von TIA1 führt nicht zum Verlust von *stress granules*

Graphische Darstellung der Transfektions- und SG-Rate in transient transfizierten Zellen. Huh7-Zellen wurden mit siRNAs gegen TIA1 bzw. GFP transfiziert und 24 h später transient mit dem HCV-Replikon transfiziert. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen fixiert und einer indirekten Immunfluoreszenz unterzogen. Immunologisch markiert wurde das virale HCV-NS5A-Protein, zur Überprüfung der Transfektionsrate, sowie die SG-Komponenten TIA1 und TIAR. Zur Bestimmung der Transfektionsrate wurde die Zahl der Zellen, die HCV-NS5A exprimieren ins Verhältnis zur Gesamtanzahl an Zellen (DAPI-Färbung) im Bildausschnitt gesetzt. Die Anzahl der Zellen mit entsprechend markierten SGs wurde ins Verhältnis der Zellen im Bildausschnitt gesetzt, die effizient HCV-RNA replizieren (HCV-NS5A). Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten dar, bei denen jeweils ca. 250 Zellen ausgezählt wurden. Unterschiede zwischen den Probenansätzen wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (***) $P < 0,0001$.

Die These, dass die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA zwar von TIA1, aber nicht von der SG-Assemblierung abhängt sollte weiter untermauert werden. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob durch die stressinduzierende Applikation von Dinatriumhydrogen-Arsenat-Heptahydrat (Arsenatreagenz, Na_2HAsO_4) die SG-Assemblierung in der persistenten HCV-Zelllinie induziert werden kann. Aus vorangegangenen Experimenten war bereits bekannt, dass in der HCV-Zelllinie weder eine HCV-induzierte SG-Assemblierung noch eine posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA vorliegt (siehe 3.5.1 und 3.2.1). Zudem bewirkt die Applikation von Arsenatreagenz keine posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA (siehe 3.2.1).

Für die Untersuchung wurden naive Huh7-Zellen und Zellen der persistenten HCV-Zelllinie auf Deckgläschen ausgesät. Nach 24 h wurde durch die Applikation von Arsenatreagenz (2,5 mM) für 60 min oxidativer Stress in den Zellen ausgelöst (siehe 2.2.2.5). Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Mittels spezifischer Antikörper gegen HCV-NS5A und TIA1 wurde die HCV-RNA-Replikation (HCV-NS5A) und die SG-Assemblierung (TIA1) durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Zugabe von Di-Natriumhydrogen-Arsenat-Heptahydrat bewirkte die Assemblierung von SGs in naiven Huh7-Zellen sowie in der persistenten HCV-Zelllinie (Abb. 25, B).

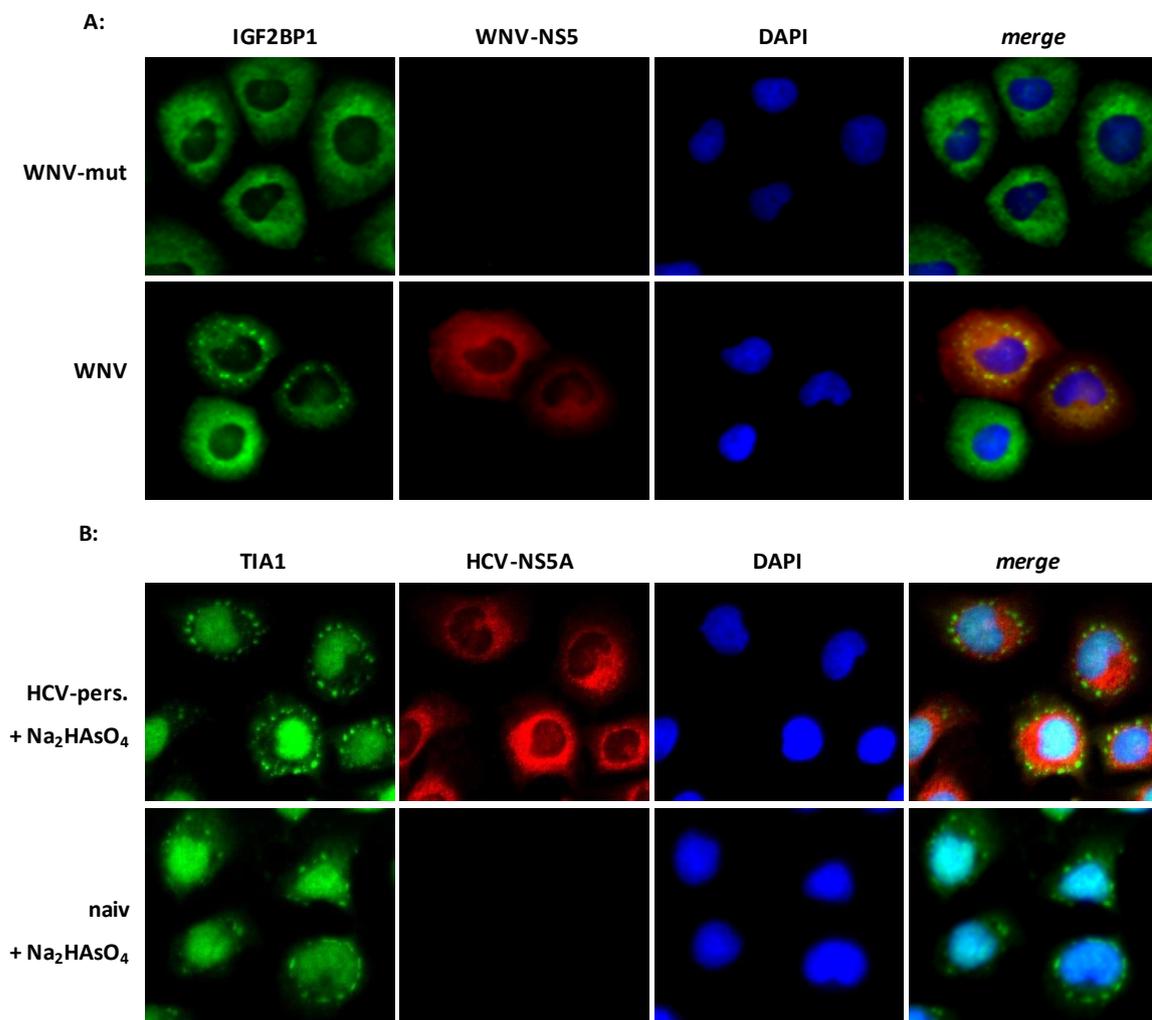


Abb. 25: Mit WNV-Replikon transfizierte sowie mit Arsenatreagenz behandelte Zellen zeigen SG-Assemblierung

A: Naive Huh7-Zellen wurden mit dem WNV-Replikon (WNV/WNV-mut) transient transfiziert und für 48 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und einer indirekten Immunfluoreszenz und Mikroskopie unterzogen. Die Detektion des SG-Markerproteins (IGF2BP1) und des WNV-NS5-Proteins wurde mittels spezifischer, primärer und sekundärer Antikörper durchgeführt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte durch *ProLong® Gold antifade reagent* mit DAPI. Die Aufnahmen wurden in 400-facher Vergrößerung (40 x-Objektiv) gemacht. **B:** Parallel dazu wurden naive Huh7-Zellen und Zellen der persistenten HCV-Zelllinie für 60 min mit Arsenatreagenz (2,5 mM) behandelt, um oxidativen Stress zu induzieren. Die Detektion des HCV-NS5A-Proteins sowie von TIA1 erfolgte ebenfalls mittels spezifischer primärer und sekundärer Antikörper sowie indirekter Immunfluoreszenz.

Jedoch konnte unter dem so induzierten oxidativen Stress, weder in naiven Huh7-Zellen noch in der persistenten HCV-Zelllinie eine posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA festgestellt werden (siehe 3.2.1).

In einem weiteren, analogen Experiment wurde überprüft, ob durch die Transfektion des WNV-Replikons (WNV, WNV-mut) ebenfalls die Assemblierung von SGs hervorgerufen wird, obwohl hier keine posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA vorlag. Die Replikation der WNV-RNA wurde durch Nachweis des WNV-NS5-Proteins und die Assemblierung von SGs durch den Nachweis des IGF2BP1-Proteins mittels indirekter Immunfluoreszenz überprüft. Abbildung 25 (A) zeigt, dass die mit dem WNV-Replikon transfizierten Zellen eine zytoplasmatische Assemblierung von SGs aufwiesen. Die mit dem WNV-mut-Replikon transfizierten Zellen wiesen hingegen keine granuläre Lokalisation von IGF2BP1 auf, d.h. hier war IGF2BP1 gleichmäßig im Zytoplasma der Zellen verteilt. Die Annahme, dass die Stabilisierung der VEGF-mRNA unabhängig von der Assemblierung virusinduzierter SGs war, konnte durch diese Untersuchung weiter untermauert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass transient mit dem WNV-Replikon transfizierte Zellen ebenso in der Lage waren SGs zu bilden wie mit Arsenatreagenz behandelte Huh7-Zellen bzw. mit Arsenatreagenz behandelte Zellen der persistenten HCV-Zelllinie. Diese SGs führten jedoch nicht zur posttranskriptionellen Stabilisierung VEGF-mRNA. Die Daten bestärken daher die Vermutung, dass in der persistenten HCV-Zelllinie eine Adaptation auf zellulärer Ebene vorliegt, welche die HCV-abhängige Assemblierung von SGs reprimiert. Zudem verringerte die siRNA-vermittelte Depletion von TIA1 die Stabilisierung der VEGF-mRNA in transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen. Die grundlegende Assemblierung von SGs (Abb. 24) wurde dadurch jedoch nicht inhibiert. Daher ist TIA1 möglicherweise unabhängig von anderen SG-Komponenten an der Stabilisierung der VEGF-mRNA beteiligt.

3.8 Die Expression der kurzen Isoform von TIA1 induziert die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde TIA1 als Faktor identifiziert, der an der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA beteiligt ist. Es existieren zwei Isoformen von TIA1: eine kürzere Variante (TIA1vl, GI:188219593) und eine um 11 Aminosäuren längere (TIA1vll, GI:188219591). Bei der kurzen (TIA1vl) Isoform liegt zwischen 1. und 2. *RNA-recognition-motif* (RRM) anstelle der Aminosäuren SSTVVSTQRSQD ein Asparagin (N) vor (Izquierdo und Valcárcel, 2007; siehe Diskussion, 4.3). Beide Isoformen sollten im Kontext der HCV-RNA-Replikation weiter untersucht werden. Dafür wurden die cDNAs der beiden TIA1-Isoformen in den pcDNA3-Vektor kloniert.

3.8.1 Die TIA1-mRNA-Menge in transient transfizierten Huh7-Zellen

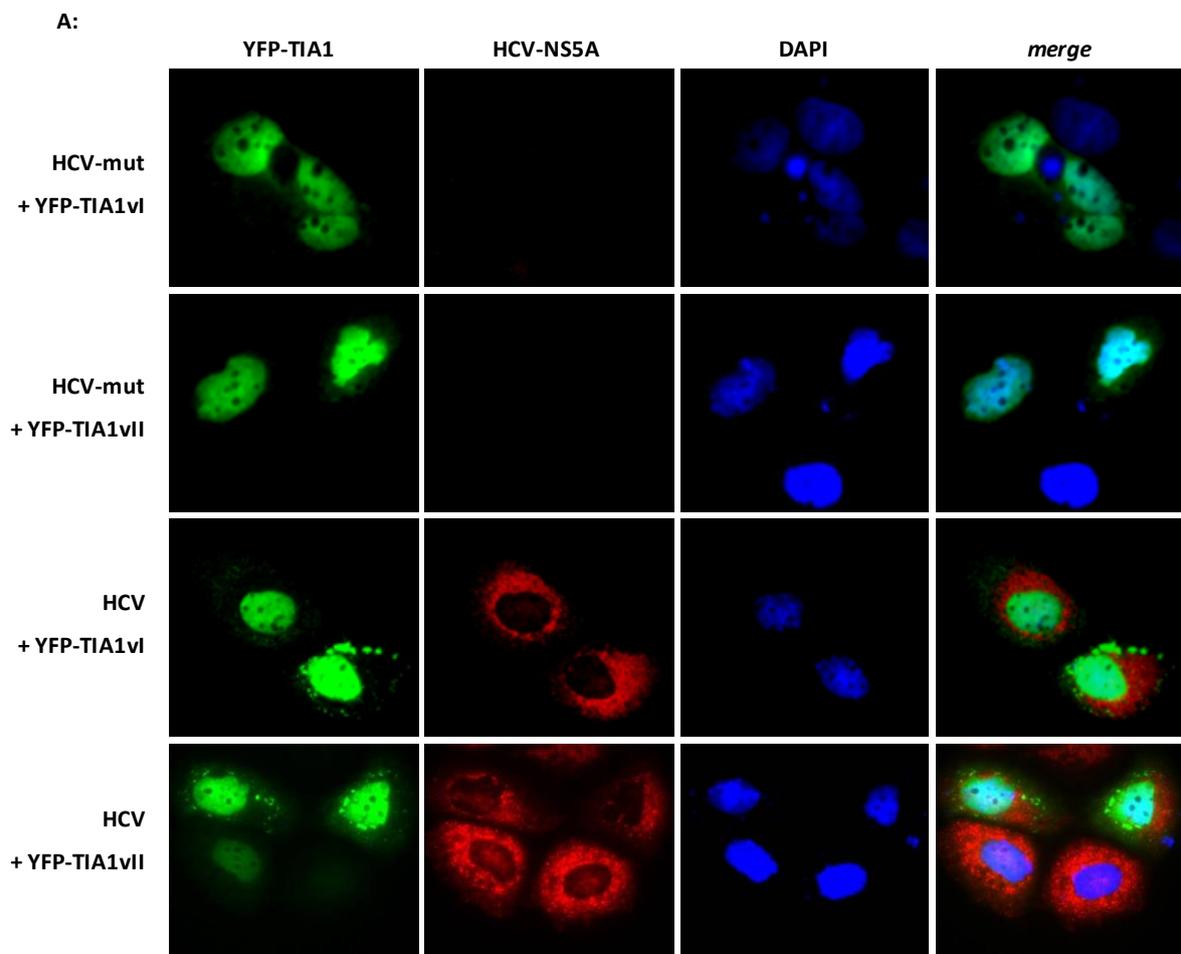
Zunächst wurde mittels qRT-PCR analysiert, ob die TIA1-Isoformen in naiven oder mit HCV-RNA transfizierten Zellen transkriptionell unterschiedlich reguliert werden. Dafür wurden naive Huh7-Zellen, Zellen der persistenten HCV-Zelllinie sowie transient mit den HCV-Replikons transfizierte Zellen untersucht. In transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen war die Transkriptmenge von TIA1vI und TIA1vII erhöht im Vergleich zu naiven Huh7-Zellen, mit dem HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen sowie der persistenten HCV-Zelllinie (48 h *p.t.*). Dabei war die TIA1vI-mRNA (kurze Isoform) auf den ca. 3-fachen, die TIA1vII-mRNA (lange Isoform) auf den ca. 2-fachen Wert gesteigert (nicht dargestellt). Dies korreliert mit den Ergebnissen aus 3.6, wonach TIA1 mutmaßlich in die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA involviert ist.

3.8.2 TIA1vI lokalisiert nicht ausschließlich in SGs

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass die Transkriptmenge beider TIA1-Isoformen unter dem Einfluss der HCV-RNA-Replikation erhöht wurde (siehe 3.8.1), wobei für TIA1vI eine moderat stärkere Erhöhung detektiert werden konnte. Aufgrund dieser Tatsache, sollte im Folgenden untersucht werden, ob beide oder nur eine der TIA1-Isoformen in *stress granules* aggregieren. Dafür wurden beide TIA1-Isoformen als Fusionsprotein mit N-terminalen FLAG-tag kloniert (FLAG-TIA1vI_pcDNA3/FLAG-TIA1vII_pcDNA3). Desweiteren wurde das TIA1vI_pEYFP-C1- und das TIA1vII_pEYFP-C1-Plasmid verwendet, bei welchem die kodierende Sequenz (cds) von TIA1vI bzw. TIA1vII N-terminal mit einem *yellow fluorescent protein-tag* (YFP-tag) fusioniert ist (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Hüttelmaier, ZAMED Halle; siehe Anhang 7.1, Tab. 6). Der YFP-tag ermöglicht die Detektion von YFP-TIA1vI und YFP-TIA1vII mittels Fluoreszenzmikroskopie, ohne immunologische Markierung der Proteine über fluoreszenzgekoppelte Antikörper (Chalfie, 1995; Macheroux *et al.*, 1987). Zur Bestimmung der Lokalisation beider TIA1-Isoformen wurden zunächst naive Huh7-Zellen mit den HCV-Replikons (HCV, HCV-mut) transient transfiziert. Nach 24 h wurden diese Zellen bzw. die Zellen der persistenten HCV-Zelllinie mit den entsprechenden TIA1-Plasmiden transfiziert. Die Probenentnahme erfolgte nach weiteren 24 h durch Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd. Die Zellen wurden zur Detektion des HCV-NS5A-Proteins bzw. der FLAG-TIA1-Proteine einer indirekten Immunfluoreszenz unterzogen (siehe 2.6.3). In Abbildung 26 (A, B) wird ersichtlich, dass die TIA1-Isoformen effizient exprimiert werden konnten. In Zellen, die mit dem HCV-mut-Replikon transfiziert wurden, lokalisierten beide YFP-TIA1-Isoformen hauptsächlich im Zellkern bzw. im Zytoplasma der Zelle und akkumulierten nicht in SGs (Abb. 26, A). Ebenso verhielten sich die beiden FLAG-TIA1-Varianten in der persistenten HCV-Zelllinie. Die Expression von FLAG-TIA1vI bzw. FLAG-TIA1vII induzierte hier nicht die SG-Assemblierung (Abb. 26, B). In den transient mit

dem HCV-Replikon transfizierten Zellen hingegen waren YFP-TIA1vI sowie YFP-TIA1vII im Zellkern sowie in zytoplasmatischen SGs lokalisiert (Abb. 26, A). Demnach sind beide TIA1-Isoformen in der Lage in HCV-induzierten SGs zu akkumulieren. Um dies genauer zu differenzieren, wurde der prozentuale Anteil der Zellen berechnet, in denen YFP-TIA1vI bzw. YFP-TIA1vII in SGs detektiert werden konnte. Dafür wurden Zellen, die positiv für die Replikation der HCV-RNA waren und die Expression von YFP-TIA1vI oder YFP-TIA1vII aufwiesen, ausgezählt. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 (C) graphisch dargestellt. In Zellen, die transient HCV-RNA replizierten sowie YFP-TIA1 exprimierten, konnte YFP-TIA1vII in ca. 50 % der Zellen in SGs detektiert werden. YFP-TIA1vI hingegen lokalisierte nur in ca. 15 % dieser Zellen in SGs.

Dies impliziert mögliche Unterschiede in der Funktion beider TIA1-Isoformen bei der SG-Assemblierung und der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA.



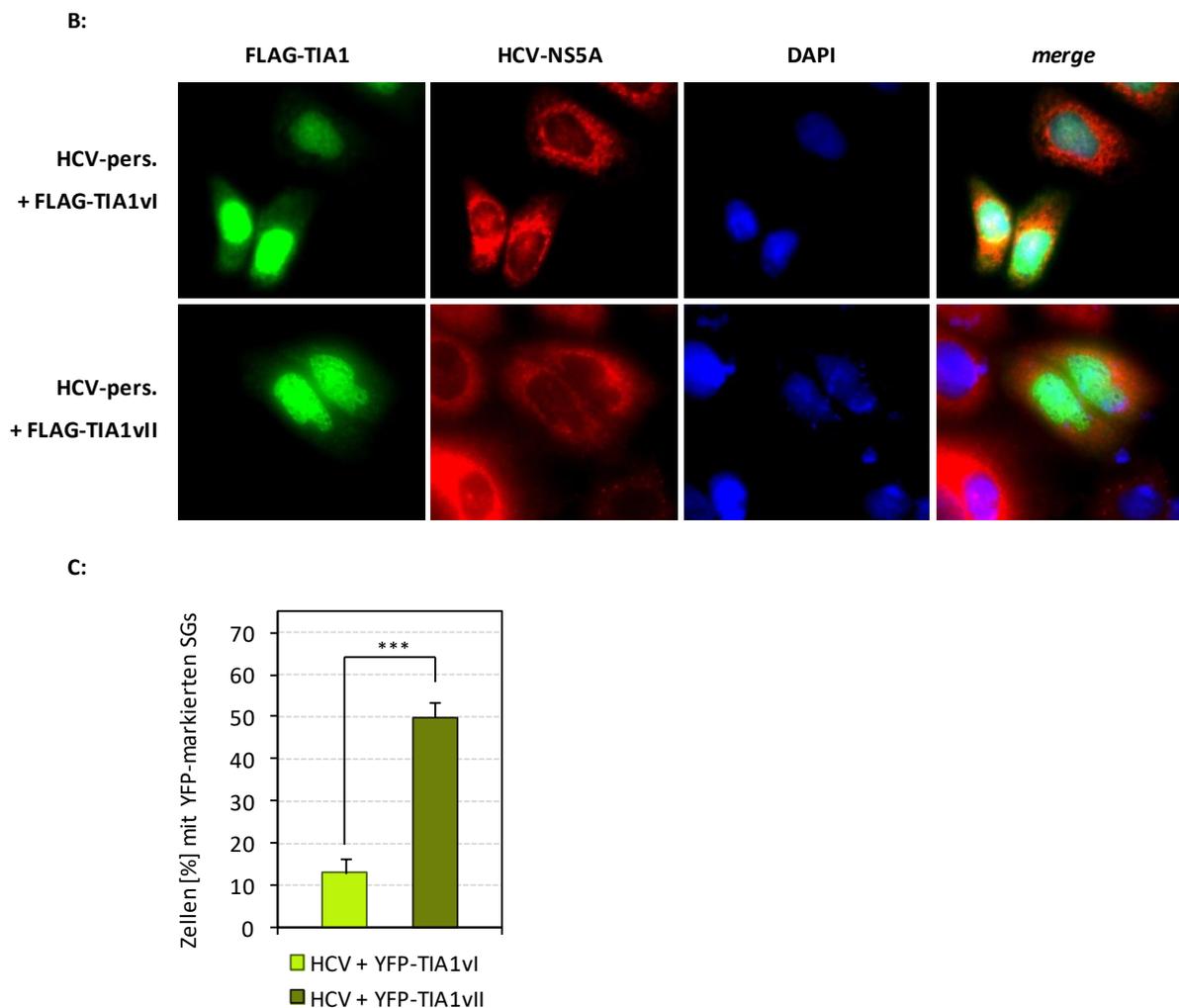


Abb. 26: Lokalisation der TIA1-Isoformen innerhalb der Zelle

A: Naive Huh7-Zellen wurden transient mit dem HCV- bzw. HCV-mut-Replikon transfiziert und für 24 h kultiviert. Anschließend wurden YFP-TIA1vI und YFP-TIA1vII für 24 h in den Zellen exprimiert. Dafür wurden die Plasmide TIA1vI_pEYFP-C1 und TIA1vII_pEYFP-C1 in die Zellen transfiziert. Die exprimierten TIA1-Proteine sind mit einem N-terminalen YFP-tag fusioniert, welches direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden konnte. Das virale HCV-NS5A-Protein wurde durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Färbung des Zellkerns erfolgte durch *ProLong® Gold antifade reagent* mit DAPI. Die Aufnahmen wurden in 400-facher Vergrößerung (40 x-Objektiv) gemacht. **B:** Analog wurden die Plasmide FLAG-TIA1vI_pcDNA3 und FLAG-TIA1vII_pcDNA3 in Zellen der persistenten HCV-Zelllinie transfiziert. Die TIA1-Isoformen wurden mit einem N-terminalen FLAG-Fusionsprotein exprimiert. Der Nachweis von FLAG-TIA1vI und FLAG-TIA1vII erfolgte über indirekte Immunfluoreszenz. **C:** Graphische Darstellung der Lokalisation der YFP-TIA1-Isoformen innerhalb transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen. Zellen, die eine effiziente Replikation der HCV-RNA und die Expression von YFP-TIA1vI oder YFP-TIA1vII aufwiesen, wurden ausgezählt und 100 % gleichgesetzt. Parallel dazu wurde berechnet, bei welchem Anteil dieser Zellen YFP-TIA1vI bzw. YFP-TIA1vII in SGs akkumulierte. Das Experiment wurde 3-mal unabhängig voneinander durchgeführt. Insgesamt wurden jeweils ca. 700 Zellen ausgezählt. Unterschiede zwischen den Probensätzen wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (***) $P < 0,0001$.

3.8.3 Die Expression von FLAG-TIA1vl rekonstituiert die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie

Bei den Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde festgestellt, dass TIA1vII ca. 3-mal häufiger in SGs akkumuliert als TIA1vl. Somit könnten, bei gleichbleibend effizienter Replikation der HCV-RNA, unterschiedliche Funktionen beider TIA1-Isoformen innerhalb der Zelle vorliegen. Daher sollte analysiert werden, ob eine Erhöhung der TIA1vl- oder TIA1vII-Proteinmenge (FLAG-TIA1vl-, FLAG-TIA1vII-Plasmid) in persistent bzw. transient HCV-RNA replizierenden Zellen (HCV-pers., HCV) zu einer Rekonstituierung (HCV-pers.) oder Verstärkung (HCV) der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA führt, wodurch sich die Halbwertszeit der VEGF-mRNA erhöhen würde. Als Kontrolle wurde die Degradation der VEGF-mRNA in Zellen analysiert, die mit den WNV-Replikons transfiziert wurden und transient FLAG-TIA1vl bzw. FLAG-TIA1vII exprimieren. Die Transfektion der Plasmide (FLAG-TIA1vl_pcDNA3, FLAG-TIA1vII_pcDNA3) erfolgte 24 h nach der Transfektion der entsprechenden viralen Replikons (siehe 2.3; 2.2.2.2.3). Nach weiteren 24 h wurde ein Actinomycin D-Endpunkt-Assay durchgeführt und die VEGF-Transkriptmenge mittels qRT-PCR bestimmt (siehe 2.2.2.4; Abb. 27). Die Expression von FLAG-TIA1vl und FLAG-TIA1vII sowie HCV-NS5A wurde 24 h bzw. 48 h nach der Plasmid-Transfektion mittels SDS-PAGE und Immunoblot überprüft (siehe 2.6.8, 2.6.9; nicht dargestellt). Die Expression der langen Isoform von TIA1 als FLAG-Fusionsprotein (FLAG-TIA1vII) beeinflusste in keinem der untersuchten Probensätzen die Degradation der VEGF-mRNA. Interessanterweise konnte jedoch in Zellen, die HCV-RNA replizieren und die kurze Isoform (FLAG-TIA1vl) exprimieren (HCV + FLAG-TIA1vl, HCV-pers. + FLAG-TIA1vl) eine signifikant erhöhte VEGF-Transkriptmenge nach 180 min Actinomycin D-Behandlung detektiert werden (Abb. 27). In transient HCV-RNA replizierenden Zellen ohne FLAG-TIA1vl Expression lag die zu diesem Zeitpunkt gemessene VEGF-mRNA-Menge bei ca. 57 % des Ausgangswertes und entsprach einer Halbwertszeit von 227 ± 6 min (siehe 3.2.1). Bei zusätzlicher Expression von FLAG-TIA1vl wurde die VEGF-mRNA im gleichen Zeitraum auf lediglich ca. 80 % des Ausgangswertes degradiert. In der persistenten HCV-Zelllinie resultierte die 24-stündige Expression von FLAG-TIA1vl ebenfalls in einer verlangsamten Degradation der VEGF-mRNA. Diese wurde hier auf ca. 58 % der Ausgangsmenge abgebaut. Zellen der persistenten HCV-Zelllinie, ohne Expression von FLAG-TIA1vl, wiesen im Vergleich dazu einen Abbau auf ca. 26 % der Ausgangsmenge auf. Dies spricht für eine Rekonstituierung der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA. Daher wurde zusätzlich die Halbwertszeit der VEGF-mRNA in diesen Zellen (HCV-pers. + FLAG-TIA1vl) bestimmt. Durch die Expression von FLAG-TIA1vl steigerte sich die Halbwertszeit der VEGF-mRNA von 97 ± 10 min (HCV-pers.; siehe 3.2.1) auf 226 ± 22 min (HCV-pers. + FLAG-TIA1vl; nicht dargestellt). Somit lag sie auf dem gleichen Niveau, wie die Halbwertszeit der VEGF-mRNA in Huh7-Zellen, die transient HCV-RNA replizieren

(siehe 3.2.1). Obwohl die Halbwertszeit der VEGF-mRNA durch die Expression von FLAG-TIA1vl in der persistenten HCV-Zelllinie erhöht wurde, konnte keine Assemblierung von SGs nachgewiesen werden (siehe 3.8.2, Abb. 26, B). Demnach scheint die HCV-assoziierte, posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA unabhängig von der SG-Assemblierung zu sein. In Zellen, die mit dem HCV-mut-Replikon oder den WNV-Replikons (WNV, WNV-mut) transfiziert wurden, konnte hingegen durch die Expression von FLAG-TIA1vl bzw. FLAG-TIA1vII keine Veränderung in der Degradation der VEGF-mRNA detektiert werden (Abb. 27).

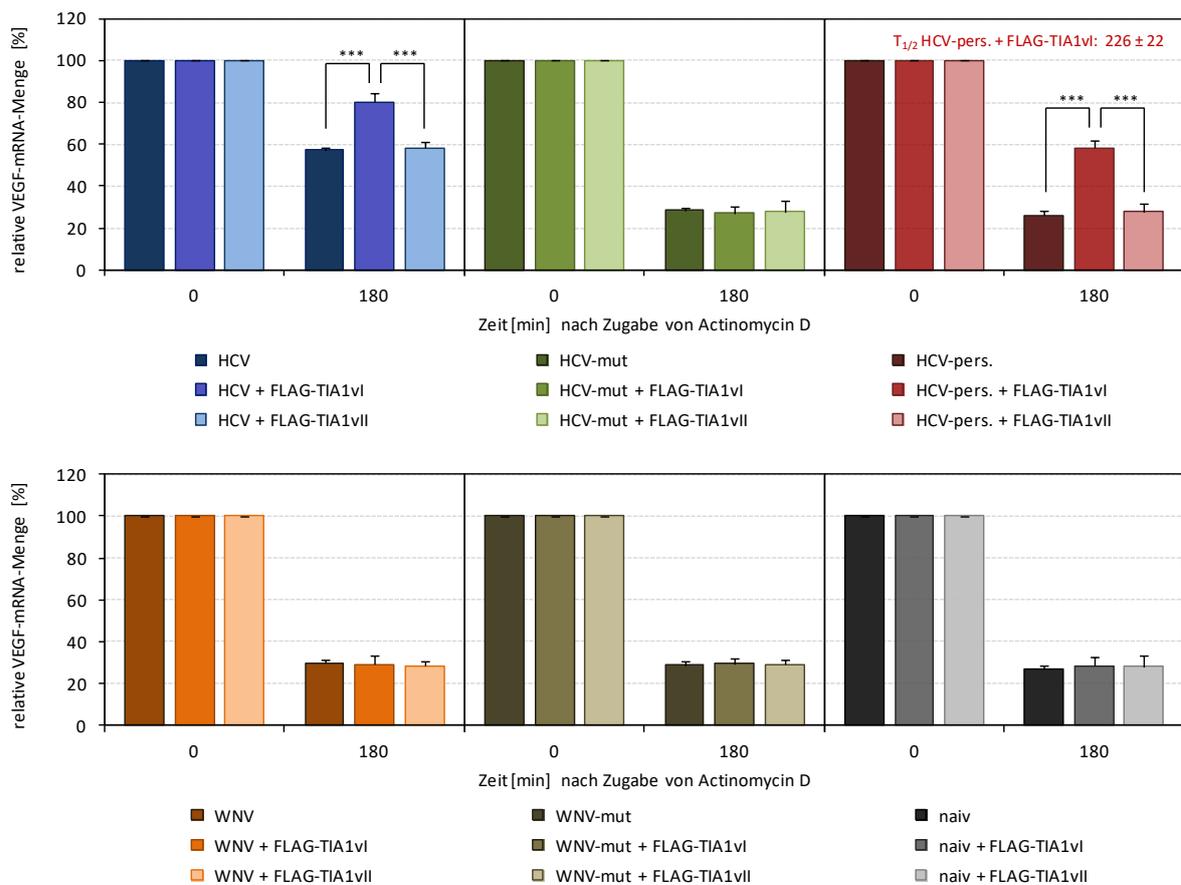


Abb. 27: Erhöhung der VEGF-mRNA-Halbwertszeit in HCV-RNA replizierenden Zellen durch die Expression von FLAG-TIA1vl

Die beiden TIA1-Isoformen mit N-terminalen FLAG-tag (FLAG-TIA1vl/FLAG-TIA1vII) wurden in Zellen exprimiert, die transient bzw. persistent HCV-RNA replizieren (HCV, HCV-mut, HCV-pers.). Als Kontrolle wurden naive Huh7-Zellen (naiv) und transient mit WNV-RNA transfizierte Zellen untersucht (WNV, WNV-mut). 24 h *p.t.* wurden die Plasmide FLAG-TIA1vl_pcDNA3 bzw. FLAG-TIA1vII_pcDNA3 in die Zellen transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit Actinomycin D behandelt und über einen Zeitraum von 3 h geerntet (Actinomycin D-Endpunkt-Assay). Die Degradation der VEGF-mRNA wurde mittels qRT-PCR bestimmt. GAPDH diente als Referenzgen für die Berechnung der relativen mRNA-Mengen über die ΔC_T -Methode. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten dar. Unterschiede zwischen den Probensätzen wurden mittels Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (***) $P < 0,0001$.

Dies ist ein Indiz dafür, dass von den beiden TIA1-Isoformen nur TIA1vl (FLAG-TIA1vl) in der Lage ist, die Degradation der VEGF-mRNA zu verlangsamen. Seine Expression allein führt jedoch nicht zur Veränderung der Halbwertszeit der VEGF-mRNA. Nur in Kombination mit einer effizienten Replikation von HCV-RNA scheint die kurze Isoform von TIA1 (FLAG-TIA1vl) die Halbwertszeit der VEGF-mRNA zu erhöhen. Im Fall einer persistenten Replikation der HCV-RNA scheint die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA durch zelluläre Adaptation reduziert vorzuliegen. Diese konnte jedoch durch die Expression von FLAG-TIA1vl rekonstituiert werden, wodurch die Halbwertszeit der VEGF-mRNA auf das ca. 2,3-Fache erhöht werden konnte.

3.8.4 Die Rekonstituierung der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie ist zeitabhängig

Die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA konnte durch die Expression von FLAG-TIA1vl in der persistenten HCV-Zelllinie rekonstituiert werden. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob dadurch die Halbwertszeit der VEGF-mRNA langfristig erhöht werden kann oder ob zellinterne Prozesse dieser rekonstituierten, posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA entgegenwirken. Dafür wurden die Zellen der persistenten HCV-Zelllinie sowie naive Huh7-Zellen mit den FLAG-TIA1vl und FLAG-TIA1vII kodierenden Plasmiden transfiziert (siehe 2.2.2.1). Über einen Zeitraum von 48 h wurden jeweils Actinomycin D-Endpunkt-Assays (siehe 2.2.2.4) zu den indizierten Zeiten durchgeführt. In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie erstmals 16 h nach der Transfektion des FLAG-TIA1vl_pcDNA3-Plasmids detektiert werden konnte. Die VEGF-mRNA wurde hier, nach 180 min Actinomycin D-Behandlung, auf ca. 46 % des Ausgangswertes degradiert. In Zellen ohne FLAG-TIA1vl-Expression bzw. 8 h nach der Plasmidtransfektion wurde die VEGF-mRNA hingegen auf ca. 26 % des Ausgangswertes reduziert. Die maximale posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA wurde ca. 24 h nach der Transfektion des FLAG-TIA1vl-Plasmids erreicht. Hier wurde die VEGF-mRNA auf lediglich 58 % des Ausgangswertes abgebaut. Bereits nach 36 h war jedoch ein leichter Rückgang der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA zu beobachten. Durch die Applikation von Actinomycin D wurde die VEGF-mRNA hier auf ca. 52 % der Ausgangsmenge degradiert. Nach weiteren 12 h (48 h *p.t.*) war die kurzzeitig rekonstituierte, posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA nicht mehr nachweisbar (Degradation auf ca. 32 % des Ausgangswertes). Eine subsequente Transfektion des FLAG-TIA1vl_pcDNA3 Plasmids, 24 h nach der ersten Transfektion, führte nicht zu einem verlängerten Zeitraum der posttranskriptionellen Stabilisierung (nicht dargestellt). Die Expression von FLAG-TIA1vII schien in den untersuchten Proben keinen Einfluss auf die Degradation der VEGF-mRNA zu haben. Wie erwartet zeigten sich

in Huh7-Zellen keine Veränderungen im Abbau der VEGF-mRNA, unabhängig davon, ob FLAG-TIA1vl oder FLAG-TIA1vll exprimiert wurden (Abb. 28). Die Stabilisierung der VEGF-mRNA war dabei nicht von der FLAG-TIA1vl-Proteinmenge abhängig, da 48 h nach der Transfektion des FLAG-TIA1vl kodierenden Plasmids in die Zellen der persistenten HCV-Zelllinie moderat mehr FLAG-TIA1vl detektiert werden konnte als nach 24 h (Nachweis mittels Immunoblot, nicht dargestellt).

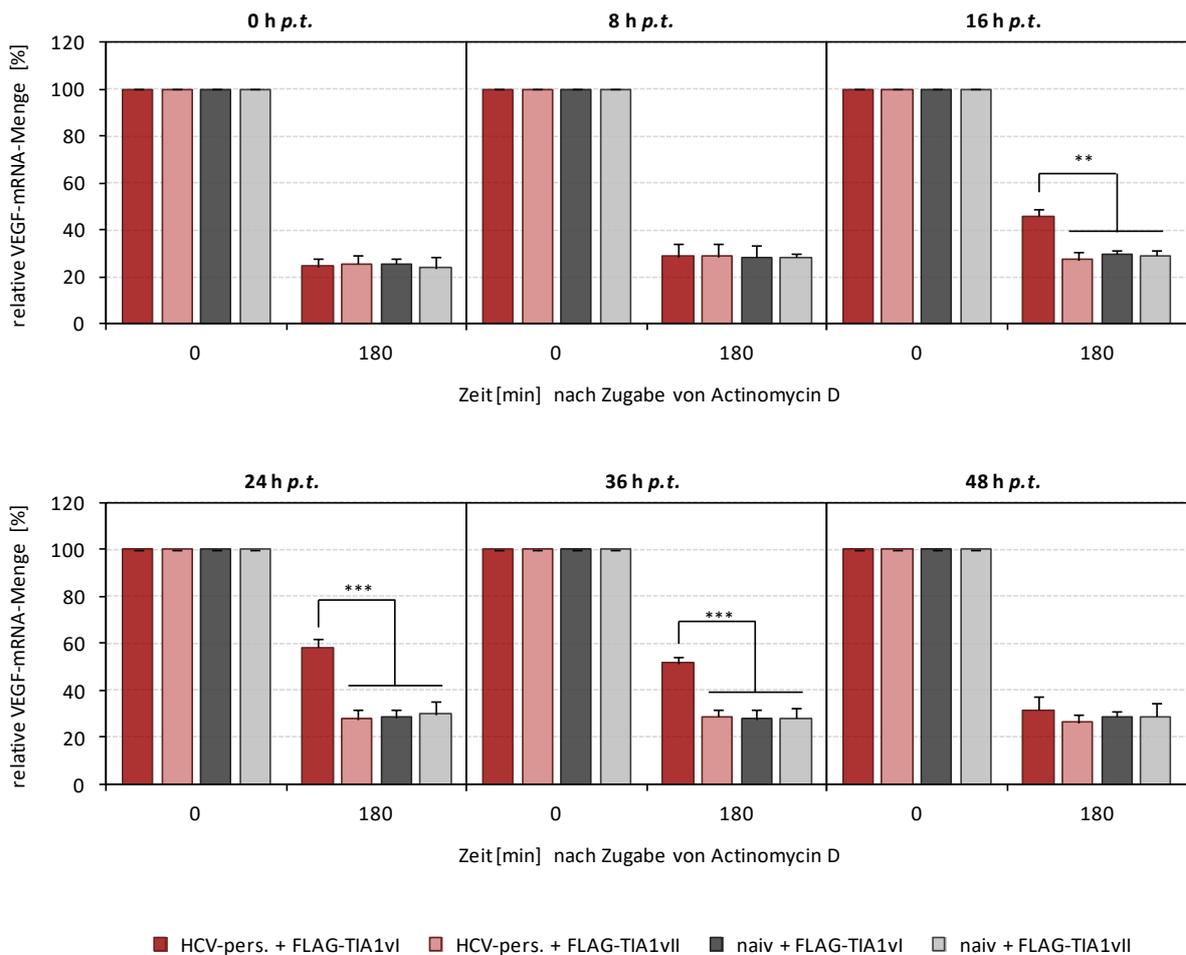


Abb. 28: Die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie ist zeitlich limitiert

In naiven Huh7-Zellen (naiv) und Zellen der persistenten HCV-Zelllinie (HCV-pers.) wurden die Plasmide FLAG-TIA1vl_pcDNA3 und FLAG-TIA1vll_pcDNA3 transfiziert. Durch ein Actinomycin D-Endpunkt-Assay und anschließender qRT-PCR wurde die Degradation der VEGF-mRNA in diesen Zellen nach 0 h, 8 h, 16 h, 24 h, 36 h sowie 48 h nach der Transfektion der Plasmide analysiert. Dafür wurde 1,6 μ M Actinomycin D zu den indizierten Zeiten appliziert und Proben zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Zugabe sowie 180 min danach entnommen. Die relative VEGF-mRNA-Menge wurde durch qRT-PCR ermittelt und über die ΔC_T -Methode berechnet. Die entsprechenden Ausgangswerte (0 min) wurden 100 % gleichgesetzt und die nachfolgenden Werte prozentual darauf bezogen. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten dar. Unterschiede zwischen den Probensätzen wurden mittels Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (***) P < 0,0001, (**) P < 0,001.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie durch die transiente Expression der kurzen Isoform von TIA1 (FLAG-TIA1vl) bis ca. 36 h *p.t.* wiederhergestellt werden konnte. Dies war unabhängig von der FLAG-TIA1vl-Proteinmenge. Bereits 48 h nach der Transfektion des FLAG-TIA1vl-kodierenden Plasmids war die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in diesen Zellen nicht mehr nachweisbar. Die Stabilisierung konnte demnach kurzfristig durch die Expression von FLAG-TIA1vl rekonstituiert werden, jedoch nur in Kombination mit der Replikation von HCV-RNA. Scheinbar unterliegt das endogene, zelluläre TIA1 und das transient exprimierte FLAG-TIA1vl in der persistenten HCV-Zelllinie einer Art der zellulären Adaptation oder Modifikation, wodurch seine Funktion bei der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA inhibiert wird (siehe Diskussion, 4.3). Zudem wiesen diese Zellen (HCV-pers.) keine SGs auf, auch nicht unter der Expression von FLAG-TIA1vl (siehe 3.8.2, Abb. 26). Dies untermauerte die Vermutung, dass die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA von der SG-Assemblierung unabhängig ist.

3.9 Überprüfung von TIA1 auf posttranslationale Modifikationen

Vorangegangene Experimente ließen vermuten, dass in der persistenten HCV-Zelllinie vermutlich die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-mRNA inhibiert wird (siehe 3.8). Jedoch konnte die posttranskriptionelle Stabilisierung in diesen Zellen durch transiente Expression von FLAG-TIA1vl temporär rekonstituiert werden (bis zu 36 h *p.t.*). Somit besitzt endogenes TIA1vl und transient exprimiertes FLAG-TIA1vl in der HCV-Zelllinie bis zu diesem Zeitpunkt divergierende Funktionen. Dies spricht für eine Art der zellulären Adaptation, die neben dem endogenen TIA1vl auch das transient exprimierte FLAG-TIA1vl (ab 36 h *p.t.*) in seiner stabilisierenden Funktion beschränkt. Posttranslationale Modifikationen stellen eine Möglichkeit der Adaptation dar, die für die Regulation der TIA1-Funktion essentiell sein könnten.

3.9.1 Massenspektrometrische Untersuchungen von TIA1

Die HCV-induzierte, posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA scheint mit TIA1vl assoziiert zu sein. Daher war es interessant zu untersuchen, ob das in diesen Zellen transient exprimierte FLAG-TIA1vl posttranslational modifiziert ist. Diese Modifikationen können zu funktionell verschiedene Formen (z.B. aktiv/inaktiv) eines Proteins führen (Kraut, 1977; Alberts *et al.*, 2002). Es wurde bereits beschrieben, dass TIA1 an den Serinen 209 und 210 phosphoryliert werden kann (Tao *et al.*, 2005). Daneben wurden auch Phosphorylierungen an Tyrosin 48 und 149 (Wu *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2010) sowie an Threonin 83 und 99 detektiert (Sharma *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2013). Daher sollte der Phosphorylierungsstatus von FLAG-TIA1vl durch Massenspektrometrie untersucht

werden. Massenspektrometrisch analysiert wurden rekombinant gereinigtes TIA1vl (siehe 2.8; gereinigt von Dr. Ralph Golbik und Aniseh Poshtgohian Madi, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland) sowie immunpräzipitiertes FLAG-TIA1vl (FLAG_TIA1vl_pcDNA3) aus Huh7-Zellen und der persistenten HCV-Zelllinie (24 h und 48 h *p.t.*). Die Proben wurden auf einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, die korrespondierenden Proteinbanden wurden ausgeschnitten und mit Trypsin behandelt. Mittels MALDI-TOF-TOF wurden die Peptidfragmente von Dr. Angelika Schierhorn untersucht (Institut für Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; siehe 2.6.6). Die Identität und korrekte Aminosäuresequenz der untersuchten Proteine konnte bestätigt werden, wobei die Peptidabdeckung nicht vollständig war (max. 60 %). Es wurden jedoch keine eindeutigen Befunde zu Phosphorylierungen an Serinen, Tyrosinen oder Threoninen festgestellt. Auch andere posttranslationale Modifikationen konnten nicht detektiert werden (nicht dargestellt). Da jedoch Literaturdaten vorliegen, die Phosphorylierungsstellen von TIA1 beschreiben, wird von technischen Gründen ausgegangen, die den Nachweis schwierig machten. Daher wurde im Weiteren auf *in vivo* und *in vitro* Experimente ausgewichen.

3.9.2 *in vitro* Phosphorylierung von TIA1vl

Für die *in vitro* Phosphorylierungsstudien wurde heterolog in *E. coli* exprimiertes und rekombinant gereinigtes TIA1vl verwendet (Dr. Ralph Golbik, Aniseh Poshtgohian Madi, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Deutschland; siehe 2.8; 2.9). Als Kinase wurde Proteinkinase R (PKR) verwendet, welche bereits in der Arbeitsgruppe als rekombinant gereinigtes Protein vorlag (Paul Knick, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland). PKR ist eine über dsRNA-aktivierte Kinase, die besonders bei viralen Infektionen eine entscheidende Rolle spielt (Gale *et al.*, 1997/1998a/b; Gale und Katze 1998). Im aktivierten Zustand kann sie andere Proteine phosphorylieren, wie z.B. Transkriptionsfaktoren oder eIF2 α (Williams, 1999). Somit steht PKR im Zentrum der zellulären Stressantwort, die durch Einflüsse wie Pathogene, ER-Stress, Nährstoffmangel oder Zytokine induziert werden kann. Um eine mögliche Phosphorylierung von TIA1vl zu untersuchen, wurde rekombinant gereinigtes TIA1vl mit aktivierter PKR und radioaktiv markiertem ATP versetzt. Als Positivkontrolle wurde ein bereits bekanntes Substrat der PKR, der eukaryotische Initiationsfaktor 2 α (eIF2 α), verwendet (rekombinant gereinigt von Dr. René Geißler, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland). Als Negativkontrolle wurde kommerziell erworbenes bovines Serumalbumin (BSA, NEB, Ipswich, USA) eingesetzt. Für die Untersuchungen wurden rekombinant gereinigte PKR mit rATP und poly I:C präinkubiert, um eine Autophosphorylierung der PKR durch doppelsträngige RNA (poly I:C) zu erreichen. Danach wurde weiteres, radioaktiv markiertes [γ -³²P]-ATP zugegeben sowie die entsprechenden Substrate (eIF2 α , BSA,

TIA1vl). Nach 1 h Inkubation wurde der Ansatz über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.6.8). Die Visualisierung erfolgte mittels Autoradiographie. Als Kontrolle wurde gereinigtes TIA1vl analysiert, welches mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert wurde (ohne PKR). In Abbildung 29 ist das Ergebnis der TIA1vl-Phosphorylierung exemplarisch dargestellt. Die Autophosphorylierung von PKR konnte in allen Proben nachgewiesen werden. Das Signal der autophosphorylierten PKR ist schwächer als das der Substrate, da seine Präinkubation mit nicht-radioaktiv markierten ATP erfolgte. Zudem konnte ein deutliches Signal für radioaktiv markiertes, phosphoryliertes TIA1vl detektiert werden, ebenso wie für eIF2 α (Positivkontrolle). BSA wurde hingegen nicht durch PKR phosphoryliert.

Daraus lässt sich schließen, dass auch im Zuge der HCV-Replikation *in vivo* eine PKR-vermittelte Phosphorylierung von TIA1vl denkbar wäre, wodurch TIA1vl in seiner Funktion reguliert werden könnte.

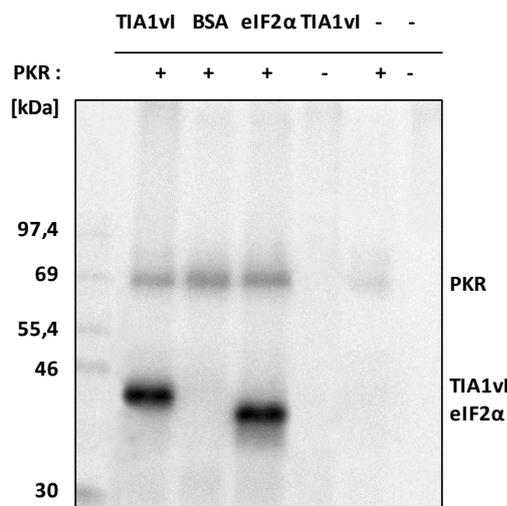


Abb. 29: *in vitro* Phosphorylierung von rekombinant gereinigtem TIA1vl

Die heterolog in *E. coli* exprimierte, kurze Isoform des TIA1-Proteins (TIA1vl) wurde rekombinant gereinigt (PD Dr. Ralph Golbik und Aniseh Poshtgohian Madi, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland) und einer Phosphorylierungsstudie unterzogen. Als Kinase wurde PKR (100 nM) verwendet (Paul Knick, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland), die durch Zugabe von poly I:C und ATP autophosphoryliert wurde. Als Substrat wurden 500 nM TIA1vl eingesetzt und mit radioaktiv markiertem [γ - 32 P]-ATP versetzt. eIF2 α wurde als Positivkontrolle, BSA als Negativkontrolle verwendet (je 500 nM). Die Proben wurden über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiografie ausgewertet. Protein-Marker: *Protein molecular weight marker* (Methyl- 14 C).

3.9.3 *in vivo* Phosphorylierung von TIA1

Da die posttranslationale Phosphorylierung von TIA1vl durch PKR *in vitro* möglich war (siehe 3.9.2), sollte untersucht werden, inwieweit TIA1 auch *in vivo* in einem phosphorylierten Zustand vorliegt. Die mögliche *in vivo* Phosphorylierung von TIA1 wurde in naiven Huh7-Zellen sowie transient und persistent mit dem HCV-Replikon transfizierten

Zellen analysiert. Dabei wurden alle intrazellulär phosphorylierten Proteine durch radioaktiv markiertes Orthophosphat markiert. Dafür wurden die entsprechenden Zellen 48 h *p.t.* mit Orthophosphat³²P (H₃³²PO₄) versetzt und für 4 h bei 37 °C inkubiert (siehe 2.10), wodurch in allen posttranslational phosphorylierten Proteinen die radioaktiv-markierte Phosphatgruppe eingebaut wird. Im Anschluss wurde endogenes TIA1 mittels eines spezifischen Antikörpers aus den Zellen immunpräzipitiert (IP, siehe 2.6.4). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.6.8) und autoradiographisch untersucht. Zunächst wurde die Effizienz der Immunpräzipitation von TIA1 mittels Immunoblot überprüft (siehe 2.6.9). Dafür wurden transient mit den HCV-Replikons transfizierte Zellen verwendet, die nicht mit Orthophosphat³²P behandelt wurden. In diesen Proben konnte im Überstand der Immunpräzipitation kein TIA1-Protein detektiert werden. TIA1 war ausschließlich in den Präzipitaten nachzuweisen. Daher ist davon auszugehen, dass TIA1 nahezu komplett immunpräzipitiert wurde (Abb. 30, B). Anschließend wurden die Analysen zur *in vivo* Phosphorylierung durchgeführt. Abbildung 30 zeigt, dass beide TIA1-Isoformen in den untersuchten Ansätzen durch Einbau der radioaktiv markierten Phosphatgruppe markiert wurden. Sowohl in Zellen, die mit dem HCV- bzw. HCV-mut-Replikon transfiziert wurden (Abb. 30, A) als auch in naiven Huh7-Zellen und Zellen der persistenten HCV-Zelllinie (Abb. 30, C) lagen TIA1vI und TIA1vII phosphoryliert vor. Dabei konnten keine Unterschiede in der Signalstärke der einzelnen Proben dokumentiert werden. Auch in den Zellen, die keine HCV-RNA replizierten (naiv, HCV-mut), wurde ein deutliches Signal für phosphoryliertes TIA1 detektiert. Da in den Zellen die Proteinmenge von TIA1vI geringer ist, als die von TIA1vII, war vermutlich hier das detektierte Signal für die radioaktiv markierten Phosphatgruppen schwächer. Insgesamt zeigten die *in vivo* Analysen, dass beide Isoformen von TIA1 phosphoryliert vorliegen. Zwischen persistenter HCV-Zelllinie, naiven Huh7-Zellen sowie transient mit den HCV-Replikons transfizierten Zellen konnten keine Unterschiede für die Stärke des Phosphorylierungssignals der beiden TIA1-Isoformen festgestellt werden.

Dies deutete eher darauf hin, dass die Phosphorylierung von TIA1 unabhängig von der Replikation der HCV-RNA ist und sich nicht auf die Funktion innerhalb der Stabilisierung der VEGF-mRNA auswirkt. Allerdings konnten keine Aussagen darüber getroffen werden, welche oder wie viele Aminosäuren in den jeweiligen Proben phosphoryliert wurden. Der 11 Aminosäuren umfassende Sequenzabschnitt, der die beiden TIA1-Isoformen unterscheidet, beinhaltet 4 Serine und 2 Threonine, die theoretisch phosphoryliert werden könnten. Auch das bereits in Jurkat-Zellen als Phosphorylierungsstelle beschriebene Threonin in Position 99 liegt innerhalb dieses Sequenzbereichs (PhosphoSitePlus®: CST Curation Set: 12060, 2011). Es ist daher nicht auszuschließen, dass in den beiden TIA1-Isoformen unterschiedliche Phosphorylierungsmuster auftreten, die zu abweichenden Funktionen von TIA1vI und TIA1vII führen. Die Anzahl, Position oder physiologische Relevanz der phosphorylierten Aminosäuren sind bisher nicht geklärt.

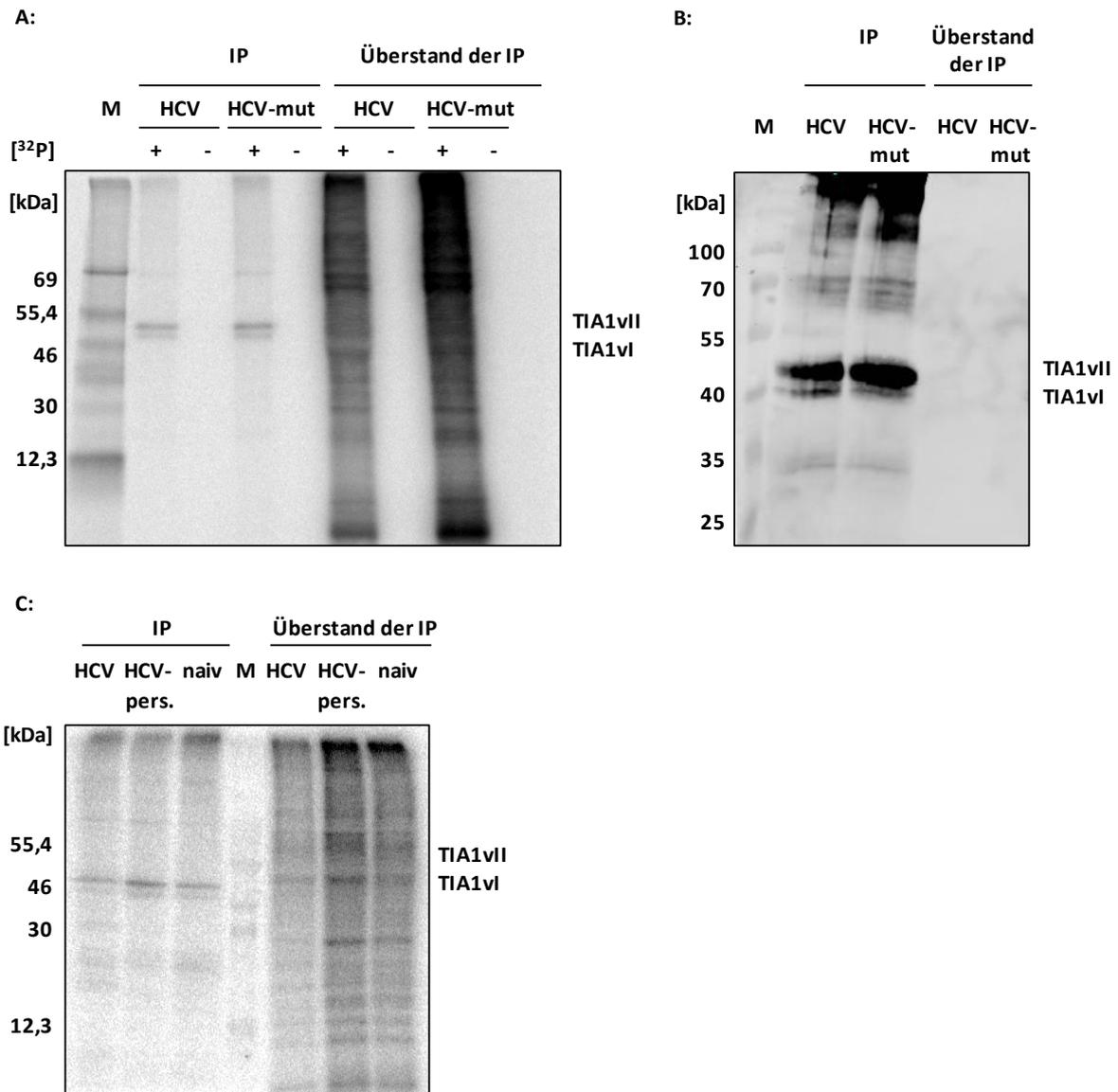


Abb. 30: *in vivo* Phosphorylierung von TIA1

Die mögliche *in vivo* Phosphorylierung des zellulären TIA1-Proteins wurde 48 h *p.t.* in transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen bzw. in der persistenten HCV-Zelllinie überprüft. Dafür wurden 0,25 mCi Orthophosphat³²P (H₃³²PO₄) je 10⁶ Zellen in das umgebende Zellmedium appliziert und die Zellen für 4 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen einer Immunpräzipitation gegen TIA1 unterzogen. Als Kontrollen wurden Proben ohne Orthophosphat³²P und der Überstand der Immunpräzipitation genommen. Die radioaktiv markierten Proben und Kontrollproben wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiografie (A, C) oder Immunoblot (B) analysiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mittels spezifischer, primärer Antikörper und sekundärer fluoreszenzgekoppelter Antikörper über einen Nahinfrarot-*scan*. Protein-Marker: *Protein molecular weight marker* (Methyl-¹⁴C; A, C), *Page Ruler™ prestained ladder* (B).

3.10 Protein-Bindepartner von TIA1vI

Vorangegangene Experimente zeigten, dass in der persistenten HCV-Zelllinie die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA durch transiente Expression von FLAG-TIA1vI temporär (16-36 h *p.t.*) rekonstituiert werden konnte (siehe 3.8.4). Dabei schien die Replikation von HCV-RNA ein essentieller Faktor zu sein. Dies legte die

Vermutung nahe, dass in der persistenten HCV-Zelllinie eine zelluläre Adaptation vorliegen könnte, welche die HCV-induzierte, posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA beeinträchtigt. Diese zelluläre Adaptation scheint sich mit zunehmender Zeit auch auf das transient exprimierte FLAG-TIA1vl auszuwirken. Ein Teil unterläge somit keiner Modifikation und könnte die HCV-assoziierte Stabilisierung der VEGF-mRNA induzieren, der andere Teil wäre an dieser Funktion gehindert. Neben der Hypothese, dass es sich um eine posttranslationale Modifikation des TIA1-Proteins handeln könnte, gab es noch die Variante, dass TIA1vl über ein assoziiertes Protein reguliert wird. Hierzu sollten in dieser Arbeit erste Studien durchgeführt werden. Um den Wirkmechanismus von TIA1vl besser zu verstehen, sollten in diesem Kontext putative Bindepartner von TIA1vl durch Ko-Immünpräzipitation und Massenspektrometrie identifiziert werden.

3.10.1 Identifikation TIA1vl-assoziiierter Proteine über Massenspektrometrie

Da bisher keine posttranslationale Modifikation von TIA1vl eindeutig identifiziert werden konnte (siehe 3.9.2), könnte die Funktion von TIA1vl auch über die Bindung von Proteinen verändert werden. Im Folgenden sollte daher mittels Massenspektrometrie untersucht werden, welche zellulären Proteine an das transient exprimierte FLAG-TIA1vl assoziiert sind. Durch die Expression des FLAG-tags konnten FLAG-TIA1vl und daran assoziierte Proteine spezifisch ko-präzipitiert werden (siehe 2.6.4). Um putative Bindepartner zu differenzieren, die speziell unter dem Einfluss der HCV-RNA-Replikation an TIA1vl binden, wurden parallel zu den Zellen der persistenten HCV-Zelllinie auch Huh7-Zellen untersucht. Dafür wurde das FLAG-TIA1vl kodierende Plasmid (FLAG-TIA1vl_pcDNA3) in naive Huh7-Zellen und Zellen der persistenten HCV-Zelllinie transfiziert (siehe 2.2.2.1). Nach 24 h wurde aus den Zellen Gesamtzellextrakt gewonnen und einer FLAG-spezifischen Ko-Immünpräzipitation (Ko-IP) von FLAG-TIA1vl und den daran assoziierten Proteinen unterzogen (siehe 2.6.4). Als Negativkontrolle (NK) wurde analog der pcDNA3-Vektor in naive Huh7-Zellen transfiziert. Die Ko-IP erfolgte jeweils mit und ohne RNase A-Behandlung, um zwischen RNA-abhängigen und unabhängigen Bindungen unterscheiden zu können. Die Proben aus jeweils 3 Ansätzen wurden zusammengeführt (siehe 2.6.2). Zunächst wurde 1/20 der Ko-IP-Proben in mittels SDS-PAGE (siehe 2.6.8) aufgetrennt und die Funktionalität und Spezifität der FLAG-IP mittels Immunoblot überprüft (Abb. 31, B; siehe 2.6.9). Zusätzlich wurde 1/10 der Proben durch eine SDS-PAGE aufgetrennt, deren Gel einer Silberfärbung unterzogen wurde. Dadurch sollte die Anzahl putativer Bindepartner abgeschätzt werden. Im Immunoblot (Abb. 31, B) sowie in der Silberfärbung (Abb. 31, A) konnte die Präzipitation von FLAG-TIA1vl deutlich nachgewiesen werden. In der Silberfärbung wurden divergierende Proteine markiert, die putative Bindepartner von FLAG-TIA1vl darstellen. Ein Großteil dieser Proteine wies ein Molekulargewicht über 40 kDa auf. Die Muster der Proteinbanden in den Proben der persistenten HCV-Zelllinie

und den Huh7-Zellen (Vergleichskontrolle) ließen Ähnlichkeiten erkennen. Im Vergleich zu den Proben ohne RNase A-Behandlung, wurde in den Proben mit RNase A-Behandlung eine moderat erhöhte Anzahl von Proteinen ko-präzipitiert (Abb. 31, A). Die Proben wurden daraufhin massenspektrometrisch analysiert. Die Identifizierung der ko-präzipitieren Proteine wurde durch MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie von Dr. Thomas Ruppert (Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg, *Core Facility for Mass Spectrometry and Proteomics*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Heidelberg) durchgeführt (siehe 2.6.6). Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm *scaffold 4* ausgewertet. Die Identität der Proteine wurde als valide betrachtet, wenn eine Proteinidentität von mindestens 99 % nachgewiesen wurde und von ihnen mindestens 2 einzigartige Peptide detektiert wurden, die wiederum eine Identität von 95 % aufwiesen. Daraus ergab sich eine Liste von 98 Proteinen, die mit FLAG-TIA1vl assoziiert sein könnten (siehe Anhang 7.2, Tab. 8). Durch den Vergleich der Datensätze (HCV-pers. und naiv) konnten die Proteine differenziert werden, welche vermutlich nur während der Replikation von HCV-RNA mit FLAG-TIA1vl assoziierten.

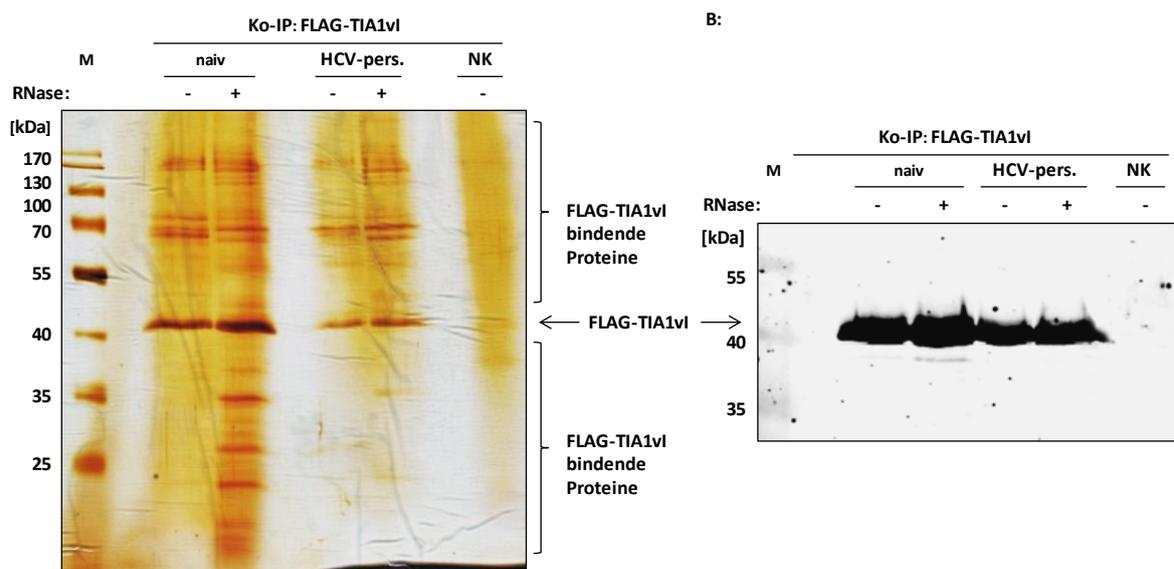


Abb. 31: Ko-Immunpräzipitation von FLAG-TIA1vl sowie divergierender und mit TIA1vl-assoziierter Proteine

A: FLAG-TIA1vl wurde in naiven Huh7-Zellen und der persistenten HCV-Zelllinie über Transfektion des Plasmids FLAG-TIA1vl_pcDNA3 exprimiert. Als Negativkontrolle (NK) wurden Huh7-Zellen mit dem pcDNA3-Vektor ohne FLAG-TIA1vl-kodierenden Bereich transfiziert. FLAG-TIA1vl wurde 24 h später mit einem Anti-FLAG Antikörper immunpräzipitiert. Dies erfolgte bei niedrigen Salzkonzentrationen (150 mM NaCl) aus Gesamtzellextrakt, wobei die Proben geteilt wurden. Ein Teil wurde mit RNase A behandelt. FLAG-TIA1vl und daran assoziierte Proteine wurden mit 3 x FLAG-Peptid eluiert. Eluate von jeweils 3 FLAG-IPs wurden fusioniert, mit Trichloressigsäure präzipitiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. 1/10 Volumen der Proben wurde auf einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend einer Silberfärbung unterzogen. Die Molekulargewichte des Markers sind indiziert. **B:** Parallel dazu wurde 1/20 Volumen je Probe in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. FLAG-TIA1vl wurde durch einen spezifischen Antikörper gegen TIA1 im Immunoblot nachgewiesen. Der fluoreszenzgekoppelte sekundäre Antikörper wurde über einen Nahinfrarot-scan bei 700 nm detektiert. Protein-Marker: *Page Ruler™ prestained ladder*.

Für die weiteren Analysen wurden die Proteine ausgewählt, welche mit den meisten Peptiden nachgewiesen werden konnten und möglichst nur in den Proben der persistenten HCV-Zelllinie detektiert wurden. Proteine, die sich ebenfalls oder ausschließlich in der Vergleichskontrolle (Huh7) detektieren ließen, wurden ausgewählt, wenn sie aufgrund ihrer bereits bekannten Funktionen mit der Replikation von HCV-RNA oder TIA1-Modulation assoziiert sein könnten. Daraus ergab sich eine Liste von 20 Proteinen (siehe Anhang 7.2, Tab. 9).

3.10.2 Überprüfung von TIA1vl-assoziierten Proteinen auf eine Beteiligung an der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA

Da durch die plasmidvermittelte Expression von FLAG-TIA1vl die Stabilisierung der VEGF-mRNA, in den Zellen der persistenten HCV-Zelllinie, temporär rekonstituiert werden konnte, wurden mittels Ko-Immünpräzipitation und Massenspektrometrie Proteine identifiziert, die in der HCV-Zelllinie und Huh7-Zellen mit FLAG-TIA1vl assoziiert sind (siehe Anhang 7.3, Tab. 8). Von diesen Proteinen wurden 20 ausgewählt (siehe Anhang 7.3, Tab. 9), die aufgrund von Literaturhinweisen mit HCV oder TIA1 assoziiert sein könnten oder primär innerhalb der HCV-Zelllinie detektiert wurden. Um herauszufinden, ob die Proteine für die erhöhte Halbwertszeit der VEGF-mRNA wichtig sind, wurden diese in transient oder persistent mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen depletiert und ein Actinomycin D-Endpunkt-Assay durchgeführt (siehe 2.2.2.2.3, 2.2.2.4). Als Kontrollen wurden naive Huh7-Zellen sowie Zellen, die mit dem HCV-mut-Replikon transfiziert wurden untersucht. Die Reduktion der Proteinmengen wurde über siRNA-vermittelten Abbau der entsprechenden mRNAs erzielt. Führt eine solche Depletion zu einer verminderten Degradation der VEGF-mRNA in transient transfizierten Zellen (HCV), so weist dies auf eine Beteiligung des Proteins an der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA hin. Wird in den Zellen der persistenten HCV-Zelllinie die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA durch die siRNA-vermittelte Depletion eines Proteins rekonstituiert, deutet dies auf die Beteiligung des Proteins an einer Adaptation der Zelle hin. Für die Untersuchungen wurden die siRNAs separat (HCV-pers., naïv) oder simultan mit dem HCV-Replikons in naive Huh7-Zellen transfiziert. Als Vergleichskontrolle wurde eine siRNA gegen GFP verwendet. Nach 48 h wurden die Zellen für 180 min mit Actinomycin D versetzt, um die DNA-abhängige RNA-Synthese zu inhibieren (siehe 2.2.2.4). Die Auswertung des Actinomycin D-Endpunkt-Assays erfolgte mittels qRT-PCR (siehe 2.4.2). Analog dazu wurde überprüft, ob sich die Depletion der Proteine auf die Replikation der viralen HCV-RNA auswirkt. Dafür wurde die HCV-RNA-Menge zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Applikation bestimmt. Es zeigte sich, dass diese durch die Depletion der einzelnen Proteine nicht beeinflusst wurde (nicht dargestellt). Weiterhin wurde die Effizienz der siRNA-vermittelten Depletionen mittels qRT-PCR

bestimmt, da keine spezifischen Antikörper gegen die jeweiligen Proteine zur Verfügung standen, um die Reduktion der Proteinmengen direkt zu überprüfen. Eine Degradation der Ziel-mRNA wurde als Indiz für eine erfolgreiche Depletion des Proteins betrachtet. Durch alle eingesetzten siRNAs wurde die Quantität der Ziel-mRNAs auf mindestens die Hälfte reduziert, verglichen mit der Kontrolle (siGFP) (nicht dargestellt). Es wurden 20 Proteine getestet (siehe Anhang 7.2, Tab. 9), wobei TIA1 als Positivkontrolle genutzt wurde. Bei der Depletion von 7 dieser Proteine verkürzte sich die Halbwertszeit der VEGF-mRNA in transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen (Abb. 32). Die siRNA-vermittelte Depletion folgender Proteine beschleunigte den Abbau der VEGF-mRNA in diesen Zellen: *janus kinase 1* (JAK1), *protein S100 calcium-binding protein A9* (S10A9), *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M* (hnRNPM), *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K* (hnRNPK), *serine-/threonine-protein kinase 38* (STK38) sowie *splicing factor proline- and glutamine-rich* (SFPQ) und *insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1* (IGF2BP1). Nach 180 min Actinomycin D-Behandlung lag die relative Transkriptmenge der VEGF-mRNA, in transient HCV-RNA replizierenden Zellen, bei ca. 30 % vom Ausgangswert. In den Kontrollzellen (HCV siGFP) lag die relative Transkriptmenge der VEGF-mRNA hingegen bei ca. 60 % des Ausgangswertes. Interessanterweise rekonstituierte die Depletion des *double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1* (STAU1) die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie. In den transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen hatte die Depletion von STAU1 hingegen keine Auswirkung auf den zeitlichen Verlauf des Abbaus der VEGF-mRNA. Dies indiziert, dass STAU1 in die zelluläre Adaptation der HCV-Zelllinie involviert ist, welche die durch die HCV-RNA-Replikation induzierte Stabilisierung der VEGF-mRNA inhibiert. Alle anderen getesteten siRNAs hatten keinen Einfluss auf die Degradation der VEGF-mRNA (nicht dargestellt). Die in Abbildung 32 indizierten siRNAs wurden zusätzlich für analoge Kontrollexperimente in naiven Huh7-Zellen und transient mit dem HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen verwendet. Die Degradation der VEGF-mRNA wurde in diesen Zellen durch die Applikation der entsprechenden siRNAs nicht beeinflusst (nicht dargestellt).

Demnach wurden 8 Proteine identifiziert, die neben TIA1vl ebenfalls einen Einfluss auf die HCV-assoziierte, posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA haben und mit FLAG-TIA1vl ko-präzipitiert werden konnten. In transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen inhibierte die siRNA-vermittelte Depletion von JAK1, S10A9, hnRNPM, hnRNPK, STK38, SFPQ und IGF2BP1 die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA. Hingegen rekonstituierte die Depletion von STAU1 die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie. Daher regulieren diese mit FLAG-TIA1vl assoziierten Proteine möglicherweise direkt die Funktion von TIA1vl oder nehmen über andere Regulations- bzw. Adaptationsmechanismen Einfluss auf die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA (siehe Diskussion, 4.3).

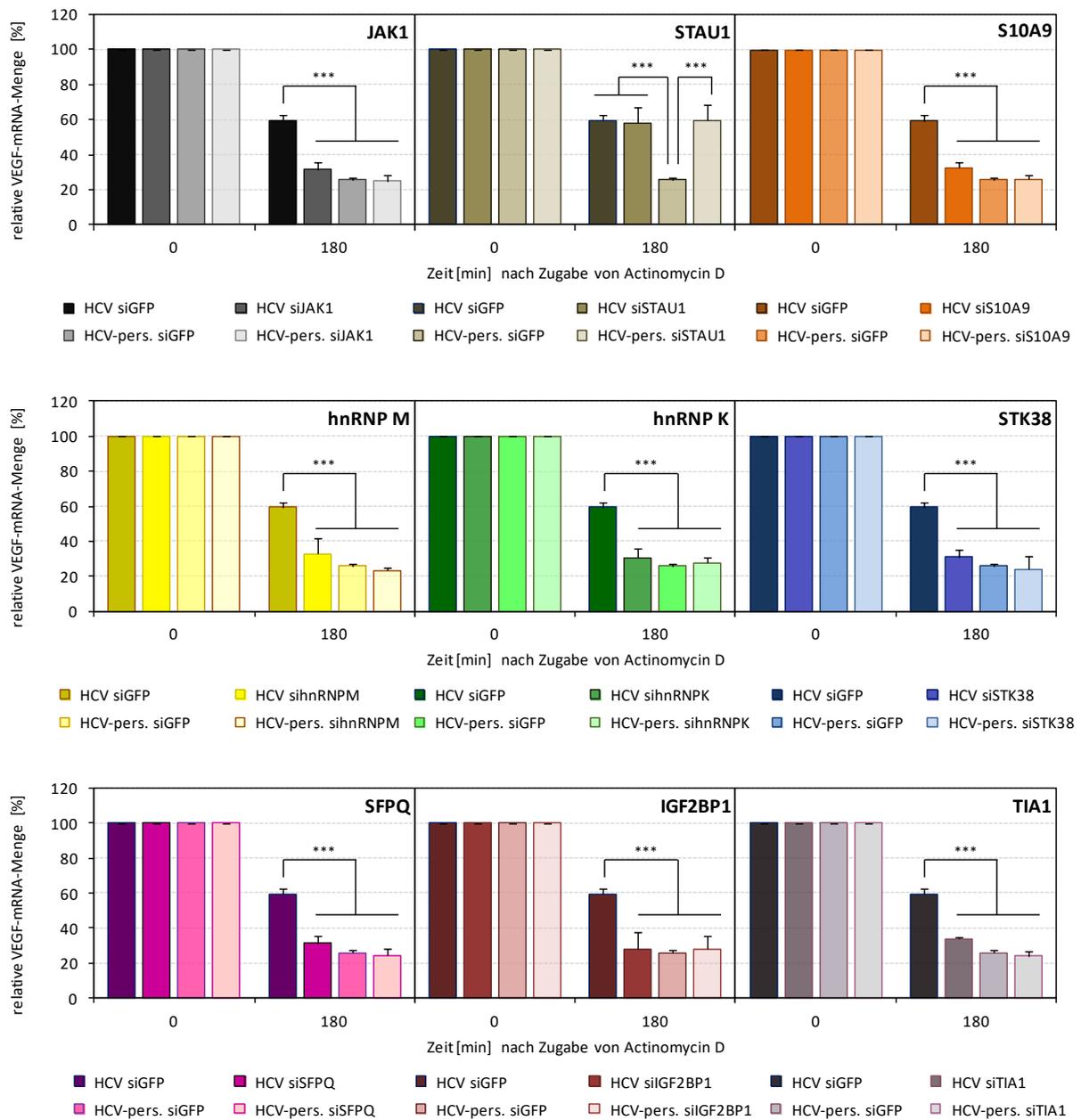


Abb. 32: Degradation der VEGF-mRNA in HCV-RNA replizierenden Huh7-Zellen unter dem Einfluss der Depletion TIA1vl-assoziierter Proteine

Die Depletion der FLAG-TIA1vl-assozierten Proteine erfolgte mittels spezifischer siRNAs gegen die mRNAs dieser Proteine. Depletiert wurden JAK1, STAU1, S10A9, hnRNP M, hnRNP K, STK38, SFPQ, IGF2BP1 und TIA1. Als Negativkontrolle wurde eine siRNA gegen GFP verwendet. Die Degradation der VEGF-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie und in transient mit HCV-Replikon transfizierten Zellen wurde mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay untersucht. Die Transfektion der siRNA und des HCV-Replikons erfolgte dabei simultan. 48 h *p.t.* wurde die DNA-abhängige RNA-Synthese durch Applikation von Actinomycin D (1,6 μ M) ins Zellkulturmedium inhibiert. Die Probennahme erfolgte zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Zugabe sowie 180 min danach. Die relative VEGF-mRNA-Menge wurde durch qRT-PCR ermittelt und über die ΔC_T -Methode berechnet. Die entsprechenden Ausgangswerte (0 min) wurden 100 % gleichgesetzt und die nachfolgenden Werte prozentual darauf bezogen. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte der jeweiligen residualen VEGF-mRNA-Menge. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten dar. Unterschiede zwischen den Probensätzen wurden mittels Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (***) $P < 0,0001$.

4 Diskussion

Das Hepatitis-C-Virus besitzt mit 150 Millionen chronisch infizierten Menschen weltweit eine große medizinische Relevanz. Insbesondere sind die genauen Mechanismen der HCV-abhängigen Entstehung von hepatozellulären Karzinomen (HCC) bisher noch nicht eindeutig geklärt und die therapeutischen Ansätze, um HCV-Erkrankungen zu bekämpfen sind limitiert. Da die Entstehung von HCC mit hepatischer Angiogenese einhergeht, war die Untersuchung des Einflusses der HCV-Replikation auf die transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF besonders interessant. Vorgegangene Studien beschrieben bereits, dass eine HCV-Infektion, die Expression von VEGF beeinflussen kann (Abe *et. al.*, 2012; Nasimuzzaman *et al.*, 2007; Ripoli *et al.*, 2010). Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Huh7-Zellen mit replizierender HCV-RNA eine verstärkte Expression von VEGF aufwiesen. Dies korrelierte mit einer erhöhten VEGF-Transkriptmenge und einem verlangsamten posttranskriptionellen Abbau der VEGF-mRNA in transient transfizierten Zellen. Dadurch wurde die Halbwertszeit der VEGF-mRNA erhöht, sie wurde posttranskriptionell stabilisiert. Außerdem konnte mittels siRNA-vermittelter Depletion erstmals die kurze Isoform des *T-cell-restricted intracellular antigen-1* (TIA1v) als neuer Faktor ermittelt werden, welcher an der HCV-abhängigen Regulation der VEGF-mRNA-Halbwertszeit beteiligt ist. Im Kontext der HCV-Replikation soll im Folgenden die Regulation der zellulären Genexpression von VEGF beschrieben werden, gefolgt von einer Diskussion zur Rolle von TIA1v als möglicher Faktor in der posttranskriptionellen Genregulation.

4.1 Die mit der HCV-Replikation assoziierte Regulation der Genexpression von VEGF

Das Hepatitis-C-Virus moduliert mittels seiner viralen Proteine und zelleigener Wirtsfaktoren zelluläre Mechanismen, um effizient replizieren zu können. Dabei werden besonders zelluläre Abwehrmechanismen inhibiert. Auf der anderen Seite werden Prozesse initiiert, welche die Persistenz des Virus erlauben und zur Entstehung von pathogenen Gewebsveränderungen beitragen (Vidalain und Tangy, 2010; Nagy und Pogany, 2012). Genomübergreifende Untersuchungen führten zur Identifizierung hunderter putativer Gene, welche die Vermehrung des HCV beeinflussen. Darunter fällt das RNA-Bindeproteine (RBP) *nuclear factor 90* (NF90) (Randall *et al.*, 2007; Tai *et al.*, 2009), welches als essentieller Faktor bei Zyklisierung der HCV-Genoms während der Replikation beschrieben ist (Isken *et al.*, 2007). Es gilt unter anderem als Regulator der posttranskriptionellen Stabilisierung der kurzlebigen mRNA des *vascular endothelial growth factor A* (VEGF) in hypoxischen Brustkrebszellen, sowie der *mitogen-activated protein-kinase phosphatase 1* (MKP1) unter oxidativen Stress (Vumbaca *et al.*, 2008; Kuwano *et al.*, 2008; Claffey *et al.*, 1998). Daher wurde untersucht, ob sich die Replikation

der HCV-RNA in Huh7-Zellen auch auf die Expression von NF90, VEGF und MKP1 auswirkte (siehe 3.1.2). Die Analysen wurden unter dem Einfluss stress-induzierender Agenzien (Arsenatreagenz) und der Präsenz replizierender, viraler RNAs von HCV und WNV (Kontrolle) mittels qRT-PCR, Western-Blot und ELISA durchgeführt. Auch wenn NF90 als Wirtsfaktor und Regulator von VEGF und MKP1 gilt, wurde seine Expression weder durch die Replikation der HCV-RNA, noch durch Arsenat-induzierten Stress verändert. Die Transkriptmenge von MKP1 war in allen experimentell untersuchten Fällen erhöht (HCV-, WNV-Replikation; Arsenatstress; siehe 3.1.2). Dies bestätigte die Erwartungen, da MKP1 als Antagonist der *mitogen-activated-protein-kinases* (MAPKs) agiert und so durch eine Vielzahl von Stimuli wie z.B. oxidativen Stress, inflammatorische Prozesse, Sauerstoffmangel und Hitzeshock induziert wird (Li *et al.*, 2001; Keyse und Emslie, 1992; Kassel *et al.*, 2001; Rastogi *et al.*, 2013). Eine virus-spezifische Induktion konnte daher nicht von einer Stress-assoziierten Induktion der Transkription differenziert werden, da die Replikation von HCV-RNA zur Aktivierung der ER-Stress-Signalkaskade und oxidativem Stress führt (Tardif *et al.*, 2005; Waris *et al.*, 2005). Daher wurde auf eine primär stress-assoziierte Erhöhung der MKP1-mRNA-Menge geschlossen. Anders verhielt es sich bei der Expression von VEGF. Diese wurde nur in HCV-RNA replizierenden Zellen verstärkt stimuliert (HCV, HCV-pers.). Nicht jedoch in Zellen, die mit WNV-RNA transfiziert oder mit Arsenatreagenz behandelt wurden (siehe 3.1.2; 3.1.3). Bei VEGF handelt es sich um ein endothelspezifisches, glykosyliertes Signalprotein der Neovaskularisierung. Es steigert die Permeabilität sowie Proliferation des Endothels und wirkt als Zytokin antiapoptotisch (Neufeld *et al.*, 1994; Leung *et al.*, 1989). Es ist zudem essentiell für die Vaskulogenese, der Entwicklung des Blutgefäßsystems in der Embryonalentwicklung. Daher ist der Verlust eines Allels von VEGF in frühen Entwicklungsstadien letal (Ferrara, 1996; Zachary, 2001). Durch seine angiogene Wirkung spielt VEGF eine besondere Rolle bei der Wundheilung und der Entwicklung von Tumoren. Für die Tumorentwicklung besteht ein gesteigerter Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen, wobei deren Diffusion nur bis zu einer Tumorgroße von 1-3 mm³ gewährleistet wird (Folkman, 1990). Somit muss der wachsende Tumor durch VEGF-vermittelte Angiogenese mit dem Gefäßsystem verbunden werden, um seine Versorgung zu sichern (Ferrara, 1996; Hanahan und Folkman, 1996). Die verstärkte Expression und Sezernierung von VEGF wird daher vor allem unter hypoxischen Bedingungen ausgelöst. Da es auch bei persistenten HCV-Infektionen zur Entstehung von hepatozellulären Karinomen kommen kann, wurde sich im Weiteren auf die Untersuchung der *VEGF*-Genexpression konzentriert.

Neben der verstärkten Transkription von *VEGF* in Zellen, die HCV-RNA replizieren, konnte auch im Maus-*Xenograft*-Modell eine verstärkte Vaskularisierung in den Tumoren detektiert werden (siehe 3.1.4). Dies war stärker ausgeprägt in Zellen, die aus HCV-RNA replizierenden Huh7-Zellen entstanden waren und korrelierte mit der Reduktion nekrotischen Gewebes und der erhöhten Expression des *hypoxia-inducible factor 1 α*

(HIF1 α). Um seine Wirkung zu entfalten und verschiedene Signalkaskaden anzuregen, wird VEGF von Tumorzellen sekretiert (Ferrara, 1999) und über VEGF-Rezeptoren an Nachbarzellen detektiert. Es existieren verschiedenen Isoformen von VEGF (VEGF₁₁₁, ₁₂₁, ₁₄₅, ₁₄₈, ₁₆₅, ₁₈₃, ₁₈₉, ₂₀₆). Diese werden über alternatives Spleißen der 8 Exons umfassenden VEGF-prä-mRNA gewonnen und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Sekretierbarkeit, Heparinaffinität sowie ihrer Quantität innerhalb der Zelle (Robinson und Stringer, 2001). Die Isoformen VEGF₁₆₅ und VEGF₁₂₁ sind hinsichtlich der Transkriptmengen am stärksten vertreten (Houck *et al.*, 1991; Ancelin *et al.*, 2002; Ferrara und Davis-Smyth, 1997), was auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (siehe 3.2.2). Die HCV-assoziierte Erhöhung der VEGF-Expression spiegelte sich in einer verstärkten Transkription (ca. 4-6-fach) sowie einer gesteigerter Sekretion von VEGF ins umgebende Medium wieder (ca. 2-fach bei HCV, 7-fach bei HCV-pers.). Zudem konnte erstmals eine HCV-induzierte, posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in Huh7-Zellen festgestellt werden (siehe 3.2.1). Die erhöhte Quantität an VEGF kann dabei auf die Induktion der VEGF-Transkription sowie die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA zurückzuführen sein oder auf eine Kombination beider Effekte. Die Degradation der VEGF-mRNA erfolgte kontinuierlich über einen Zeitraum von 180 min nach der Applikation von Actinomycin D. Über diesen Zeitpunkt hinaus konnte kein signifikanter Abbau der residualen mRNA-Menge nachgewiesen werden (siehe 3.2.3). Dies spricht dafür, dass über den längeren Messzeitraum nicht die komplette Menge an VEGF-mRNA der Degradation zugänglich ist. In transient mit HCV-RNA transfizierten Zellen erhöhte sich die Halbwertszeit der VEGF-mRNA von ca. 100 min ($T_{1/2}$ naïv = 97 ± 6 min bzw. $T_{1/2}$ HCV-mut = 102 ± 4 min) auf 227 min ($T_{1/2}$ HCV = 227 ± 6 min) im Vergleich zu Zellen ohne HCV-RNA-Replikation. Diese Verdopplung der Halbwertszeit wirkte sich auf alle getesteten Isoformen der VEGF-mRNA gleichermaßen aus (siehe 3.2.2). Demnach verringert der Einfluss der HCV-Replikation die Menge an residualer VEGF-mRNA, welche der Degradation zugänglich ist (siehe 3.2.1). Hingegen wiesen transient mit den WNV-Replikons transfizierte Zellen oder mit Arsenatreagenz behandelte Zellen weder eine erhöhte Transkriptmenge noch eine veränderte Halbwertszeit der VEGF-mRNA auf (siehe 3.1.2 und 3.2.1). Die Zellen der persistenten HCV-Zelllinie wiesen zwar eine erhöhte VEGF-Transkriptmenge auf (ca. 4-fach), jedoch keine veränderte Halbwertszeit der VEGF-mRNA. Vermutlich lag in diesen Zellen eine Art der Adaptation vor, welche die Transkriptionsinduktion erlaubt, die posttranskriptionelle Stabilisierung hingegen verhindert. Diese Adaptation lag dabei vermutlich auf zellulärer und nicht auf viraler Seite, da Genomanalysen des HCV-Replikons aus der persistenten HCV-Zelllinie keine Sequenzveränderungen aufzeigten (nicht dargestellt). Zudem konnte die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in der HCV-Zelllinie durch eine erneute, transiente Transfektion des HCV-Replikons nicht rekonstituiert werden (siehe 3.2.1).

Ein wichtiger Transkriptionsfaktor für *VEGF* ist HIF1 (Forsythe *et al.*, 1996), welcher die Transkription von speziellen Genen unter Hypoxie reguliert (Semenza *et al.*, 2000). Es handelt es sich bei HIF1 um ein Dimer aus einer labilen α -Untereinheit (HIF1 α) und einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit (HIF1 β). Bei normaler Sauerstoff- und Nährstoffversorgung (Normoxie) wird die HIF1 α -Untereinheit hydroxyliert und Ubiquitin-abhängig abgebaut. Unter Hypoxie ist dieser Degradationsprozess gehemmt. HIF1 α kann in den Zellkern translozieren und dort mit der β -Untereinheit dimerisieren (Salceda und Caro, 1997; Kallio *et al.*, 1999). Der entstandene Transkriptionsfaktor HIF1 bindet spezifisch an das *hypoxia-response-element* in der Promotorregion spezieller Gene und induziert deren Transkription (Forsythe *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1995; Tsuzuki *et al.*, 2000). Zu diesen Genen gehören z.B. Proliferationsfaktoren, Zytokine, Hormone und Onkogene (Jung *et al.*, 2003; Kallio *et al.*, 1999). Auch wenn die Rolle von HIF1 in der Angiogenese verschiedener Krebsleiden umfangreich untersucht wurde, gibt es nur limitiert Erkenntnisse über die Rolle von HIF1 in HCV-assoziierten HCC.

Es wurde bereits beschrieben, dass in Zellen, die mit dem infektiösen *full-length* HCV-Replikon des Genotyps 2a infiziert wurden oder mit einem persistenten, subgenomischen Replikon mit adaptiven Mutationen des Genotyps 1b transfiziert wurden die VEGF-mRNA Menge moderat erhöht ist (Nasimuzzaman *et al.*, 2007). Dies wurde auf einen Hypoxie-ähnlichen Effekt zurückgeführt, der im Zusammenhang mit der Stabilisierung des HIF1 α -Proteins über *reactive-oxygen-species* (ROS) sowie verschiedenen zellulären Faktoren stehen könnte (NF κ B, STAT3, Phosphoinositid-3-Kinase, p42/p44 Mitogen-aktivierte Proteinkinase). Andere Arbeitsgruppen vermuten, dass die Stabilisierung des HIF1 α -Proteins durch das HCV-core-Protein ausgelöst wird (Hassan *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2014). Daher wurde untersucht, ob auch bei der Transfektion von subgenomischen Replikons des Genotyps 2a das HIF1 α -Protein nachgewiesen werden kann und ob die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA davon abhängig ist. In dieser Arbeit konnte das HIF1 α -Protein nur unter hypoxischen Bedingungen bzw. im HCV-assoziierten Maustumor immunologisch nachgewiesen werden (siehe 3.1.4, 3.4.1). Unter Zellkulturbedingungen konnte in Zellen, die unter Normoxie HCV-RNA replizieren, kein HIF1 α -Protein detektiert werden (siehe 3.4.1). Möglicherweise war dies der Verwendung des subgenomischen Replikons 2a, statt 1b, sowie der dem Fehlen der Strukturproteine in diesem Replikon (subgenomisches Replikon statt *full-length* HCV-Replikon; siehe 3.1.1) geschuldet. Jedoch führte Hypoxie, wie erwartet, in naiven Huh7-Zellen zur Erhöhung der VEGF-Transkriptmenge. Dennoch scheint die HCV-assoziierte Regulation von VEGF unabhängig von HIF1 α zu sein. Die Kultivierung von HCV-RNA replizierenden Zellen unter Hypoxie führte nicht zu einer weiteren Steigerung der VEGF-Transkriptmenge (siehe 3.4.1). Zudem wurde in Zellen, die transient HCV-RNA replizieren, durch siRNA-vermittelte Depletion bzw. LW6-induzierte Inhibition von HIF1 α , weder die VEGF-Transkriptmenge verringert noch die Degradation der VEGF-mRNA beschleunigt (siehe 3.4.2).

Eine andere Möglichkeit der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA liegt in der direkten oder indirekten Interaktion mit viralen Proteinen. Es gibt Hinweise darauf, dass die Expression des einzelnen HCV-*core*-Proteins zu einer Erhöhung der VEGF Expression führen kann (Hassan *et al.*, 2009; Abe *et al.*, 2012). Virale Proteine sind in der Lage zelluläre Proteine zu rekrutieren und deren Funktion zu modulieren. So wirkt sich die Expression der HCV-Proteine z.B. direkt auf die Expression von Chemokinen aus (Sillanpaa *et al.*, 2008) und HCV-Proteine können ebenfalls innerhalb spezieller Signalkaskaden der zellulären Interferonantwort eingreifen (Gale *et al.*, 1998b; Duong *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006; Polyak *et al.*, 2001; Taguchi *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Foy *et al.*, 2005). Daher wurde der Einfluss, der im Replikon kodierten Nichtstrukturproteine (NS3-NS5B) sowie der Neomycinkassette mit dem Teilabschnitt des *core*-Proteins (ca. 60 nt), auf die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA überprüft. Die HCV-Proteine wurden effizient exprimiert, jedoch führte dies nicht zur Induktion der VEGF-mRNA-Stabilisierung (siehe 3.3). Demnach scheint die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA eher mit der Transkription der HCV-RNA oder der HCV-RNA selbst bzw. mit Sekundärstrukturen innerhalb der HCV-RNA assoziiert zu sein. Ein solches Strukturelement könnte die in der 5'-UTR gelegene HCV-IRES darstellen. Diese ermöglicht die Translation viraler Proteine, auch wenn in Folge der PAMPR-Aktivierung die *cap*-abhängige Translation durch die Phosphorylierung von eIF2 α inhibiert wurde. Die WNV-RNA besitzt hingegen keine IRES und wird *cap*-abhängig translatiert (Chambers *et al.*, 1990). Insbesondere im Hinblick darauf, dass die Replikation von HCV-RNA in der posttranskriptionellen Stabilisierung von VEGF-mRNA resultiert und dies bei der Replikation von WNV-RNA nicht der Fall ist, sollte in zukünftigen Experimenten der Einfluss von Sekundärstrukturen der viralen RNA auf die Induktion der VEGF-mRNA Stabilisierung näher untersucht werden.

Auch in eukaryotischen Transkripten, die eine typische 5'-*cap*-Struktur besitzen werden immer häufiger IRES-Elemente gefunden (Martinez-Salas *et al.*, 2012). Unter Stressbedingungen (z.B. virale Replikation) ermöglicht die IRES-abhängige Translationsinitiation eine effiziente Proteinsynthese, auch wenn die *cap*-abhängige Translation inhibiert ist (Komar und Hatzoglou, 2011; Spriggs *et al.*, 2008). Meist handelt es sich dabei um Transkripte, die für zelluläre Proteine des programmierten Zelltods, Transkriptionsfaktoren, Kinasen oder Phosphatasen kodieren (Macejak und Sarnow, 1991; Komar und Hatzoglou, 2011). Die mRNA von VEGF besitzt in ihrer 5'-UTR ebenfalls zwei solcher IRES-Strukturen (Huez *et al.*, 1998). Die Länge der 5'-UTR und ihre starke Strukturierung interferiert mit dem ribosomalen *scanning*, wodurch die VEGF-mRNA bei *cap*-abhängiger Translation nur ineffizient translatiert wird (Akiri *et al.*, 1998; Huez *et al.*, 1998). Mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay wurde daher analysiert, ob auch andere zelluläre mRNAs, die eine IRES-Struktur aufweisen, einer HCV-assoziierten, posttranskriptionellen Stabilisierung unterliegen (siehe 3.2.3). Es zeigte sich, dass unter dem Einfluss der Replikation von HCV-RNA, dies auch für die mRNA des *X-linked inhibitor*

of apoptosis protein (XIAP) zutraf. XIAP wirkt als Caspaseinhibitor der Apoptose entgegen (Eckelman *et al.*, 2006) und kann die Tumorgenese von HCCs und anderen Tumoren unterstützen (Ramp *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2008). Somit wäre seine posttranskriptionelle Stabilisierung von Vorteil für das HCV. Allerdings konnte für andere mRNAs, wie die des NF- κ B *repressing factor* (NRF) oder des *cysteine-rich angiogenic inducer 61* (Cyr61) keine posttranskriptionelle Stabilisierung nachgewiesen werden, obwohl sie eine IRES-Struktur aufweisen. Dies ist interessant, da es sich bei NRF um einen Transkriptionsfaktor handelt, der unter anderem die *IFN β* -Transkription reprimiert (Nourbakhsh und Hauser, 1997) und Cyr61 ein Proliferationsfaktoren ist, dessen Beteiligung in die Entstehung von HCC kontrovers diskutiert wird (Kireeva *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2005; Hirasaki *et al.*, 2001). Demnach ist die HCV-induzierte Stabilisierung von zellulären mRNAs selektiv, da nicht jede IRES-haltige mRNA durch die Replikation von HCV-RNA posttranskriptionell stabilisiert wird. Dies schließt jedoch nicht aus, dass spezielle Motive innerhalb von IRES-Sequenzen spezifisch erkannt werden. Über solche individuellen Charakteristika kann die Aktivität von IRESs z.B. durch *IRES-trans-acting factors* reguliert werden (Baird *et al.*, 2006; Komar und Hatzoglou, 2011). Um dies genauer zu untersuchen, könnten zukünftig Transkripte untersucht werden, die nicht durch die Replikation von HCV-RNA stabilisiert werden, deren IRES-Sequenz jedoch durch die von VEGF substituiert wurde.

Eine andere Möglichkeit der posttranskriptionellen Regulation von mRNAs liegt in deren Assoziation mit speziellen, zytoplasmatischen Granula. Unter Bedingungen des zellulären Stresses, wie z.B. viralen Infektionen, oxidativem Stress, Nährstoffmangel oder Hitzestress kommt es zur zytoplasmatischen Assemblierung von mRNP-Komplexen, welche zu *stress granules* assemblieren können (Kedersha *et al.*, 2005; Kedersha und Anderson, 2007; Buchan und Parker 2009; Anderson und Kedersha, 2008). SGs sind unter anderem durch die Anwesenheit zellulärer mRNAs, Translationsinitiationsfaktoren (z.B. eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF4B, eIF3) und RBPs sowie der kleinen ribosomalen Untereinheit (48S) charakterisiert und können reversibel aggregieren. Der SG-Assemblierung geht die Phosphorylierung von eIF2 α voraus, wodurch die zelluläre Translation inhibiert wird (Kedersha *et al.*, 1999; Anderson und Kedersha, 2006). Die Kinasen, welche eIF2 α hauptsächlich phosphorylieren sind GCN2 (*general control nonderepressible 2*; Nährstoffmangel), PKR (viralen Stress), PERK (*PKR-like-endoplasmic reticulum-kinase*; ER-Stress) und HRI (*hepatic heme-regulated inhibitor*; oxidativer Stress) (Anderson und Kedersha, 2006; Harding *et al.*, 2000a/b). Im Fall von Virusinfektionen kann PKR über die Detektion viraler dsRNA (PAMP) aktiviert werden, welche dann eIF2 α phosphoryliert. Dadurch wird die Verfügbarkeit des ternären eIF2 α -GTP-tRNA_{iMet}-Komplexes limitiert und die zelluläre Translation inhibiert. Die Elongation an den Ribosomen wird jedoch nicht beeinflusst, wodurch polyadenylierte, zirkularisierte mRNA Transkripte entstehen, die noch an ihren Präinitiationskomplex gebunden sind (*messenger* Ribonukleoprotein,

mRNP). Die zytoplasmatische Aggregation dieser mRNPs resultiert in der Bildung von SGs (Anderson und Kedersha, 2008; Kedersha *et al.*, 2002). Da die Helikase eIF4A ein essentieller Faktor der Translation ist, kann ihre Inhibierung die Translation unabhängig von der eIF2 α -Phosphorylierung reprimieren und die SG-Bildung anregen (Mazroui *et al.*, 2006). Die Induktion der SG-Assemblierung ist bereits für einige Viren, wie das Hepatitis-C-Virus, beschrieben worden (Garaigorta *et al.*, 2012). Viele Viren reprimieren jedoch auch die SG-Bildung komplett, wie das Influenza-A-Virus (Khapersky *et al.*, 2012) oder innerhalb spezieller Infektionsstadien, wie das Poliovirus (White *et al.*, 2007). Primär wird die SG-Bildung über die Spaltung von SG-Komponenten durch Proteinasen bzw. die Regulation der PKR-Aktivität moduliert (Khapersky *et al.*, 2012; Lloyd, 2013). Die Mechanismen sind dabei so divers, wie die Vielfalt an viralen Replikationsstrategien. Bei einer HCV-Infektion oszilliert die SG-Bildung, wodurch eine kurzzeitige Translation ermöglicht wird. Das heißt, die SGs assemblieren und disassemblieren kontinuierlich über die PKR-abhängige Phosphorylierung und die *growth-arrest and DNA-damage protein*-abhängige Dephosphorylierung von eIF2 α (Garaigorta *et al.*, 2012). Dadurch wird das Überleben der Zelle und die Translation zellulärer und viraler Proteine gewährleistet (Ruggieri *et al.*, 2012). Besonders wichtig ist dies auch im Hinblick auf die Persistenz der Virusinfektion. Es wurden bereits viele Proteine identifiziert, die im Zuge der SG-Assemblierung rekrutiert werden. Bis heute ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt, welche genaue physiologische Funktion SGs tatsächlich besitzen. Ursprünglich wurde angenommen, dass SGs essentiell für die Inhibition der Translationsinitiation sind, wenn zellulärer Stress auftritt (Anderson und Kedersha, 2008). Dadurch würden sie die reversible Zwischenspeicherung von mRNAs und dem blockierten Translations-Präinitiationskomplex erlauben. Die in ihnen gelagerten mRNAs stünden somit der Degradation- und Translationsmaschinerie nicht mehr zur Verfügung (Beckham und Parker, 2008; Kedersha *et al.*, 1999/2002). Da es sich um einen reversiblen Effekt handelt, könnten die assoziierten mRNAs nach Abklingen des stressauslösenden Faktors jedoch wieder der Degradations- und Translationsmaschinerie zugeführt werden (Anderson und Kedersha, 2006). Möglicherweise könnte daher auch die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA mit einer zwischenzeitlichen Lagerung in SGs assoziiert sein. Neuere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass die SG-Assemblierung und die Translationsinhibition voneinander unabhängige Prozesse sind und sich die mRNP-Komplexe dynamisch zwischen SGs, Zytoplasma und translationsaktiven Polysomen bewegen. Das Schicksal von mRNAs scheint daher durch die Interaktion der zellulären Transkripte mit verschiedenen RNA-Bindeproteinen zu mRNPs bestimmt zu werden (Kedersha *et al.*, 2000/2005; Mokaš *et al.*, 2009; Bley *et al.*, 2015). Deshalb sollte die Frage geklärt werden, ob die HCV-assoziierte Stabilisierung der VEGF-mRNA mit der Assemblierung von SGs korreliert und womöglich von ihr induziert wird. In den vorliegenden Experimenten konnte durch indirekte Immunfluoreszenz in der Tat die

bereits beschriebene HCV-assoziierte Assemblierung von SGs detektiert werden (Garaigorta *et al.*, 2012), jedoch nur in transient mit HCV-RNA transfizierten Zellen. In der persistenten HCV-Zelllinie konnte hingegen weder die Assemblierung von SGs noch die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA nachgewiesen werden (siehe 3.5.1). Vermutlich lag dies an einer zellulären Adaptation innerhalb der HCV-Zelllinie, da die aus ihr isolierte HCV-RNA keine Sequenzveränderungen aufwies und sie bei Transfektion in naive Huh7-Zellen wiederum die SG-Assemblierung induzierte (siehe 3.5.2). Zudem könnte die HCV-induzierte SG-Assemblierung auch spezifischen Induktionswegen unterliegen, welche in der HCV-Zelllinie inhibiert sind, da mittels Arsenatreagenz die SG-Bildung in der HCV-Zelllinie wieder angeregt werden konnte (siehe 3.7). Weiterführende Analysen gaben jedoch Hinweise auf eine Unabhängigkeit der HCV-assoziierten VEGF-mRNA-Stabilisierung von der SG-Assemblierung. Naive Huh7-Zellen sowie Zellen der persistenten HCV-Zelllinie, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden, zeigten trotz starker SG-Assemblierung keine posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA (siehe 3.2.1; 3.7). Zudem wiesen auch die mit dem WNV-Replikon transfizierten Zellen, entgegen der Erwartungen, eine Assemblierung von SGs auf, jedoch keine posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA (Courtney *et al.*, 2012; siehe 3.2.1). Daraus ließ sich schließen, dass die durch oxidativen Stress oder die durch WNV-RNA-Replikation induzierten SGs nicht zur Erhöhung der Halbwertszeit der VEGF-mRNA führten. Möglicherweise könnte die Zusammensetzung und Funktion von Arsenat-, WNV- und HCV-induzierten SGs variieren und von der Art des auslösenden Stimulus abhängig sein (Buchan *et al.*, 2011; Piotrowska *et al.*, 2010). Daher wurde anhand von Depletionsanalysen einzelner SG-Komponenten untersucht, ob die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA von der SG-Bildung abhängig ist (siehe 3.6, 3.7). Zu den abundant auftretenden und innerhalb dieser Arbeit untersuchten SG-Komponenten gehören TIA1, TIAR und G3BP1 (Tourriere *et al.*, 2003; Gilks *et al.*, 2004). Diese wurden separat oder simultan in naiven und HCV-RNA replizierenden Huh7-Zellen depletiert und die Halbwertszeit der VEGF-mRNA bestimmt. Die simultane Depletion von TIA1, TIAR und G3BP1 in transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen führte zum Verlust der HCV-induzierten posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA (siehe 3.6). Die Halbwertszeit der VEGF-mRNA wurde in diesen Zellen von 232 ± 13 min auf 111 ± 8 min verkürzt. Die separate Depletion der einzelnen Proteine zeigte jedoch, dass nur TIA1 an der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA beteiligt war. TIAR und G3BP1 konnten effektiv depletiert werden, hatten jedoch keinen Einfluss auf die Halbwertszeit der VEGF-mRNA. Demnach konnte TIA1 in dieser Arbeit erstmals als Faktor der HCV-assoziierten Stabilisierung der VEGF-mRNA beschrieben werden. Zudem hatte keine der Depletionen Auswirkungen auf die Effizienz der viralen RNA-Replikation (siehe 3.6) und die HCV-assoziierte SG-Assemblierung wurde durch die Depletion von TIA1 nicht beeinflusst (siehe 3.7). Letzteres deckt sich mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen

(Gottschald *et al.*, 2010; Lopez de Silanes *et al.*, 2005; Bley *et al.*, 2015). Sie beschrieben, dass eine gleichzeitige Depletion von TIA1, TIAR und G3BP1 nötig ist, um die mikroskopisch sichtbare SG-Assemblierung zu inhibieren (Bley *et al.*, 2015), obwohl TIA1 zuvor als essentieller Faktor der SG-Assemblierung beschrieben wurde (Gilks *et al.*, 2004). Des Weiteren ist die Aggregation von mRNPs zu SGs für die verminderte Degradation von mRNAs unter Stressbedingungen entbehrlich (Bley *et al.*, 2015). Möglicherweise verbleibt ein Teil von TIA1 im löslichen Zustand im Zytoplasma der Zelle, wo es die Degradation der VEGF-mRNA beeinflusst, während der andere Teil in SGs akkumuliert (siehe 3.8.2). Die unterschiedlichen Funktionen von TIA1 könnten durch posttranslationale Modifikationen oder weitere Interaktionspartner reguliert werden (Ohn *et al.*, 2008; Ohn und Anderson, 2010). Demnach scheint nicht die Assemblierung von HCV-assoziierten SGs, sondern das RNA-Bindeprotein TIA1 im direkten Zusammenhang mit der Induktion der posttranskriptionellen VEGF-mRNA-Stabilisierung zu stehen.

4.2 TIA1 als möglicher Faktor der posttranskriptionellen Genregulation in HCV-RNA replizierenden Zellen

TIA1 konnte als potentieller, *trans*-agierender Faktor der HCV-assoziierten Stabilisierung der VEGF-mRNA identifiziert werden (siehe 3.6). Bisher wurden in der Literatur unter anderem das *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L* (hnRNPL), das *hu-antigen R* (HuR) sowie NF90 als Faktoren der posttranskriptionellen Regulation der VEGF-mRNA beschrieben (Arcondéguy *et al.*, 2013; Vumbaca *et al.*, 2008; Shih und Claffey, 1999; Levy *et al.*, 1998). Bei TIA1 handelt es sich um ein primär kernständiges RNA-Bindeprotein. Es besitzt drei *RNA-recognition-motifs* (RRMs), welche Uridin-reiche RNA-Sequenzmotive binden können (Tian *et al.*, 1991; Kawakami *et al.*, 1994). Dabei scheint ein ca. 30-37 Nukleotide langes, leicht variables Sequenzmotiv besonders wichtig zu sein (Lopez de Silanes *et al.*, 2005). Der C-terminale Bereich von TIA1 ist Glutamin-reich, ähnelt strukturell dem Prion-Protein und ist in die Assemblierung von SGs involviert (Gilks *et al.*, 2004). Durch alternatives Spleißen seiner prä-mRNA werden zwei bekannte Isoformen von TIA1 gebildet (TIA1vI und TIA1vII). Die längere Isoform (TIA1vII) weist, verglichen mit der kürzeren (TIA1vI), nahe des RRM2 eine Insertion von 11 Aminosäuren auf (Beck *et al.*, 1996; Izquierdo und Valcarcel, 2007) (Abb. 33). Die RRMs von TIA1 besitzen unterschiedliche Bindeaffinitäten gegenüber RNAs bzw. prä-mRNAs. Während RRM2 die höchste, spezifische RNA-Bindeaffinität besitzt und diese durch RRM3 weiter gesteigert wird, scheint RRM1 keine spezifische Bindeaktivität gegenüber RNAs zu besitzen (Dember *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2014). Da sich die TIA1-Isoformen im Sequenzbereich nahe des RRM2 unterscheiden, könnten die daraus resultierenden Strukturvariationen zu differenzierten Bindeaffinitäten bezüglich verschiedener mRNAs führen (Förch *et al.*, 2002).

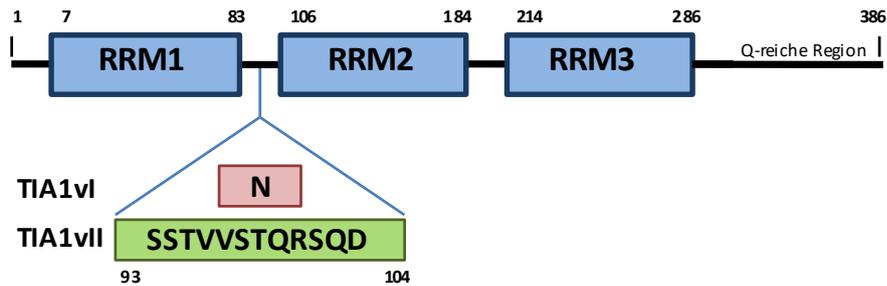


Abb. 33: Proteinstruktur von TIA1

Das *T-cell-restricted-intracellular-antigen-1* (TIA1) besitzt 3 RNA-recognition-motifs (RRM1-3; blaue Kästen) und eine C-terminale Glutamin-reiche Region (Q-reiche Region) in den angegebenen Bereichen (Aminosäurepositionen). Die beiden TIA1-Isoformen unterscheiden sich im Bereich kurz vor dem RRM2. 12 Aminosäuren (SSTVVSTQRSQD) der längeren Isoform von TIA1 (TIA1vII, grüner Kasten) werden in der kürzeren Isoform (TIA1vI) durch Asparagin (N) ersetzt.

Neben seiner Funktion bei der Assemblierung von Stressgranula ist TIA1 in vielen Aspekten des RNA-Metabolismus involviert. Hauptsächlich agiert es als Regulator des alternativen Spleißens und als Suppressor der mRNA-Translation spezifischer Transkripte (Izquierdo *et al.*, 2005; Le Guiner *et al.*, 2001). Diese Transkripte haben verschiedene Funktionen, z.B. in der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase oder der Apoptose (Beck *et al.*, 1996; Förch *et al.*, 2000; Zuccato *et al.*, 2004). Zusammen mit der Glutaminreichen Region rekrutiert RRM1 beispielsweise Komponenten des Spleiß-Apparates an spezielle Regionen innerhalb von prä-mRNAs (Del Gatto-Konczak *et al.*, 2000; Förch *et al.*, 2002). Abhängig von ihrer relativen Position zur Spleiß-Stelle können zusätzliche Sequenzelemente innerhalb der prä-mRNA auch regulatorische RNPs rekrutieren, um die Spleiß-Stelle zu bestärken oder zu schwächen (Ule *et al.*, 2006). Mit Hilfe seiner RRM2 und 3 kann TIA1 auch ins Zytoplasma der Zelle verlagert werden und dort durch Bindung an AU-reiche Regionen in der 3'-UTR von mRNAs als translationaler Repressor agieren. Beschrieben wurde dies beispielsweise für *cyclooxygenase-2* (Dixon *et al.*, 2003; Cok *et al.*, 2003), *cytochrome-c* (Kawai *et al.*, 2006) und den *tumor necrosis factor-alpha* (Piecyk *et al.*, 2000). Über die unterschiedlichen Funktionen der zwei TIA1-Isoformen ist wenig bekannt, da in den meisten Publikationen nicht zwischen den TIA1-Isoformen differenziert wird. Interessanterweise wurde jedoch beschrieben, dass die kurze Isoform von TIA1 (TIA1vI) eine größere Spleiß-Aktivität besitzt als die längere Isoform (TIA1vII) (Izquierdo und Valcarcel, 2007). Aufgrund dieses Funktionsunterschiedes wurde innerhalb dieser Arbeit untersucht, ob sich die Expression der einzelnen TIA1-Isoformen differenziert auf die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA auswirkt. Dafür wurden beide TIA1-Isoformen als FLAG-Fusionsprotein in naiven Huh7-Zellen, der persistenten HCV-Zelllinie sowie mit HCV- und WNV-Replikon transfizierten Zellen plasmidvermittelt exprimiert. Die Expression der kurzen Isoform von TIA1 (FLAG-TIA1vI) verstärkte die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in allen Zellen, die HCV-RNA replizierten. Die Expression der längeren Isoform von TIA1 (FLAG-TIA1vII) hatte

hingegen keine Auswirkungen. Interessanterweise wurde durch die Expression von FLAG-TIA1vl die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in den Zellen der persistenten HCV-Zelllinie rekonstituiert und in transient HCV-RNA replizierenden Zellen weiter gesteigert. Die Degradation der VEGF-mRNA blieb in naiven Huh7-Zellen oder mit WNV-RNA transfizierten Zellen unbeeinflusst (siehe 3.8.3; 3.8.4). Die Rekonstitution der VEGF-mRNA Stabilisierung in der persistenten HCV-Zelllinie war dabei zeitabhängig. Bereits 16 h *p.t.* konnten erste Veränderungen im zeitlichen Verlauf des VEGF-mRNA-Abbaus detektiert werden. Das Maximum der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA wurde zwischen 24 h und 36 h nach Beginn der FLAG-TIA1vl-Expression gemessen. Nach 48 h war die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA jedoch nicht mehr nachweisbar (siehe 3.8.4). Vermutlich konnte FLAG-TIA1vl die Funktion des endogenen TIA1vl bei der VEGF-mRNA-Stabilisierung übernehmen, unterlag jedoch mit der Zeit einer nicht näher charakterisierten, zellulären Adaptation. Diese Adaptation reprimiert vermutlich auch die stabilisierende Funktion des endogenen TIA1vl, wenn HCV-RNA persistent repliziert wird. Auf der einen Seite könnte dadurch die HCV-assoziierte Modifikation von TIA1vl verloren gehen, welche die Stabilisierung der VEGF-mRNA in einer gewissen Zeitspanne nach der Transfektion von HCV-RNA ermöglicht. Auf der anderen Seite könnten auch weitere Modifikationen hinzukommen, welche die Funktion von TIA1vl weiter verändern. Demnach konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Isoformen von TIA1 wahrscheinlich individuelle Funktionen bei der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA aufweisen. Ergänzend ist zu sagen, dass die Plasmid-vermittelte Expression von FLAG-TIA1vl zwar die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA rekonstituiert, dabei jedoch nicht die SG-Assemblierung induziert (siehe 3.8.2; 3.8.3). Somit konnte die Unabhängigkeit des VEGF-mRNA-Abbaus von der SG-Bildung weiter bestätigt werden. Zudem konnte durch Immunfluoreszenzanalysen gezeigt werden, dass bei HCV-assoziiierter SG-Assemblierung vorzugsweise YFP-TIA1vII in SG akkumulierte (siehe 3.8.2). Demnach könnte zytoplasmatisches TIA1vl über andere zelluläre Funktionen verfügen als SG-assoziiertes TIA1vII. Möglicherweise disassembliert TIA1vl auch schneller von SGs als TIA1vII, wodurch es weitere zelluläre Funktionen, wie z.B. bei der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA übernehmen kann. Ob diese Stabilisierung (entgegen der bisher beschriebenen Funktion) über eine direkte Bindung von TIA1vl an die VEGF-mRNA erreicht wird, oder dies ein indirekter Effekt ist, aufgrund der Expressionsregulation eines weiteren Faktors (z.B. Translationsrepression, alternatives Spleißen), bleibt ungeklärt. Die in der 3'-UTR, der VEGF-mRNA, gelegenen AU-reichen Sequenzen (Claffey *et al.*, 1998) könnten eine direkte Bindung von TIA1 ermöglichen (Chen und Manley, 2009; Hamdollah-Zadeh *et al.*, 2015). Dabei könnte die Bindeaffinität von TIA1 an diese Sequenzen pH-abhängig reguliert werden, über die Protonierung bzw. Deprotonierung eines Histidinrests im N-terminalen Bereich von RRM3 des TIA1-Proteins (Cruz-Gallardo

et al., 2013). Möglicherweise könnte auch die Replikation von HCV-RNA zur Veränderung des pH-Wertes beitragen und so die Bindung von TIA1 an AU-reiche RNA-Sequenzen beeinflussen.

Die Regulation von Proteinfunktionen sowie von Protein-RNA-Interaktion kann außerdem über posttranslationale Modifikationen oder Bindung von anderen, zellulären Komponenten moduliert werden. Es ist bekannt, dass TIA1 im Zuge der Fas-induzierten Apoptose durch die *Fas-activated serine-threonine kinase* phosphoryliert werden kann. Die genauen Phosphorylierungsstellen sind hier jedoch noch nicht beschrieben worden (Tian *et al.*, 1995). Dies legt den Schluss nahe, dass möglicherweise auch die Funktion von TIA1 über seinen Phosphorylierungsstatus determiniert werden kann. Andere Forschungsgruppen identifizierten innerhalb des TIA1-Proteins bisher 6 verschiedene Tyrosine, Serine bzw. Threonine, die phosphoryliert werden können (Tao *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2010). Zwei Phosphorylierungsstellen, die des Threonins an Position 83 und 99, liegen nahe bzw. innerhalb des Sequenzabschnittes, welcher in der kurzen Isoform von TIA1 fehlt (Sharma *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2013). Bisher wurden jedoch noch keine Daten darüber veröffentlicht, inwieweit die Funktionen von TIA1 durch diese Phosphorylierungen beeinflusst werden oder unter welche Bedingungen es zu den entsprechenden Phosphorylierungen kommt.

Da die Expression von FLAG-TIA1vl in der persistenten HCV-Zelllinie die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA rekonstituiert, wurden Untersuchungen zu möglichen posttranslationalen Modifikationen von TIA1vl durchgeführt. Massenspektroskopische Analysen zeigten jedoch keine Unterschiede zwischen den Analyten und wiesen eine inkomplette Peptidabdeckung auf (rekombinant gereinigtes TIA1vl sowie in naiv und HCV-pers. exprimiertes FLAG-TIA1vl 24 h *p.t.* bzw. 48 h *p.t.*), wodurch genauere Untersuchungen notwendig sind. Zusätzlich durchgeführte *in vivo* und *in vitro* Phosphorylierungsstudien legen nahe, dass TIA1vl und TIA1vll in Huh7-Zellen, mit und ohne Replikation von HCV-RNA, tatsächlich phosphoryliert vorliegen (3.9.3) und dass TIA1 ein putatives Substrat der PKR ist (siehe 3.9.2). Dies ist interessant, da PKR als intrazellulärer Stress-Sensor agiert und z.B. durch dsRNA (virale Replikation) aktiviert wird. In Folge dessen kann die *cap*-abhängige Translationsinitiation limitiert und die Expression pro-inflammatorischer Zytokine über Transkriptionsfaktoren wie NFκB induziert werden (Williams, 1999). Anhand der Experimente konnte jedoch keine Aussage über die Position oder Anzahl der Phosphorylierungsstellen getroffen werden. Es ist möglich, dass hier Unterschiede bestehen, die zu unterschiedlichen Aktivitätsprofilen der TIA1-Isoformen führen. In der persistenten HCV-Zelllinie könnten im Zuge der zellulären Adaptation andere oder zusätzliche posttranslationale Modifikationen auftreten, wodurch die nach transienter Transfektion von HCV-RNA vorhandene Stabilisierung der VEGF-mRNA reprimiert wird.

Im Weiteren wurde sich auf Bindungsstudien zwischen dem TIA1vl-Protein und weiteren zellulären Proteinen fokussiert, um den Signalweg der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA näher zu untersuchen. Zur Ermittlung putativer Interaktionspartner von TIA1vl, wurde FLAG-TIA1vl in naiven Huh7-Zellen und der persistenten HCV-Zelllinie heterolog exprimiert. Zum Zeitpunkt der maximalen, posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA (HCV-Zelllinie) wurde FLAG-TIA1vl immunpräzipitiert und die Identität putativer Interaktionspartner mittels Massenspektrometrie bestimmt (siehe 3.10.1). Es wurde davon ausgegangen, dass in der persistenten HCV-Zelllinie zum Messzeitpunkt eine Mischpopulation von FLAG-TIA1vl vorlag. Diese ermöglichte einerseits die rekonstituierte, posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA, andererseits war FLAG-TIA1vl durch zelluläre Adaptationsmechanismen so modifiziert, dass die VEGF-mRNA nicht mehr posttranskriptionell stabilisiert werden konnte. Mittels Ko-IP und Massenspektrometrie können Faktoren der HCV-assoziierten mRNA-Stabilisierung sowie der zellulären Adaptation identifiziert werden. Aus den Untersuchungen ergab sich eine Liste von 98 putativen FLAG-TIA1vl-Interaktionspartnern, die in der persistenten HCV-Zelllinie bzw. in naiven Huh7-Zellen gefunden wurden (siehe 3.10.1; Anhang 7.2, Tab. 8). Davon wurden 20 Proteine ausgewählt und hinsichtlich ihrer Funktion bei der HCV-assoziierten, posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA untersucht (siehe 7.2, Tab. 9). Die Auswahl der zu untersuchenden Proteine stützte sich auf ihre in der Literatur beschriebenen Funktionen innerhalb des mRNA-Metabolismus, der intrazellulären Signaltransduktion (z.B. im Zuge der Interferonantwort) sowie der Assoziation in *messenger-ribonucleoprotein*-Komplexen (mRNP). Die Proteine wurden dafür in transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen, der persistenten HCV-Zelllinie sowie naiven Huh7-Zellen mittels siRNA depletiert (siehe 3.10.2). In transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen resultierte die Depletion folgender Proteine im Verlust der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA: Januskinase 1 (JAK1), *Protein S100 calcium-binding protein A9* (S10A9), *heterogeneous-nuclear-ribonucleoprotein-M* und *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K* (hnRNPM, hnRNPK) sowie *splicing factor, proline- and glutamine rich* (SFPQ), *Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1* (IGF2BP1) und Serin-Threonin Proteinkinase 38 (STK38). Die HCV-Replikation blieb dabei unbeeinflusst. Demnach scheinen diese Proteine direkt oder indirekt an der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA beteiligt zu sein. In der persistenten HCV-Zelllinie führte nur die Depletion des *double-stranded-RNA-binding-protein-Staufen-homolog-1* (STAU1) zur Rekonstitution der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA. Somit ist STAU1 vermutlich am Adaptationsprozess in der persistenten HCV-Zelllinie beteiligt. In Zellen ohne HCV-Replikation wurden durch die Applikation der siRNAs keine Auswirkungen auf die Degradation der VEGF-mRNA beobachtet. Die so identifizierten, putativen Interaktionspartner von TIA1vl sind vor allem RNA-

Bindeproteine, Kinasen oder Wachstumsfaktoren. Diese agieren hauptsächlich als Regulatoren des RNA-Metabolismus, des intrazellulären Transports und sind als Signaltransduktoren aktiv. Auffällig ist, dass den meisten dieser Proteine Funktionen innerhalb der zellulären Immunantwort bzw. pro-inflammatorischer Prozesse zugeschrieben werden (JAK1, STK38, S10A9, hnRNPM, IGF2BP1, STAU1) und einigen innerhalb anderer zellulärer Signalwege, wie z.B. dem alternativen Spleißen (hnRNPM, hnRNPK, SFPQ). Dies könnte einen wichtigen Hinweis für weiterführende Untersuchungen geben.

Speziell hnRNPM, hnRNPK sowie SFPQ sind in Prozesse des alternativen Spleißens involviert und können mit dem Spleißosom assoziieren (Gozani *et al.*, 1994; Marko *et al.*, 2010; Mikula *et al.*, 2013). Da sie mit FLAG-TIA1vl ko-präzipitiert wurden und sich ihre siRNA-vermittelte Depletion negativ auf die Stabilisierung der VEGF-mRNA in transient HCV-RNA replizierenden Zellen auswirkte, könnten sie beim alternativen Spleißen der TIA1-prä-mRNA in seine zwei Isoformen beteiligt sein. Zumal bereits beschrieben ist, dass TIA1 selbst ein Regulator des alternativen Spleißens ist und auch in der Lage ist das Spleißen seiner eigenen prä-mRNA zu regulieren (Le Guiner *et al.*, 2001).

Bei SFPQ handelt es sich um ein DNA-/RNA-Bindeprotein und einen essentiellen Faktor des alternativen Spleißens von prä-mRNAs (Patton *et al.*, 1993). Da SFPQ primär Funktionen in diesem Bereich zugeschrieben werden, ist seine Beteiligung am Spleißen der TIA1-prä-mRNA wahrscheinlich. Allerdings ist SFPQ im Komplex mit anderen Proteinen (z.B. *Non-POU domain-containing octamer-binding protein*) auch in der Lage die Transkription von Zielgenen und die intrazelluläre Lokalisation von RNAs zu regulieren (Knott *et al.*, 2016).

Auch hnRNPM beeinflusst als RNA-Bindeprotein verschiedene Aspekte des mRNA Metabolismus und Transports, wie z.B. die Prozessierung von prä-mRNAs (Hovhannisyan und Carstens, 2007). Analog zu anderen hnRNPs kann es zwischen Zellkern und Zytoplasma translozieren und ist dabei in der Lage eine Serie von Signalwegen zu initiieren, die zur Phosphorylierung von Proteinen, wie Interleukinen und Zytokinen, führen (Thomas *et al.*, 2011). Darüber hinaus wurde es mit der Metastasierung von Brustkrebszellen in Verbindung gebracht, wo es sich vermutlich auf das Umschalten des alternativen Spleißens während der epithelial-mesenchymalen Transition auswirkt (Xu *et al.*, 2014). Über spezifische Aktivitäten von hnRNPM im Bezug auf HCV-Infektionen oder die posttranskriptionelle Regulation von VEGF-mRNA ist bisher jedoch nichts bekannt. Durch seine Funktionen im mRNA-Metabolismus könnte es als direkter Interaktionspartner der VEGF-mRNA agieren oder über verschiedene Signalkaskaden zur Aktivierung von TIA1vl führen bzw. am alternativen Spleißen von TIA1-prä-mRNA beteiligt sein.

Eine Vielzahl verschiedener Funktionen wurde auch für hnRNPK beschrieben. Es handelt sich hierbei ebenfalls um ein RNA-Bindeprotein, welches präferiert C- und U-reiche Sequenzen bindet (Choi *et al.*, 2009). Involviert ist hnRNPK neben dem alternativen

Spleißen in zelluläre Regulationsmechanismen der Chromatinorganisation, der Transkription sowie der Translation und Stabilisierung von mRNAs und Proteinen (Michelotti *et al.*, 1996; Ostareck-Lederer und Ostareck, 2012; Bomszyk *et al.*, 2004). Zudem wurde beschrieben, dass hnRNPK in hepatozellulären Karzinomen die Transkription *XIAP* induzieren kann, um darüber apoptotische Prozesse innerhalb der Zelle zu unterdrücken (Xiao *et al.*, 2013). *XIAP* kann, wie auch VEGF, unter zellulärem Stress IRES-abhängig translatiert werden und die *XIAP*-mRNA wird, wie auch die von VEGF, im Zuge der Replikation von HCV-RNA posttranskriptionell stabilisiert (siehe 3.2.3). Dass eine direkte Bindung von hnRNPK an die VEGF-mRNA bzw. den *VEGF*-Promotor möglich ist wurde bereits indiziert (Sataranatarajan *et al.*, 2008; Uribe *et al.*, 2011).

In mit dem *vesicular stomatitis virus* infizierten Zellen kann hnRNPK vermutlich die Transkription von *TIA1* regulieren und dabei auch das Mengenverhältnis der *TIA1*-Isoformen beeinflussen (Dinh *et al.*, 2013) Dies spricht für eine mögliche Beteiligung am alternativen Spleißen der *TIA1*-prä-mRNA im Zuge der HCV-Replikation. Darüber hinaus könnten hnRNPM sowie hnRNPK in die Regulation der *VEGF*-Transkription bzw. der posttranskriptionellen Stabilisierung der *VEGF*-mRNA involviert sein. Mitunter könnten diese Funktionen auch über die Bindung der einzelnen Proteine in mRNP-Komplexen vermittelt werden, in welchem auch *TIA1* gebunden sein könnte.

Ein weiteres, innerhalb dieser Untersuchungen identifiziertes Protein mit vielfältigen Funktionen ist IGF2BP1. Dieses spielt eine wichtige Rolle für das Zellwachstum und die Regulation bzw. den Transport von mRNAs entlang des zellulären Zytoskeletts (Oleynikov *et al.*, 2003). Es kann, wie auch *TIA1*, mit mRNP-Komplexen (z.B. SGs) assoziieren (Kedersha *et al.*, 1999) und den Aufenthaltsort und die Stabilität von mRNAs während der zellulären Stressantwort regulieren. Es ist jedoch entbehrlich für die Assemblierung von SGs (Bley *et al.*, 2006/2015). Durch Bindung von IGF2BP1 an Sequenzen innerhalb von UTRs und kodierenden Bereiche (z.B. *coding-region-instability-determinant*) kann auch die Translation von Zielgenen reguliert werden (Lemm und Ross, 2002; Weidensdorfer *et al.*, 2009). Bereits beschriebene Ziel-mRNAs von IGF2BP1 sind unter anderem β -Actin, c-Myc und CD44 (Hüttelmaier *et al.* 2005; Weidensdorfer *et al.*, 2009; Leeds *et al.*, 1997). Über die Bindung von IGF2BP1 können mRNAs auch vor *microRNA*-Abbau und endonukleolytischer Spaltung geschützt werden (Elcheva *et al.*, 2009). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch für die HCV-assoziierte, posttranskriptionelle Stabilisierung der *VEGF*-mRNA vorliegen. In HCV-infizierten Zellen verstärkt IGF2BP1 die virale, IRES-vermittelte Translation durch Bindung an die 5'- und 3'-UTR der viralen RNA. Die Replikation der HCV-RNA bleibt davon unbeeinflusst (Weinlich *et al.*, 2009). Des Weiteren wird IGF2BP1 eine protumorgene Wirkung in HCC zugeschrieben (Gutschner *et al.*, 2014). Da die posttranskriptionelle Stabilisierung der *VEGF*-mRNA wahrscheinlich mit der Replikation der HCV-RNA assoziiert ist und nicht mit der Assemblierung von SGs (siehe 3.7), könnte IGF2BP1 auch in seiner Funktion als RNA-Bindeprotein die mRNA von

VEGF binden und diese posttranslational stabilisieren. Diese Bindung könnte eventuell auch durch TIA1 unterstützt werden.

Neben diesen Proteinen wurden auch noch STK38, S10A9 sowie JAK1 und STAU1 als putative Bindepartner von FLAG-TIA1vl sowie als Faktoren der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA identifiziert (siehe 3.10). Diese sind von besonderem Interesse, da sie im Bereich der zellulären Immunantwort und pro-inflammatorischer Prozesse involviert sind (Gebhardt *et al.*, 2006; Sakatsume *et al.*, 1995; Elbarbary *et al.*, 2013). STK38 ist als Serin-/Threonin-Kinase an der Regulation der Zellzykluskontrolle, Apoptose sowie Zytokinproduktion beteiligt (Vichalkovsski *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). Seine bekannteste Funktion liegt in der Regulation des MAPK-Signalweges als negativer Regulator von Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinase-Kinase 1/2 (Enomoto *et al.*, 2008). STK38 reguliert jedoch auch die Stabilität und den Abbau von Proteinen in Lymphomen und stabilisiert es c-Myc posttranslational, wodurch dessen onkogene Wirkung das Tumorstadium fördern kann (Cornils *et al.*, 2010; Bisikirska *et al.*, 2013). Es wird vermutet, dass STK38 auch NFκB durch Phosphorylierung aktivieren kann, wodurch es in den Interferon-β-Signalweg involviert sein könnte (Shi *et al.*, 2012; Yamilina und Ivashkiv, 2010). Dieser könnte auch im Zuge der Replikation von HCV-RNA aktiviert werden und könnte zur posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA beitragen. Die Aktivierung von STK38 wird durch Bindung an Kalzium- und Zink-Bindeproteine der S100-Familie verstärkt (Tamaskovic *et al.*, 2003).

Zur dieser Familie gehört auch das S10A9-Protein, welches ebenfalls als putativer Bindepartner von TIA1vl durch Ko-IP und Massenspektrometrie detektiert wurde. Möglicherweise könnte die Aktivierung von STK38, durch die Bindung von S10A9 intensiviert werden. In diesem aktivierten Zustand könnte es dann TIA1vl posttranslational phosphorylieren und dadurch seine Funktion modulieren. S10A9 kommt meist mit S10A8 als Dimer vor und dient als Marker für inflammatorische Bedingungen (Roth *et al.*, 2003; Gebhardt *et al.*, 2006). Es wirkt auf der einen Seite als apoptotischer Faktor (Foell *et al.*, 2007), auf der anderen Seite ist S10A9 mit der Tumorentwicklung und Metastasierung assoziiert (Ghavami *et al.*, 2010) und wird von verschiedenen Tumoren sekretiert (Ghavami *et al.*, 2008; Hermani *et al.*, 2006; Ichikawa *et al.*, 2011). Es wirkt dabei als *damage-associated-pattern* (DAMP). DAMPs sind endogene Moleküle, die von nekrotischen oder gestressten Zellen freigesetzt werden, um inflammatorische Signalwege zu induzieren (Ehrchen *et al.*, 2009; Foell *et al.*, 2007). In dieser Funktion bindet S10A9 auch an *toll-like receptor 4* (TLR4) bzw. *receptor for advanced glycation endproduct* (RAGE), wodurch NFκB- und MAPK-Signalwege aktiviert werden können (Vogl *et al.*, 2007; Riva *et al.*, 2012; Hermani *et al.*, 2006; Ghavami *et al.*, 2008). S10A9 selbst wird in primären Lungentumoren über sekretierte Faktoren wie VEGF und TNFα induziert. Seine Transkription kann in Brustkrebszellen aber auch über STAT3 aktiviert werden, welcher ebenfalls in die Regulation Interferon-sensitiver Gene

involviert ist (Hiratsuka *et al.*, 2006; Nemeth *et al.*, 2009a). Interessanterweise wurde S10A9 in HCCs als Zielgen von NF κ B beschrieben (Nemeth *et al.*, 2009b). Daher könnte es an der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA über einen NF κ B- oder STAT-abhängigen Signalweg der Interferonantwort involviert sein, welcher vermutlich durch die Replikation von HCV-RNA induziert wird.

Ebenfalls mit dem STAT-Signalweg assoziiert ist die Januskinase 1 (JAK1), deren Depletion zum Verlust der posttranskriptionellen VEGF-mRNA-Stabilisierung führt. JAK1 ist eine membranassoziierte Tyrosinkinase, die mit einer Vielzahl von Zytokinrezeptoren assoziiert ist und eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Zelldifferenzierung spielt. Sie ist Bestandteil der zweiten Phase des Interferon- β -Signalweges und ist zusammen mit TYK2 an die intrazellulären Domänen des heterodimeren Rezeptorkomplex IFNAR gebunden. Durch Bindung von Interferonen des Typs I (IFN α , IFN β) werden die Tyrosinkinasen JAK1 und TYK2 aktiviert (de Weerd *et al.*, 2007). Dadurch werden die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 phosphoryliert und die STAT-vermittelte Transkriptionsinduktion von interferonsensitiven Genen ausgelöst (Bluyssen *et al.*, 1996; Darnell *et al.*, 1994; Williams, 1991; siehe 1.6). JAK1 kann neben IFN α / β auch durch die ER-Stress-assoziierte PERK aktiviert werden, wodurch ER-Stress und inflammatorische Signalwege konvergieren (Meares *et al.*, 2014; Novick *et al.*, 1995). Auch die Replikation von HCV-RNA wird mit ER-Stress sowie der zellulären Interferonantwort assoziiert (Tardif *et al.*, 2002; Merquiol *et al.*, 2011). So ist beispielsweise JAK1 in HCV-infizierten Zellen zusätzlich induziert (Sarma *et al.*, 2014). Die Detektion von HCV-RNA über PKR und die nachfolgende Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B innerhalb der ersten Phase des Interferon- β -Signalweges wird diskutiert und könnte auch zur Aktivierung von JAK1 führen. (Gong *et al.*, 2001; Arnaud *et al.*, 2010; Garaigorta und Chisari, 2009; Pflugheber *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 1999; Toroney *et al.*, 2010). Demnach wäre es möglich, dass die HCV-assoziierte, posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA mit dem Interferon-Signalweg über JAK1 verbunden ist. Untermuert wird dies durch die Untersuchungen von Sarcar und Kollegen, die beschrieben, dass das HCV-NS5A-Protein mit JAK1 direkt interagieren kann und im Komplex STAT3 aktiviert, was wiederum zu Transkriptionsinduktion von Genen führt, die vermutlich mit der HCV-assoziierten Pathogenese verbunden sind (Sarcar *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2001). Zudem kann durch die JAK1-assoziierte Phosphorylierung von STAT3 während der Meningiomdifferenzierung wahrscheinlich auch die VEGF-Expression reguliert werden (Zhang *et al.*, 2010). Da FLAG-TIA1vl und JAK1 in der persistenten HCV-Zelllinie ko-präzipitiert wurden (siehe 3.10.1) und sich die Depletion der jeweiligen Proteine negativ auf die Stabilisierung der VEGF-mRNA auswirkte, könnte TIA1vl auch durch JAK1 phosphoryliert werden. Dadurch könnte die zelluläre Funktion von TIA1vl modifiziert werden, sodass es die VEGF-mRNA direkt oder als Teil eines mRNP-Komplexes binden und stabilisieren kann.

Anders verhält es sich bei STAU1, dieses ist vermutlich innerhalb der persistenten HCV-Zelllinie an der Degradation der VEGF-mRNA beteiligt. Die siRNA-vermittelte Depletion von STAU1 rekonstituierte die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in diesen Zellen (siehe 3.10.2). STAU1 ist ein dsRNA-Bindeprotein des rauen ER, welches in den über Mikrotubuli vermittelten Transport und in den STAU1-vermittelten Abbau von mRNAs involviert ist (Wickham *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2005; Gleghorn *et al.*, 2013). STAU1 reguliert den Abbau von mRNAs dabei durch Bindung an spezifische ds-Bindestellen in deren 3'-UTR. Diese STAU1-Bindestellen können durch intramolekulare Basenpaarung, innerhalb der 3'-UTR einer mRNA, oder über intermolekulare Basenpaarung, zwischen zwei verschiedenen RNA-Molekülen, entstehen (Kim *et al.*, 2005; Gong und Maquat, 2011; Gong *et al.*, 2013). Bei Letzterem kommt es zu Bindung zwischen einem sogenannten *Alu*-Element in der 3'-UTR einer mRNA und einem partiell komplementären invertierten *Alu*-Element innerhalb einer *long non-coding*-RNA, wodurch eine STAU1-Bindestelle entsteht und es zum STAU1-vermittelten Abbau kommt (Gong und Maquat, 2011). Invertierte *Alu*-Elemente können jedoch auch in der 3'-UTR einer kodierenden mRNA vorkommen und ds-Bereiche mit *Alu*-Elementen ausbilden. Dadurch werden sie im Zellkern zurückgehalten und nicht ins Zytoplasma exportiert (Berger und Strub, 2011; Walters *et al.*, 2009). STAU1 kann vermutlich kompetitiv an diesen Duplex binden und ihn maskieren, wodurch es wiederum zum Export der mRNA ins Zytoplasma der Zelle kommt und die dsRNA-vermittelte Aktivierung von PKR verhindert wird. Dadurch käme es nicht zur Phosphorylierung von eIF2 α , wodurch die Translationsinhibition sowie PKR-abhängige Signalwege der Interferonantwort verhindert werden könnten (Elbarbary *et al.*, 2013). Möglicherweise reduziert STAU1 innerhalb der persistenten HCV-Zelllinie über solche Mechanismen spezifisch die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA, da die Depletion von STAU1 in diesen Zellen zur Rekonstitution der VEGF-mRNA-Stabilisierung führte. Andererseits könnte STAU1 auch an der Regulation von TIA1 beteiligt sein. Bei siRNA-vermittelter Depletion von STAU1 scheint die Transkription von *TIA1* induziert zu werden (Kim *et al.*, 2007). Dies ergänzt die Ergebnisse dieser Arbeit, wonach in den Zellen der persistenten HCV-Zelllinie bei Depletion von STAU1 sowie bei Expression von FLAG-TIA1vl die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA rekonstituiert werden konnte. Es wäre möglich, dass sich die Depletion von STAU1 in diesen Zellen auf die Expression von TIA1 auswirkt, wodurch wiederum die Stabilisierung der VEGF-mRNA unterstützt werden könnte. Da die Depletion von STAU1 die Halbwertszeit der VEGF-mRNA nur in der persistenten HCV-Zelllinie erhöhte, nicht jedoch in Huh7-Zellen, ist seine Funktion bezüglich der VEGF-mRNA vermutlich mit der Replikation der HCV-RNA assoziiert. Der durch die Replikation der HCV-RNA entstehende zelluläre Stress könnte die Funktion von STAU1 in Richtung des Abbaus der VEGF-mRNA modulieren. In transient transfizierten Zellen könnte das Hepatitis-C-Virus diesem Abbau durch „aktiviertes“ TIA1vl entgegenwirken. In diesen

Zellen hätte eine zusätzliche Depletion von STAU1 keine Veränderungen der Halbwertszeit der VEGF-mRNA zur Folge. Hingegen könnte STAU1 seine Funktion beim Abbau der VEGF-mRNA durch die Depletion von TIA1 wieder aufnehmen. In der persistenten HCV-Zelllinie hat die kontinuierliche Replikation von HCV-RNA vermutlich eine zelluläre Adaptation zur Folge, wodurch die HCV- und TIA1vl-abhängige Stabilisierung der VEGF-mRNA verloren geht. Möglicherweise wird hier TIA1vl posttranslational modifiziert und dadurch „inaktiviert“, wodurch es den STAU1-abhängigen Abbau der VEGF-mRNA nicht mehr inhibieren kann. Die Funktion von STAU1 könnte daher über unterschiedlich modifiziertes TIA1vl reguliert werden. Temporär exprimiertes FLAG-TIA1vl könnte durch die Replikation der HCV-RNA „aktiviert“ werden und den STAU1-abhängigen Abbauweg der VEGF-mRNA kurzzeitig unterdrücken, indem es STAU1 bindet und zu anderen zellulären Bereichen rekrutiert. Das endogene TIA1vl-Protein würde währenddessen in posttranslational modifizierter, „inaktiver“ Form vorliegen und könnte somit dem Abbau der VEGF-mRNA nicht entgegenwirken.

4.3 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Replikation von HCV-RNA die Genexpression von VEGF in Huh7-Zellen moduliert. Dabei wird sowohl die VEGF-Transkription induziert, als auch die VEGF-mRNA posttranskriptionell stabilisiert. Das heißt, die der Degradation zugängliche Menge an VEGF-mRNA ist unter dem Einfluss der Replikation von HCV-RNA reduziert. Die Beobachtung dieser HCV-induzierten, posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA ist neu und konnte in dieser Form erstmals innerhalb dieser Arbeit nachgewiesen werden. Die kurze Isoform von TIA1 (TIA1vl) konnte dabei als wichtiger Faktor dieser Stabilisierung identifiziert werden. Anhand der erhaltenen Ergebnisse wird als mögliches Modell dieser posttranskriptionellen Stabilisierung folgendes postuliert (Abb. 34): Bei der transienten Transfektion des subgenomischen HCV-Replikons wird das (+)-Strang-RNA-Genom des HCV in der Wirtszelle freigesetzt. Im Zuge der HCV-RNA-Replikation kommt es zur Bildung von viralen dsRNA-Intermediaten. Diese sowie weitere Strukturelemente in der viralen 5'-UTR und 3-UTR können durch spezifische Sensor-Proteine (PAMPRs) innerhalb der Zelle (z.B. PKR, RIG-I) detektiert werden. Dadurch werden verschiedene Signalkaskaden der zellulären Stressantwort bzw. des Interferon- β -Signalweges induziert (siehe 1.6.2; Hornung *et al.*, 2006; Yoneyama *et al.*, 2004; Malmgaard, 2004). Dabei werden vermutlich im Zuge der PKR Aktivierung SGs im Zytoplasma der Zelle assembliert (Anderson und Kedersha, 2002a/b; Clemens, 2001). Unter dem Einfluss der Replikation von HCV-RNA wird zudem die VEGF-Transkription verstärkt. Dies führt wiederum zu erhöhten Quantitäten des VEGF-Proteins, welches von den Zellen sezerniert wird. Als Zytokin und proangiogener Faktor begünstigt VEGF somit die Neovaskularisierung durch

Bildung neuer Blutgefäße. Dies könnte auch die Versorgung von Tumorgewebe in HCC unterstützen. In transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Huh7-Zellen tritt neben der verstärkten *VEGF*-Transkription auch eine posttranskriptionelle Stabilisierung der *VEGF*-mRNA auf. Im Zuge des Interferon- β -Signalweges könnten JAK1 und S10A9 an dieser Regulation der *VEGF*-mRNA beteiligt sein.

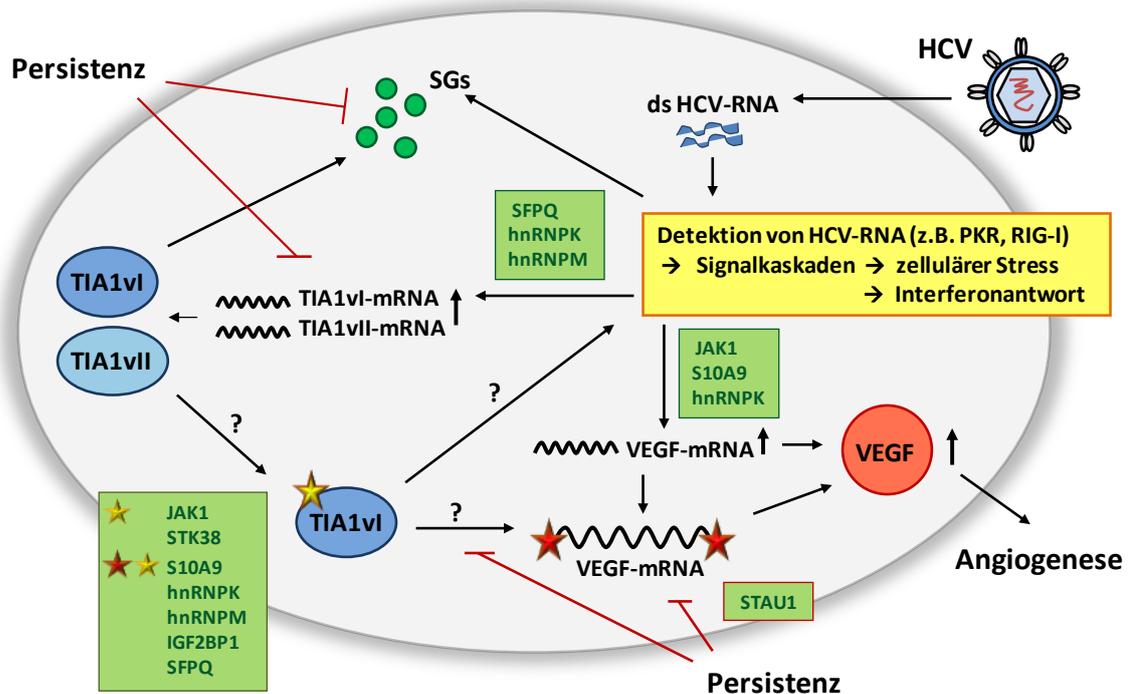


Abb. 34: Modell der posttranskriptionellen Stabilisierung der *VEGF*-mRNA

Bei transienter Transfektion einer humanen Zelle mit subgenomischer HCV-RNA, wird im Zuge der viralen Replikation dsRNA gebildet. Diese enthält spezifische Strukturen, welche als PAMPs von zellulären Rezeptoren (PAMPR, z.B. PKR, RIG-I) detektiert werden. Dadurch können verschiedene Signalkaskaden ausgelöst werden, welche zellulären Stress bzw. die Interferonantwort induzieren. Im Zuge dessen kommt es zur Assemblierung von zytoplasmatischen SGs, der verstärkten *TIA1*-Transkription (*TIA1* ist Bestandteil von SGs) sowie der gesteigerten Expression von VEGF. Dabei wird auch die mRNA von VEGF posttranskriptionell stabilisiert und die Halbwertszeit der *VEGF*-mRNA auf das ca. 2,3-Fache erhöht. Dies ist unabhängig von der SG-Assemblierung. Die kurze Isoform von *TIA1* (*TIA1vI*) ist an der posttranskriptionellen Stabilisierung der *VEGF*-mRNA beteiligt (rote Sterne). Dafür wird die *TIA1*-prä-mRNA bevorzugt in *TIA1vI* gespleißt und vermutlich posttranslational modifiziert, um es in eine Art aktiven Zustand zu überführen (gelber Stern). Die lange Isoform von *TIA1* (*TIA1vII*) lokalisiert hingegen bevorzugt in SGs. Durch Ko-Immunpräzipitation und Massenspektrometrie konnten putative Interaktionspartner von *TIA1* identifiziert werden (grüne Kästen). *TIA1vI* könnte dabei durch JAK1 oder STK38 posttranslational phosphoryliert werden oder durch andere Interaktionspartner wie S10A9, hnRNPK, hnRNPM sowie IGF2BP1 oder SFPQ gebunden und in seiner Funktion unterstützt werden. Möglicherweise binden diese Proteine aber auch die *VEGF*-mRNA direkt und stabilisieren sie in einem mRNP-Komplex. JAK1 könnte zusätzlich an der Transkriptionsinduktion von *VEGF* bzw. der Stabilisierung der *VEGF*-mRNA über Interferon-assoziierte Signalwege beteiligt sein. SFPQ, hnRNPK und hnRNPM könnten auch eine Rolle beim Spleißen der *TIA1* prä-mRNA besitzen. In der persistenten HCV-Zelllinie (Persistenz) liegt vermutlich eine Art der zellulären Adaptation vor, durch welche die HCV-induzierte Assemblierung der SGs und die posttranskriptionelle Stabilisierung der *VEGF*-mRNA inhibiert werden. Möglicherweise ist STAU1 daran beteiligt, dass die *VEGF*-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie vermehrt der Degradationsmaschinerie zugänglich ist, wodurch die posttranskriptionelle Stabilisierung der *VEGF*-mRNA verloren geht.

JAK1 ist als Tyrosinkinase in die STAT-vermittelte Transkriptionsinduktion interferonsensitiver Gene involviert (Bluyssen *et al.*, 1996; Sakatsume *et al.*, 1995). Auch die Expression von VEGF wurde bereits mit der Aktivierung dieser STAT-vermittelten Transkriptionsinduktion in Verbindung gebracht (Niu *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2010). S10A9 agiert hingegen als DAMP (*damage associated pattern*) und ist somit in die Regulation pro-inflammatorischer Signalkaskaden involviert, wodurch auch die Expression von angiogenen Mediatoren wie VEGF induziert werden kann (Croce *et al.*, 2009; Riva *et al.*, 2012; Simard *et al.*, 2013; Srikrishna *et al.*, 2012). In der persistenten HCV-Zelllinie ist die VEGF-mRNA hingegen nicht posttranskriptionell stabilisiert, obgleich die VEGF-Transkription ebenfalls erhöht ist. Möglicherweise liegt hier eine zelluläre Adaptation vor, welche die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA inhibiert. Einen Faktor dieser Adaptation könnte STAU1 darstellen. Bei siRNA-vermittelter Depletion von STAU1 in der persistenten HCV-Zelllinie wird die Stabilisierung der VEGF-mRNA rekonstituiert. Da STAU1 als Komponente von zytoplasmatischen mRNP-Komplexen bekannt ist, durch welche auch der Transport, die Stabilität und Translation von mRNAs (z.B. c-Myc) reguliert werden kann (Villace *et al.*, 2004; Weidensdorfer *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2005), könnte STAU1 in der persistenten HCV-Zelllinie daran beteiligt sein die VEGF-mRNA der Degradationsmaschinerie zuzuführen. Ein weiterer essentieller Faktor für die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-mRNA ist die kurze Isoform von TIA1 (TIA1vl). Für beide Isoformen von TIA1 konnten in transient mit HCV-RNA transfizierten Zellen gesteigerte Transkriptmengen aufgezeigt werden, wobei das alternative Spleißen zu Gunsten von TIA1vl reguliert war. Daran beteiligt könnten SFPQ, hnRNPM und hnRNPK sein. Diese Proteine sind als RNA-Bindeproteine in Prozesse des alternativen Spleißens involviert und binden prä-mRNAs (Gozani *et al.*, 1994; Dejgaard *et al.*, 1994; Bomsztyk *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2014). Als RNA-Bindeprotein ist TIA1 Bestandteil von SGs, deren Assemblierung jedoch nicht für die Stabilisierung der VEGF-mRNA essentiell ist. Dabei lokalisiert die lange Isoform von TIA1 (TIA1vl) verstärkt in SGs, während die kurze Isoform (TIA1vl) an der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA beteiligt zu sein scheint. Möglicherweise wird TIA1vl durch Bindung von Interaktionspartnern oder durch spezielle posttranslationale Modifikationen unter dem Einfluss der transienten Replikation von der HCV-RNA in eine Art „aktivierten Zustand“ überführt. Dadurch könnte TIA1vl in der Lage sein, die VEGF-mRNA direkt zu binden und zu stabilisieren (Chen und Manley *et al.*, 2009; Hamdollah Zadeh *et al.*, 2015). JAK1 und STK38 wären als Kinasen in der Lage TIA1vl posttranslational zu modifizieren (Zhang *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2012; Enomoto *et al.*, 2008). Während hnRNPK, hnRNPM, IGF2BP1 und SFPQ sowie S10A9 als Interaktionspartner agieren könnten, welche die Bindung zur VEGF-mRNA vermitteln. Sie könnten aber auch Bestandteil eines mRNP-Komplexes sein, der zusammen mit TIA1vl die VEGF-mRNA posttranslational stabilisiert (Bomsztyk *et al.*, 2004; Dinh *et al.*, 2013; Sataranatarajan *et al.*, 2008; Hafner *et al.*, 2010; Bell *et al.*, 2013; Riva *et al.*, 2012). Zudem

könnte TIA1vl auch indirekt auf die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA wirken, indem es beispielsweise Einfluss auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren nimmt, die im Zuge der zellulären Stress- und Interferonantwort aktiviert werden (Saito *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 2009). In der persistenten HCV-Zelllinie konnte hingegen weder die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA noch die Assemblierung von SGs oder die Transkriptionsinduktion von *TIA1* beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass hier eine zelluläre Adaptation vorliegt, durch welche das endogene TIA1vl nicht mehr in der Lage ist die VEGF-mRNA posttranskriptionell zu stabilisieren. Da in der persistenten HCV-Zelllinie durch transiente Expression von TIA1vl (FLAG-TIA1vl) die Stabilisierung der VEGF-mRNA kurzzeitig rekonstituiert werden kann, liegt das endogene TIA1vl in der HCV-Zelllinie vermutlich in einem „inaktiven Zustand“ vor.

Die genauen Mechanismen, durch die TIA1vl *in vivo* auf die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA wirkt und welche Adaptation in der HCV-Zelllinie zum Verlust dieses Effektes führt, sind nicht vollkommen geklärt. Um diese Frage zu beantworten, müssten die direkten Interaktionspartner von TIA1vl näher charakterisiert werden. Dafür könnten weitere Depletions-, Komplementations- sowie Ko-IP-Analysen mit den Kandidaten durchgeführt werden. Es könnte überprüft werden, inwieweit unter TIA1-Depletion einer seiner Bindepartner die Stabilisierung von VEGF komplementieren könnte. Eventuell könnte dies auch in Kombination mit Mutagenesen (z.B. Deletionsmutanten, Aminosäureaustausch) von TIA1 oder den entsprechenden Kandidaten untersucht werden. Parallel dazu sollten posttranslationale Modifikationen der TIA1-Isoformen mittels Massenspektrometrie näher analysieren werden. Speziell auch im Hinblick auf Modifikationen, die zu unterschiedlichen Funktionen führen könnten. Die mögliche Protein-RNA-Bindung von TIA1 zur den Isoformen der VEGF-mRNA bzw. speziellen Sequenzmotiven innerhalb der VEGF-mRNA sollten ebenfalls näher charakterisiert werden. Dies könnte *in vivo* durch RNA-Immünpräzipitation und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung umgesetzt werden, sowie durch kompetitive *in vitro* *electrophoretic-mobility-shift-assays* und Filterbindungs-Experimente zur kD-Wert-Bestimmung. Um weitere Bindepartner der VEGF-mRNA zu identifizieren könnten *cross-linking* Experimente mit angeschlossener Proteolyse und Massenspektrometrie durchgeführt werden. Eine andere Möglichkeit der Regulation von mRNAs stellen *microRNAs* (miRNA) dar. Sie regulieren die Genexpression posttranskriptionell durch spezifische Bindung an komplementäre Sequenzen, wodurch zelluläre und virale RNAs gezielt degradiert werden können (Filipowicz *et al.*, 2008). MiRNAs können dabei mit RBPs um die Bindung konkurrieren und die Degradation der gebundenen RNA direkt initiieren oder die Bindung anderer Faktoren verhindern und so die posttranskriptionelle Stabilität von RNAs und deren Translation beeinflussen. Es wurde bereits beschrieben, dass die Depletion von TIA1 und TIAR in HeLa-Zellen zur Hochregulation verschiedener miRNAs führte (Sanchez-Jimenez *et al.*, 2013). Somit könnte TIA1vl im vorliegenden

System auch an der Regulation verschiedener miRNAs beteiligt sein, welche wiederum einen Einfluss auf die posttranskriptionelle Regulation der VEGF-mRNA haben. Dazu könnten miRNA-Arrays oder *deep-sequencing* Analysen verwendet werden. Des Weiteren sollte die HCV-assoziierte Stabilisierung der VEGF-mRNA auch im Hinblick auf stressinduzierte bzw. interferoninduzierte Signalkaskaden untersucht werden. JAK1 wurde bereits als Faktor dieser Stabilisierung und potentieller Bindepartner von TIA1vl identifiziert. Diese spielt eine essentielle Rolle innerhalb der zweiten Phase der IFN β -Signalwegs bei der Transkriptionsinduktion von ISGs (siehe 1.6.2; Bluysen *et al.*, 1996), welche wiederum an der Stabilisierung der VEGF-mRNA beteiligt sein könnten. Außerdem sollten im Kontext dieser IFN β -induzierenden Signalwege, auch die viralen Strukturelemente (PAMPs) näher betrachtet werden, die im Zuge der viralen Replikation durch PKR (dsRNA, HCV-IRES) und RIG-I (Triphosphat-Struktur, poly-Uridin-Motive) detektiert werden können und sich durch assoziierte Signalkaskaden auf die Stabilisierung der VEGF-mRNA auswirken könnten (Galabru und Hovanessian, 1987; Hornung *et al.*, 2006; Schnell *et al.*, 2012). Besonders interessant ist dies, da sich die RNA der bisher untersuchten Viren HCV und WNV strukturell unterscheiden. Das HCV besitzt im Gegensatz zum WNV keine *cap*-Struktur am 5'-Ende seiner RNA (Westaway, 1987). Jedoch beinhaltet die HCV-RNA in ihrer 5'-UTR eine IRES-Struktur. Geeignete Herangehensweisen sind z.B. Deletionsmutanten der HCV-Replikons zu schaffen und den Einfluss des 5'-Triphosphat-Endes der viralen HCV-RNA und der HCV-IRES auf die zellulären Signalwege zur posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA zu untersuchen. Ergänzend könnten mit einer *cap*-Struktur versehene Varianten der HCV-RNA bzw. mit HCV-IRES-Motiven ergänzte Varianten der WNV-RNA analysiert werden. Zudem sollten die RNA-Replikation weiterer Viren untersucht werden, die eine nahe Verwandtschaft zu HCV und eine strukturell ähnliche 5'-UTR aufweisen. Dadurch könnte die mögliche HCV-Spezifität der beobachteten Effekte genauer untersucht werden. In Betracht kämen hierfür beispielsweise das Virus der bovinen Virusdiarrhö (BVDV) oder GBV-B (siehe 1.1; Muerhoff *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1992; Honda *et al.*, 1996; Simons *et al.*, 1995). In diesem Zusammenhang könnten neben Huh7-Zellen auch weitere Zelllinien [z.B. HEK293T-REx™ (*human embryonic kidney*), HeLa (Henrietta Lacks) oder MDBK (*Madin-Darby bovine kidney*)] zur Anwendung kommen (Chen *et al.* 2007; Horscroft *et al.*, 2005). Dadurch ließen sich Rückschlüsse auf mögliche Zelllinien-spezifische Adaptation ziehen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der HCV-Replikation auf die Expression des angiogenen *vascular-endothelial-growth-factors* (VEGF) in Huh7 untersucht. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Es wurden Zellen verglichen, die oxidativen Stress ausgesetzt waren bzw. mit replikationsaktiver bzw. replikationsdefizienter subgenomischer RNA des HCV oder des WNV transfiziert wurden. Nur Zellen mit replizierender HCV-RNA zeigten eine mit der HCV-Replikation korrelierende, signifikante und spezifische Induktion der VEGF-Expression, die sich in einer erhöhten VEGF-mRNA-Menge und verstärkter Sekretion des Zytokins in das umgebende Medium äußerten.
2. Die mit HCV-assoziierte, verstärkte Expression von VEGF wurde durch ein Maus-*Xenograft*-Modell mit der Tumorentwicklung korreliert. *Xenotumore*, die aus einer Zelllinie entstanden waren, die eine replizierende HCV-RNA persistent enthielten, wiesen eine verstärkte Neovaskularisierung, weniger nekrotisches Gewebe und eine erhöhte Expression von VEGF auf, verglichen mit Tumoren, die aus HCV-freien Huh7-Zellen entstanden waren.
3. In Zellen, die transient HCV-RNA replizieren, wurde die VEGF-mRNA langsamer degradiert, d.h. die Halbwertszeit war ca. zweifach erhöht. Diese posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA, war unabhängig von oxidativem Stress und konnte in Zellen, die mit einem WNV-Replikon transfiziert wurden nicht detektiert werden. Ebenso konnte in der persistenten HCV-Zelllinie trotz HCV-RNA-Replikation keine Stabilisierung der VEGF-mRNA detektiert werden.
4. Separat in Huh7-Zellen exprimierte HCV-Proteine hatten keinen Einfluss auf die Halbwertszeit der VEGF-mRNA.
5. Die mit der HCV-Replikation assoziierte, posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA erfolgte für alle VEGF-Isoformen gleichermaßen und war abhängig von der Präsenz replizierender HCV-RNA.
6. Eine generelle posttranskriptionelle Stabilisierung zellulärer mRNAs mit interner Ribosomenbindestelle (IRES), welche durch die Replikation von HCV-RNA induziert werden kann, konnte nicht abgeleitet werden.
7. Durch Depletions- und Inhibitor-Studien konnte gezeigt werden, dass die mit der HCV-Replikation assoziierte, posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA unabhängig von HIF1 α war.

8. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde gezeigt, dass die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA mit dem Auftreten von zytoplasmatischen SG korrelierte. Durch nachfolgende Depletionsanalysen einzelner SG-Komponenten konnte TIA1 als ein Faktor der VEGF-mRNA-Stabilisierung identifiziert werden. Allerdings konnte keine Indikation für eine generelle Rolle von SGs bei der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA gefunden werden, da durch die Behandlung naiver Huh7-Zellen oder der HCV-Zelllinie mit Arsenatreagenz bzw. die Transfektion von WNV-RNA ebenfalls die Bildung von SGs induziert wurde, jedoch nicht die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA.
9. Durch die Expression der kurzen TIA1-Isoform (FLAG-TIA1vl) wurde die posttranskriptionelle Stabilisierung der VEGF-mRNA in HCV-RNA replizierenden Zellen verstärkt. Zudem konnte in der persistenten HCV-Zelllinie die Stabilisierung der VEGF-mRNA durch Expression von FLAG-TIA1vl kurzzeitig rekonstituiert werden, nicht jedoch die Assemblierung von SGs. In Huh7-Zellen oder mit WNV-RNA transfizierten Zellen hatte die Expression von FLAG-TIA1vl keine Auswirkung auf die Degradation der VEGF-mRNA.
10. Phosphorylierungsstudien zeigten, dass TIA1 *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert werden kann. Auswirkungen des Phosphorylierungsstatus von TIA1vl auf eine mögliche Rolle bei der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA konnten nicht eindeutig geklärt werden.
11. Der Nachweis putativer Interaktionspartner von TIA1vl wurde durch Immunpräzipitation und Massenspektrometrie des gereinigten FLAG-TIA1vl durchgeführt. In Huh7-Zellen sowie der HCV-Zelllinie wurden 98 putativer Interaktionspartner identifiziert. Davon wurden 20 Proteine mittels siRNA-vermittelter Depletion hinsichtlich einer Funktion bei der HCV-assoziierten, posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA, untersucht. Dabei wurden 7 Proteine (JAK1, hnRNPK, hnRNPM, IGF2BP1, STK38, S10A9, SFPQ) identifiziert, die eine ähnliche Funktion wie TIA1 bei der posttranskriptionellen Stabilisierung der VEGF-mRNA haben und eines (STAU1), dass bei der zellulären Adaptation der persistenten HCV-Zelllinie involviert sein könnte. Eine mögliche Hypothese ist daher, dass diese Faktoren Teile eines RNP-Komplexes sind, der unter den spezifischen Bedingungen einer HCV-Infektion die VEGF-mRNA posttranskriptionell stabilisiert.

6 Literaturverzeichnis

- Abe, M., Koga, H., Yoshida, T., Masuda, H., Iwamoto, H., Sakata, M., Hanada, S., Nakamura, T., Taniguchi, E., Kawaguchi, T., Yano, H., Torimura, T., Ueno, T. & Sata, M. (2012). Hepatitis C virus core protein upregulates the expression of vascular endothelial growth factor via the nuclear factor-kappaB/hypoxia-inducible factor-1 alpha axis under hypoxic conditions. *Hepatol Res* **42**, 591-600.
- Abraham, S. M. & Clark, A. R. (2006). Dual-specificity phosphatase 1: a critical regulator of innate immune responses. *Biochem Soc Trans* **34**, 1018-23.
- Ahlquist, P., Noueiry, A. O., Lee, W. M., Kushner, D. B. & Dye, B. T. (2003). Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* **77**, 8181-6.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
- Akiri, G., Nahari, D., Finkelstein, Y., Le, S. Y., Elroy-Stein, O. & Levi, B. Z. (1998). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene* **17**, 227-36.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. *Garland Science New York 4th edition*
- Ali, N. & Siddiqui, A. (1997). The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates ires-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2249-54.
- Ancelin, M., Buteau-Lozano, H., Meduri, G., Osborne-Pellegrin, M., Sordello, S., Plouet, J. & Perrot-Appinat, M. (2002). A dynamic shift of VEGF isoforms with a transient and selective progesterone-induced expression of VEGF189 regulates angiogenesis and vascular permeability in human uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6023-8.
- Anderson, P. & Kedersha, N. (2002a). Stressful initiations. *J Cell Sci* **115**, 3227-34.
- Anderson, P. & Kedersha, N. (2002b). Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* **7**, 213-21.
- Anderson, P. & Kedersha, N. (2006). RNA granules. *J Cell Biol* **172**, 803-8.
- Anderson, P. & Kedersha, N. (2008). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci* **33**, 141-50.
- Appel, N., Pietschmann, T. & Bartenschlager, R. (2005). Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol* **79**, 3187-94.
- Arcondeguy, T., Lacazette, E., Millevoi, S., Prats, H. & Touriol, C. (2013). VEGF-A mRNA processing, stability and translation. *Nucleic Acids Res* **41**, 7997-8010.
- Arimoto, K., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Saito, H. & Takekawa, M. (2008). Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat Cell Biol* **10**, 1324-32.
- Ariumi, Y., Kuroki, M., Kushima, Y., Osugi, K., Hijikata, M., Maki, M., Ikeda, M. & Kato, N. (2011). Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J Virol* **85**, 6882-92.
- Arnaud, N., Dabo, S., Maillard, P., Budkowska, A., Kalliampakou, K. I., Mavromara, P., Garcin, D., Hugon, J., Gatignol, A., Akazawa, D., Wakita, T. & Meurs, E. F. (2010). Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. *PLoS One* **5**, e10575.
- Au, W. C., Moore, P. A., Lowther, W., Juang, Y. T. & Pitha, P. M. (1995). Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11657-61.
- Baird, S. D., Turcotte, M., Korneluk, R. G. & Holcik, M. (2006). Searching for IRES. *RNA* **12**, 1755-85.
- Bartenschlager, R. & Lohmann, V. (2000). Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* **14**, 241-54.
- Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J. & Jacobsen, H. (1993). Nonstructural protein 3 of the HCV encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol* **67**, 3835-44.
- Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2005). Efficient HCV cell culture system: What a difference the host cell makes. *PNAS* **102**, 9739-9740.
- Bass, B. L. (1997). RNA editing and hypermutation by adenosine deamination. *Trends Biochem Sci* **22**, 157-62.
- Bass, B. L. (2002). RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu Rev Biochem* **71**, 817-46.
- Beck, A. R., Medley, Q. G., O'Brien, S., Anderson, P. & Streuli, M. (1996). Structure, tissue distribution and genomic organization of the murine RRM-type RBPs TIA-1 and TIAR. *Nucleic Acids Res* **24**, 3829-35.
- Beckham, C. J. & Parker, R. (2008). P bodies, stress granules, and viral life cycles. *Cell Host Microbe* **3**, 206-12.

- Been, M. D. & Wickham, G. S. (1997). Self-cleaving ribozymes of hepatitis delta virus RNA. *Eur J Biochem* **247**, 741-53.
- Behrens, S. E., Grassmann, C. W., Thiel, H. J., Meyers, G. & Tautz, N. (1998). Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol* **72**, 2364-72.
- Behrens, S. E., Tomei, L. & De Francesco, R. (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* **15**, 12-22.
- Bell, J. L., Wachter, K., Muhleck, B., Pazaitis, N., Kohn, M., Lederer, M. & Huttelmaier, S. (2013). Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins: post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cell Mol Life Sci* **70**, 2657-75.
- Berger, A. & Strub, K. (2011). Multiple Roles of Alu-Related Noncoding RNAs. *Prog Mol Subcell Biol* **51**, 119-46.
- Bisikirska, B. C., Adam, S. J., Alvarez, M. J., Rajbhandari, P., Cox, R., Lefebvre, C., Wang, K., Rieckhof, G. E., Felsher, D. W. & Califano, A. (2013). STK38 is a critical upstream regulator of MYC's oncogenic activity in human B-cell lymphoma. *Oncogene* **32**, 5283-91.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. & Rouille, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **80**, 6964-72.
- Bley, N., Lederer, M., Pfalz, B., Reinke, C., Fuchs, T., Glass, M., Moller, B. & Huttelmaier, S. (2015). Stress granules are dispensable for mRNA stabilization during cellular stress. *Nucleic Acids Res* **43**, e26.
- Blight, K. J., McKeating, J. A., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. (2003). Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol* **77**, 3181-90.
- Bluyssen, A. R., Durbin, J. E. & Levy, D. E. (1996). ISGF3 gamma p48, a specificity switch for interferon activated transcription factors. *Cytokine Growth Factor Rev* **7**, 11-7.
- Bomsztyk, K., Denisenko, O. & Ostrowski, J. (2004). hnRNP K: 1 protein multiple processes. *Bioessays* **26**, 629-38.
- Brenndorfer, E. D. & Sallberg, M. (2012b). Hepatitis C virus-mediated modulation of cellular immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **60**, 315-29.
- Brenndorfer, E. D., Brass, A., Soderholm, J., Frelin, L., Aleman, S., Bode, J. G. & Sallberg, M. (2012a). Hepatitis C virus non-structural 3/4A protein interferes with intrahepatic interferon-gamma production. *Gut* **61**, 589-96.
- Brown, E. A., Zhang, H., Ping, L. H. & Lemon, S. M. (1992). Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res* **20**, 5041-5.
- Buchan, J. R. & Parker, R. (2009). Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* **36**, 932-41.
- Buchan, J. R., Yoon, J. H. & Parker, R. (2011). Stress-specific composition, assembly and kinetics of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **124**, 228-39.
- Buehner, M., Ford, G. C., Moras, D., Olsen, K. W. & Rossman, M. G. (1973). D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: three-dimensional structure and evolutionary significance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 3052-4.
- Calisher, C. H. & Gould, E. A. (2003). Taxonomy of the virus family Flaviviridae. *Adv Virus Res* **59**, 1-19.
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* **69 Suppl 3**, 4-10.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Eberhardt, C., Moons, L., Risau, W. & Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-9.
- Carney, D. S. & Gale, M. (2006). HCV Regulation of Host Defense. In *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology* (ed. S. L. Tan): Norfolk (UK).
- Caruthers, J. M. & McKay, D. B. (2002). Helicase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 123-33.
- Cerny, A. & Chisari, F. V. (1999). Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* **30**, 595-601.
- Chalfie, M. (1995). Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol* **62**, 651-6.
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R. & Rice, C. M. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* **44**, 649-88.
- Chen, M. & Manley, J. L. (2009). Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 741-54.
- Chen, Z., Benureau, Y., Rijnbrand, R., Yi, J., Weinman, S. A., Lemon, S. M., Martin, A. & Li, K. (2007). GB virus B disrupts RIG-I signaling by NS3/4A-mediated cleavage of the adaptor protein MAVS. *J Virol* **81**, 964-76.
- Chi, H., Barry, S. P., Roth, R. J. & Flavell, R. A. (2006). Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2274-9.
- Choi, H. S., Hwang, C. K., Song, K. Y., Wei, L. N. & Loh, H. H. (2009). Poly(C)-binding proteins as transcriptional regulators of gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **380**, 431-6.

- Chomczynski, P. & Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M.** (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359-62.
- Chun, Y. S., Kim, M. S. & Park, J. W.** (2002). Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1 α . *J Korean Med Sci* **17**, 581-8.
- Claffey, K. P., Shih, S. C., Mullen, A., Cusick, J. L., Abrams, K. R., Lee, S. W. & Detmar, M.** (1998). Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. *Mol Biol Cell* **9**, 469-81.
- Clemens, M. J. & Elia, A.** (1997). The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res* **17**, 503-24.
- Clemens, M. J.** (2001). Initiation factor eIF2 α phosphorylation in stress responses and apoptosis. *Prog Mol Subcell Biol* **27**, 57-89.
- Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L. W., Neufeld, G. & Levi, B. Z.** (1996). Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **271**, 736-41.
- Coito, C., Diamond, D. L., Neddermann, P., Korth, M. J. & Katze, M. G.** (2004). High-throughput screening of the yeast kinome: identification of human serine/threonine protein kinases that phosphorylate the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol* **78**, 3502-13.
- Cok, S. J., Acton, S. J. & Morrison, A. R.** (2003). The proximal region of the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 is recognized by a multimeric protein complex containing HuR, TIA-1, TIAR, and the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U. *J Biol Chem* **278**, 36157-62.
- Colter, J. S., Brown, R. A. & Ellem, K. A.** (1962). Observations on the use of phenol for the isolation of deoxyribonucleic acid. *Biochim Biophys Acta* **55**, 31-9.
- Cornils, H., Stegert, M. R., Hergovich, A., Hynx, D., Schmitz, D., Dirnhofer, S. & Hemmings, B. A.** (2010). Ablation of the kinase NDR1 predisposes mice to the development of T cell lymphoma. *Sci Signal* **3**, ra47.
- Courtney, S. C., Scherbik, S. V., Stockman, B. M. & Brinton, M. A.** (2012). West Nile virus infections suppress early viral RNA synthesis and avoid inducing the cell stress granule response. *J Virol* **86**, 3647-57.
- Croce, K., Gao, H., Wang, Y., Mooroka, T., Sukhova, G. K., Hogg, N., Libby, P. & Simon, D. I.** (2009). Myeloid-related protein-8/14 is critical for the biological response to vascular injury. *Circulation* **120**, 427-36.
- Cruz-Gallardo, I., Aroca, A., Persson, C., Karlsson, B. G. & Diaz-Moreno, I.** (2013). RNA binding of TIA-1 C-terminal RNA recognition motif is modified by pH conditions. *J Biol Chem* **288**, 25986-94.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. & Stark, G. R.** (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-21.
- Daum, R., Roth, H. & Zachariou, Z.** (1994). Tumor infiltration of the vena cava in nephroblastoma. *Eur J Pediatr Surg* **4**, 16-20.
- de Weerd, N. A., Samarajiwa, S. A. & Hertzog, P. J.** (2007). Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem* **282**, 20053-7.
- Degasperi, E. & Aghemo, A.** (2014). Sofosbuvir for the treatment of chronic hepatitis C: between current evidence and future perspectives. *Hepat Med* **6**, 25-33.
- Dejgaard, K., Leffers, H., Rasmussen, H. H., Madsen, P., Kruse, T. A., Gesser, B., Nielsen, H. & Celis, J. E.** (1994). Identification, molecular cloning, expression and chromosome mapping of a family of transformation upregulated hnRNP-K proteins derived by alternative splicing. *J Mol Biol* **236**, 33-48.
- Del Gatto-Konczak, F., Bourgeois, C. F., Le Guiner, C., Kister, L., Gesnel, M. C., Stevenin, J. & Breathnach, R.** (2000). The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site. *Mol Cell Biol* **20**, 6287-99.
- Delepierre, M., Van Heijenoort, C., Igolen, J., Pothier, J., Le Bret, M. & Roques, B. P.** (1989). Reassessment of structural characteristics of the d(CGCG)₂:actinomycin D complex from complete ¹H and ³¹P NMR. *J Biomol Struct Dyn* **7**, 557-89.
- Dember, L. M., Kim, N. D., Liu, K. Q. & Anderson, P.** (1996). Individual RNA recognition motifs of TIA-1 and TIAR have different RNA binding specificities. *J Biol Chem* **271**, 2783-8.
- Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. & Silverman, R. H.** (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15623-8.
- Dibbens, J. A., Miller, D. L., Damert, A., Risau, W., Vadas, M. A. & Goodall, G. J.** (1999). Hypoxic regulation of VEGF-mRNA stability requires the cooperation of multiple RNA elements. *Mol Biol Cell* **10**, 907-19.
- Diebold, S. S., Montoya, M., Unger, H., Roy, P., Al-Shamkhani, A., F., Borrow, P. & Reis e Sousa, C.** (2003). Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* **424**, 324-8.

- Dinh, P. X., Das, A., Franco, R. & Pattnaik, A. K. (2013). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K supports vesicular stomatitis virus replication by regulating cell survival and cellular gene expression. *J Virol* **87**, 10059-69.
- Dixon, D. A., Balch, G. C., Kedersha, N., Anderson, P., Zimmerman, G. A., Beauchamp, R. D. & Prescott, S. M. (2003). Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the translational silencer TIA-1. *J Exp Med* **198**, 475-81.
- Domingo, E., Martinez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J. C., Portela, A., Ortin, J., Lopez-Galindez, C., Perez-Brena, P., Villanueva, N., Najera, R. & et al. (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene* **40**, 1-8.
- Du, Z., Tong, X. & Ye, X. (2013). Cyclin D1 promotes cell cycle progression through enhancing NDR1/2 kinase activity independent of cyclin-dependent kinase 4. *J Biol Chem* **288**, 26678-87.
- Duong, F. H., Christen, V., Berke, J. M., Penna, S. H., Moradpour, D. & Heim, M. H. (2005). Upregulation of protein phosphatase 2Ac by hepatitis C virus modulates NS3 helicase activity through inhibition of protein arginine methyltransferase 1. *J Virol* **79**, 15342-50.
- Earl, P., Cooper, N., Wyatt, L., Moss, B., Carroll, M. (1998). Preparation of Cell Cultures and Vaccinia Virus Stocks. *Current Protocols in Molecular Biology supplement* **43**, 16.16.1-16.16.13
- Eckelman, B. P., Salvesen, G. S. & Scott, F. L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* **7**, 988-94.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Blum, H. E., Moradpour, D. & Bienz, K. (2002). Expression of HCV-proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**, 5974-84.
- Egyhazi, E. (1974a). Actinomycin D and RNA transport. *Nature* **250**, 221-3.
- Egyhazi, E. (1974b). A tentative initiation inhibitor of chromosomal heterogeneous RNA synthesis. *J Mol Biol* **84**, 173-83.
- Egyhazi, E. (1976). Initiation inhibition and reinitiation of the synthesis of hnRNA in living cells. *Nature* **262**, 319-21.
- Ehrchen, J. M., Sunderkotter, C., Foell, D., Vogl, T. & Roth, J. (2009). The endogenous TLR4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol* **86**, 557-66.
- Elbarbary, R. A., Li, W., Tian, B. & Maquat, L. E. (2013). STAU1 binding 3' UTR IRALus complements nuclear retention to protect cells from PKR-mediated translational shutdown. *Genes Dev* **27**, 1495-510.
- Elcheva, I., Goswami, S., Noubissi, F. K. & Spiegelman, V. S. (2009). CRD-BP protects the coding region of betaTrCP1 mRNA from miR-183-mediated degradation. *Mol Cell* **35**, 240-6.
- Emara, M. M. & Brinton, M. A. (2007). Interaction of TIA-1/TIAR with WNV and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 9041-6.
- Emara, M. M., Liu, H., Davis, W. G. & Brinton, M. A. (2008). Mutation of mapped TIA-1/TIAR binding sites in the 3' terminal stem-loop of West Nile virus minus-strand RNA in an infectious clone negatively affects genomic RNA amplification. *J Virol* **82**, 10657-70.
- Enomoto, A., Kido, N., Ito, M., Morita, A., Matsumoto, Y., Takamatsu, N., Hosoi, Y. & Miyagawa, K. (2008). Negative regulation of MEKK1/2 signaling by serine-threonine kinase 38 (STK38). *Oncogene* **27**, 1930-8.
- Esteban, J. I., Sauleda, S. & Quer, J. (2008). The changing epidemiology of HCV infection in Europe. *J Hepatol* **48**, 148-62.
- Evans, M. J., von Hahn, T., Tschernhe, D. M., Syder, A. J., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D. & Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a HCV co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801-5.
- Feng, P., Wang, B. & Ren, E. C. (2008). Cyr61/CCN1 is a tumor suppressor in human hepatocellular carcinoma and involved in DNA damage response. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 98-109.
- Ferrara, N. & Bunting, S. (1996). VEGF, a specific regulator of angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **5**, 35-44.
- Ferrara, N. & Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* **18**, 4-25.
- Ferrara, N. (1999). VEGFr: molecular and biological aspects. *Microbiol Immunol* **237**, 1-30.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J. & Moore, M. W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439-42.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* **9**, 102-14.
- Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T. & Roth, J. (2007). S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* **81**, 28-37.
- Folkman, J. (1985). Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* **43**, 175-203.
- Folkman, J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* **82**, 4-6.

- Forch, P., Puig, O., Kedersha, N., Martinez, C., Granneman, S., Seraphin, B., Anderson, P. & Valcarcel, J. (2000). The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **6**, 1089-98.
- Forch, P., Puig, O., Martinez, C., Seraphin, B. & Valcarcel, J. (2002). The splicing regulator TIA-1 interacts with U1-C to promote U1 snRNP recruitment to 5' splice sites. *EMBO J* **21**, 6882-92.
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D. & Semenza, G. L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* **16**, 4604-13.
- Foy, E., Li, K., Sumpter, R., Jr., Loo, Y. M., Johnson, C. L., Wang, C., Fish, P. M., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M. & Gale, M., Jr. (2005). Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2986-91.
- Fujimura, K., Kano, F. & Murata, M. (2008). Identification of PCBP2, a facilitator of IRES-mediated translation, as a novel constituent of stress granules and processing bodies. *RNA* **14**, 425-31.
- Galabru, J. & Hovanessian, A. (1987). Autophosphorylation of the protein kinase dependent on double-stranded RNA. *J Biol Chem* **262**, 15538-44.
- Gale, M. J., Jr., Korth, M. J. & Katze, M. G. (1998b). Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diagn Virol* **10**, 157-62.
- Gale, M. J., Jr., Korth, M. J., Tang, N. M., Tan, S. L., Hopkins, D. A., Dever, T. E., Polyak, S. J., Gretch, D. R. & Katze, M. G. (1997). Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* **230**, 217-27.
- Gale, M., Jr. & Katze, M. G. (1998). Molecular mechanisms of interferon resistance mediated by viral-directed inhibition of PKR, the interferon-induced protein kinase. *Pharmacol Ther* **78**, 29-46.
- Gale, M., Jr., Blakely, C. M., Kwieciszewski, B., Tan, S. L., Dossett, M., Korth, M. J., Polyak, S. J., Gretch, D. R. & Katze, M. G. (1998a). Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* **18**, 5208-18.
- Gao, L., Aizaki, H., He, J. W. & Lai, M. M. (2004). Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of HCV RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* **78**, 3480-8.
- Garaigorta, U. & Chisari, F. V. (2009). Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host Microbe* **6**, 513-22.
- Garaigorta, U., Heim, M. H., Boyd, B., Wieland, S. & Chisari, F. V. (2012). Hepatitis C virus (HCV) induces formation of stress granules whose proteins regulate HCV RNA replication and virus assembly and egress. *J Virol* **86**, 11043-56.
- Garneau, N. L., Wilusz, J. & Wilusz, C. J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell* **8**, 113-26.
- Gasparini, G. (2000). Prognostic value of vegf in breast cancer. *Oncologist* **5 Suppl 1**, 37-44.
- Gebhardt, C., Nemeth, J., Angel, P. & Hess, J. (2006). S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol* **72**, 1622-31.
- Gerlach, J. T., Diepolder, H. M., Zachoval, R., Gruener, N. H., Jung, M. C., Ulsenheimer, A., Schraut, W. W., Schirren, C. A., Waechter, M., Backmund, M. & Pape, G. R. (2003). Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* **125**, 80-8.
- Ghavami, S., Eshragi, M., Ande, S. R., Chazin, W. J., Klonisch, T., Halayko, A. J., McNeill, K. D., Hashemi, M., Kerkhoff, C. & Los, M. (2010). S100A8/A9 induces autophagy and apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes that involves BNIP3. *Cell Res* **20**, 314-31.
- Ghavami, S., Rashedi, I., Dattilo, B. M., Eshraghi, M., Chazin, W. J., Hashemi, M., Wesselborg, S., Kerkhoff, C. & Los, M. (2008). S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway. *J Leukoc Biol* **83**, 1484-92.
- Gil, J. & Esteban, M. (2000). Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* **5**, 107-14.
- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L. M. & Anderson, P. (2004). Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell* **15**, 5383-98.
- Gleghorn, M. L., Gong, C., Kielkopf, C. L. & Maquat, L. E. (2013). Staufen1 dimerizes through a conserved motif and a degenerate dsRNA-binding domain to promote mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 515-24.
- Gong, C. & Maquat, L. E. (2011). lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature* **470**, 284-8.
- Gong, C., Tang, Y. & Maquat, L. E. (2013). mRNA-mRNA duplexes that autoelicit Staufen1-mediated mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 1214-20.

- Gong, G., Waris, G., Tanveer, R. & Siddiqui, A.** (2001). Human HCV NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9599-604.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Bienz, K. & Moradpour, D.** (2003). Identification of the HCV RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* **77**, 5487-92.
- Gottschald, O. R., Malec, V., Krasteva, G., Hasan, D., Kamlah, F., Herold, S., Seeger, W. & Hanze, J.** (2010). TIAR and TIA-1 mRNA-binding proteins co-aggregate under conditions of rapid oxygen decline and extreme hypoxia and suppress the HIF-1alpha pathway. *J Mol Cell Biol* **2**, 345-56.
- Gozani, O., Patton, J. G. & Reed, R.** (1994). A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor PSF bind stably to pre-mRNA prior to catalytic step II of the splicing reaction. *EMBO J* **13**, 3356-67.
- Grakoui, A., McCourt, D., Feinstone, S. & Rice, C. M.** (1993a). Characterization of the HCV-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* **67**, 2832-43.
- Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M.** (1993b). A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10583-7.
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M.** (1993c). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* **67**, 1385-95.
- Grassmann, C. W., Yu, H., Isken, O. & Behrens, S. E.** (2005). Hepatitis C virus and the related bovine viral diarrhea virus considerably differ in the functional organization of the 5' non-translated region: implications for the viral life cycle. *Virology* **333**, 349-66.
- Griffin, S. D., Beales, L. P., Clarke, D. S., Jaeger, J., Harris, M. P. & Rowlands, D. J.** (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* **535**, 34-8.
- Gu, T. L., Cherry, J., Tucker, M., Wu, J., Reeves, C. & Polakiewicz, R. D.** (2010). Identification of activated Tnk1 kinase in Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* **24**, 861-5.
- Gutschner, T., Hammerle, M., Pazaitis, N., Bley, N., Fiskin, E., Uckelmann, H., Heim, A., Grobeta, M., Hofmann, N., Geffers, R., Skawran, B., Longerich, T., Breuhahn, K., Schirmacher, P., Muhleck, B., Huttelmaier, S. & Diederichs, S.** (2014). Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) is an important protumorigenic factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **59**, 1900-11.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Wardle, G. S., Dewell, S., Zavolan, M. & Tuschl, T.** (2010). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**, 129-41.
- Hamdollah Zadeh, M. A., Amin, E. M., Hoareau-Aveilla, C., Heesom, K. J., Salmon, A., Salmon, A. H., Oltean, S., Harper, S. J., Varey, A. H. & Bates, D. O.** (2015). Alternative splicing of TIA-1 in human colon cancer regulates VEGF isoform expression, angiogenesis, tumour growth and bevacizumab resistance. *Mol Oncol* **9**, 167-78.
- Hanahan, D. & Folkman, J.** (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353-64.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-74.
- Haque, S. J. & Williams, B. R.** (1994). Identification and characterization of an IFN-stimulated response element-IFN-stimulated gene factor 3-independent signaling pathway for IFN-alpha. *J Biol Chem* **269**, 19523-9.
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. & Ron, D.** (2000a). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* **6**, 1099-108.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. & Ron, D.** (2000b). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* **5**, 897-904.
- Hassan, M., Selimovic, D., Ghozlan, H. & Abdel-kader, O.** (2009). Hepatitis C virus core protein triggers hepatic angiogenesis by a mechanism including multiple pathways. *Hepatology* **49**, 1469-82.
- He, X. S.** (2006). Regulation of Adaptive Immunity by HCV. In *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology* (ed. S. L. Tan): Norfolk (UK).
- Heinz, F. X. & Allison, S. L.** (2000). Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Adv Virus Res* **55**, 231-69.
- Helaly, G. F. & Abou Shamaa, L. A.** (2006). Influence of HCV infection on circulating levels of sICAM-1 and VEGF in patients with hepatitis C and HCC and their role in enhancing detection of HCC. *Egypt J Immunol* **13**, 27-38.
- Hellen, C. U. & Sarnow, P.** (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* **15**, 1593-612.
- Hermani, A., De Servi, B., Tessier, P. A. & Mayer, D.** (2006). S100A8 and S100A9 activate MAPK and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. *Exp Cell Res* **312**, 184-97.
- Hershey, J. W.** (1991). Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* **60**, 717-55.

- Hijikata, M., Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., Kato, N., Kimura, K. & Shimotohno, K. (1993). Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10773-7.
- Hirasaki, S., Koide, N., Ujike, K., Shinji, T. & Tsuji, T. (2001). Expression of Nov, CYR61 and CTGF genes in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* **19**, 294-305.
- Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H. & Maru, Y. (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol* **8**, 1369-75.
- Honda, M., Ping, L. H., Rijnbrand, R. C., Amphlett, E., Clarke, B., Rowlands, D. & Lemon, S. M. (1996). Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* **222**, 31-42.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., Endres, S. & Hartmann, G. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-7.
- Horscroft, N., Bellows, D., Ansari, I., Lai, V. C., Dempsey, S., Liang, D., Donis, R., Zhong, W. & Hong, Z. (2005). Establishment of a subgenomic replicon for bovine viral diarrhoea virus in Huh-7 cells and modulation of interferon-regulated factor 3-mediated antiviral response. *J Virol* **79**, 2788-96.
- Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J. & Leung, D. W. (1991). The VEGF family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* **5**, 1806-14.
- Hovanessian, A. G. & Galabru, J. (1987). The double-stranded RNA-dependent protein kinase is also activated by heparin. *Eur J Biochem* **167**, 467-73.
- Hovhannisyann, R. H. & Carstens, R. P. (2007). Heterogeneous ribonucleoprotein m is a splicing regulatory protein that can enhance or silence splicing of alternatively spliced exons. *J Biol Chem* **282**, 36265-74.
- Hua, Z., Lv, Q., Ye, W., Wong, C. K., Cai, G., Gu, D., Ji, Y., Zhao, C., Wang, J., Yang, B. B. & Zhang, Y. (2006). MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS One* **1**, e116.
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M. & Bunn, H. F. (1998). Regulation of HIF1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7987-92.
- Huez, I., Creancier, L., Audigier, S., Gensac, M. C., Prats, A. C. & Prats, H. (1998). Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of VEGF mRNA. *Mol Cell Biol* **18**, 6178-90.
- Hugle, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H. G., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (2001). The HCV nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* **284**, 70-81.
- Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G. J., Condeelis, J. & Singer, R. H. (2005). Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**, 512-5.
- Ichikawa, M., Williams, R., Wang, L., Vogl, T. & Srikrishna, G. (2011). S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression. *Mol Cancer Res* **9**, 133-48.
- Ikeda, E., Achen, M. G., Breier, G. & Risau, W. (1995). Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* **270**, 19761-6.
- Isaacs, A. & Lindenmann, J. (1957a). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**, 258-67.
- Isaacs, A., Lindenmann, J. & Valentine, R. C. (1957b). Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**, 268-73.
- Isken, O., Baroth, M., Grassmann, C. W., Weinlich, S., Ostareck, D. H., Ostareck-Lederer, A. & Behrens, S. E. (2007). Nuclear factors are involved in hepatitis C virus RNA replication. *RNA* **13**, 1675-92.
- Isken, O., Grassmann, C. W., Sarisky, R. T., Kann, M., Zhang, S., Grosse, F., Kao, P. N. & Behrens, S. E. (2003). Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus. *EMBO J* **22**, 5655-65.
- Ivashkina, N., Wolk, B., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Penin, F. & Moradpour, D. (2002). The HCV RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *J Virol* **76**, 13088-93.
- Iwasaki, A. & Medzhitov, R. (2004). TLR control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**, 987-95.
- Izquierdo, J. M., Majos, N., Bonnal, S., Martinez, C., Castelo, R., Bilbao, D. & Valcarcel, J. (2005). Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Mol Cell* **19**, 475-84.
- Izquierdo, J. M. & Valcarcel, J. (2007). Two isoforms of the T-cell intracellular antigen 1 splicing factor display distinct splicing regulation activities. Control of isoform ratio by TIA-1-related protein. *J Biol Chem* **282**, 19410-7.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 113-27.
- Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216.

- Jones, C. T., Catanese, M. T., Law, L. M., Khetani, S. R., Syder, A. J., Ploss, A., Oh, T. S., Schoggins, J. W., MacDonald, M. R., Bhatia, S. N. & Rice, C. M. (2010). Real-time imaging of hepatitis C virus infection using a fluorescent cell-based reporter system. *Nat Biotechnol* **28**, 167-71.
- Jung, Y. J., Isaacs, J. S., Trepel, J. & Neckers, L. (2003). IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J* **17**, 2115-7.
- Kallio, P. J., Wilson, W. J., O'Brien, S., Makino, Y. & Poellinger, L. (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **274**, 6519-25.
- Kang, D. C., Gopalkrishnan, R. V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A. M. & Fisher, P. B. (2002). mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 637-42.
- Kassel, O., Sancono, A., Kratzschmar, J., Kreft, B., Stassen, M. & Cato, A. C. (2001). Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J* **20**, 7108-16.
- Kato, N., Nakamura, T., Dansako, H., Namba, K., Abe, K., Naka, K., Ikeda, M. & Shimotohno, K. (2005). Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J Gen Virol* **86**, 645-56.
- Kato, N., Sugiyama, K., Namba, K., Dansako, H., Nakamura, T., Takami, M., Naka, K., Nozaki, A. & Shimotohno, K. (2003a). Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 756-66.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M. & Wakita, T. (2003b). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* **125**, 1808-17.
- Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T. & Wakita, T. (2001). Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol* **64**, 334-9.
- Kawai, T., Lal, A., Yang, X., Galban, S., Mazan-Mamczarz, K. & Gorospe, M. (2006). Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR. *Mol Cell Biol* **26**, 3295-307.
- Kawakami, A., Tian, Q., Streuli, M., Poe, M., Edelhoff, S., Disteche, C. M. & Anderson, P. (1994). Intron-exon organization and chromosomal localization of the human TIA-1 gene. *J Immunol* **152**, 4937-45.
- Kedersha, N. & Anderson, P. (2002). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* **30**, 963-9.
- Kedersha, N. & Anderson, P. (2007). Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol* **431**, 61-81.
- Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I. & Anderson, P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* **147**, 1431-42.
- Kedersha, N., Chen, S., Stahl, J. & Anderson, P. (2002). Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell* **13**, 195-210.
- Kedersha, N., Cho, M. R., Li, W., Yacono, P. W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D. E. & Anderson, P. (2000). Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol* **151**, 1257-68.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Golan, D. E. & Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* **169**, 871-84.
- Kessler, D. S., Veals, S. A., Fu, X. Y. & Levy, D. E. (1990). Interferon-alpha regulates nuclear translocation and DNA-binding affinity of ISGF3, a multimeric transcriptional activator. *Genes Dev* **4**, 1753-65.
- Keyse, S. M. & Emslie, E. A. (1992). Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature* **359**, 644-7.
- Khapersky, D. A., Hatchette, T. F. & McCormick, C. (2012). Influenza A virus inhibits cytoplasmic stress granule formation. *FASEB J* **26**, 1629-39.
- Khromykh, A. A. & Westaway, E. G. (1997). Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J Virol* **71**, 1497-505.
- Kim, Y. K., Furic, L., Parisien, M., Major, F., DesGroseillers, L. & Maquat, L. E. (2007). Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *EMBO J* **26**, 2670-81.
- Kim, U. & Nishikura, K. (1993). Double-stranded RNA adenosine deaminase as a potential mammalian RNA editing factor. *Semin Cell Biol* **4**, 285-93.
- Kim, Y. K., Furic, L., DesGroseillers, L. & Maquat, L. E. (2005). Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* **120**, 195-208.
- Kireeva, M. L., Mo, F. E., Yang, G. P. & Lau, L. F. (1996). Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol Cell Biol* **16**, 1326-34.

- Knott, G. J., Bond, C. S. & Fox, A. H.** (2016). The DBHS proteins SFPQ, NONO and PSPC1: a multipurpose molecular scaffold. *Nucleic Acids Res* **44**, 3989-4004.
- Koba, M. & Konopa, J.** (2005). [Actinomycin D and its mechanisms of action]. *Postepy Hig Med Dosw* **59**, 290-8.
- Kolykhalov, A. A., Mihalik, K., Feinstone, S. M. & Rice, C. M.** (2000). Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* **74**, 2046-51.
- Komar, A. A. & Hatzoglou, M.** (2011). Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle* **10**, 229-40.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Lohmann, V., Pietschmann, T. & Bartenschlager, R.** (2006). Characterization of the early steps of HCV infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* **80**, 5308-20.
- Kraut, J.** (1977). Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu Rev Biochem* **46**, 331-58.
- Krieger, N., Lohmann, V., Bartenschlager, R.** (2001). Enhancement of Hepatitis C Virus RNA Replication by Cell Culture-Adaptive Mutations. *J Virol* **75**, 4614-4624.
- Kumar, A., Haque, J., Hiscott, J. & Williams, B. R.** (1994). Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6288-92.
- Kumar, A., Ray, U. & Das, S.** (2013). Human La protein interaction with GCAC near the initiator AUG enhances HCV RNA replication by promoting linkage between 5' and 3' untranslated regions. *J Virol* **87**, 6713-26.
- Kuwano, Y., Kim, H. H., Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Jr., Martindale, J. L., Yang, X. & Gorospe, M.** (2008). MKP-1 mRNA stabilization and translational control by RNA-binding proteins HuR and NF90. *Mol Cell Biol* **28**, 4562-75.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-9.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Larcher, F., Murillas, R., Conti, C. J. & Jorcano, J. L.** (1998). VEGF/VPF overexpression in skin of transgenic mice induces angiogenesis, vascular hyperpermeability and accelerated tumor development. *Oncogene* **17**, 303-11.
- Lavanchy, D.** (2011). Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* **17**, 107-15.
- Le Guiner, C., Lejeune, F., Galiana, D., Kister, L., Breathnach, R., Stevenin, J. & Del Gatto-Konczak, F.** (2001). TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs. *J Biol Chem* **276**, 40638-46.
- Leeds, P., Kren, B. T., Boylan, J. M., Betz, N. A., Steer, C. J., Gruppuso, P. A. & Ross, J.** (1997). Developmental regulation of CRD-BP, an RNA-binding protein that stabilizes c-myc mRNA in vitro. *Oncogene* **14**, 1279-86.
- Lemm, I. & Ross, J.** (2002). Regulation of c-myc mRNA decay by translational pausing in a coding region instability determinant. *Mol Cell Biol* **22**, 3959-69.
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. & Ferrara, N.** (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1306-9.
- Levy, N. S., Chung, S., Furneaux, H. & Levy, A. P.** (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* **273**, 6417-23.
- Li, J., Gorospe, M., Hutter, D., Barnes, J., Keyse, S. M. & Liu, Y.** (2001). Transcriptional induction of MKP-1 in response to stress is associated with histone H3 phosphorylation-acetylation. *Mol Cell Biol* **21**, 8213-24.
- Li, J., Perrella, M. A., Tsai, J. C., Yet, S. F., Hsieh, C. M., Yoshizumi, M., Patterson, C., Endege, W. O., Zhou, F. & Lee, M. E.** (1995). Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* **270**, 308-12.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C., Ikeda, M., Ray, S. C., Gale, M., Jr. & Lemon, S. M.** (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2992-7.
- Li, W., Li, Y., Kedersha, N., Anderson, P., Emara, M., Swiderek, K. M., Moreno, G. T. & Brinton, M. A.** (2002). Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *J Virol* **76**, 11989-2000.
- Li, Y., Masaki, T., Shimakami, T. & Lemon, S. M.** (2014). hnRNP L and NF90 interact with hepatitis C virus 5'-terminal untranslated RNA and promote efficient replication. *J Virol* **88**, 7199-209.
- Lin, K. J., Lin, T. M., Wang, C. H., Liu, H. C., Lin, Y. L. & Eng, H. L.** (2013). Down-regulation of Toll-like receptor 7 expression in hepatitis-virus-related human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* **44**, 534-41.

- Lin, W., Kim, S. S., Yeung, E., Kamegaya, Y., Holtzman, M. J. & Chung, R. T. (2006). Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *J Virol* **80**, 9226-35.
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Tellinghuisen, T. L., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**, 623-6.
- Lindenbach, B.D., Thiel, H.-J., Rice, C.M. (2006). Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virology, Lippincott Williams & Wilkins, NY 5th edition*, Chapter 33.
- Liu, L. X., Lu, H., Luo, Y., Date, T., Belanger, A. J., Vincent, K. A., Akita, G. Y., Goldberg, M., Cheng, S. H., Gregory, R. J. & Jiang, C. (2002). Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 908-14.
- Liu, Y., Cox, S. R., Morita, T. & Kourembanas, S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* **77**, 638-43.
- Lloyd, R. E. (2013). Regulation of SGs and PBs during RNA virus infection. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**, 317-31.
- Lohmann, V., Hoffmann, S., Herian, U., Penin, F. & Bartenschlager, R. (2003). Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J Virol* **77**, 3007-19.
- Lohmann, V., Korner, F., Dobierzewska, A. & Bartenschlager, R. (2001). Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* **75**, 1437-49.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**, 110-3.
- Lopez de Silanes, I., Galban, S., Martindale, J. L., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K., Indig, F. E., Falco, G., Zhan, M. & Gorospe, M. (2005). Identification and functional outcome of mRNAs associated with RNA-binding protein TIA-1. *Mol Cell Biol* **25**, 9520-31.
- Lorenz, I. C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T. G. & Rice, C. M. (2006). Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* **442**, 831-5.
- Loza, M. J. & Perussia, B. (2004). Differential regulation of NK cell proliferation by type I and type II IFN. *Int Immunol* **16**, 23-32.
- Luik, P., Chew, C., Aittoniemi, J., Chang, J., Wentworth, P., Jr., Dwek, R. A., Biggin, P. C., Venien-Bryan, C. & Zitzmann, N. (2009). The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12712-6.
- Macejak, D. G. & Sarnow, P. (1991). Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* **353**, 90-4.
- Macheroux, P., Schmidt, K. U., Steinerstauch, P., Ghisla, S., Colepicolo, P., Buntic, R. & Hastings, J. W. (1987). Purification of the yellow fluorescent protein from *Vibrio fischeri* and identity of the flavin chromophore. *Biochem Biophys Res Commun* **146**, 101-6.
- Machida, K., Cheng, K. T., Sung, V. M., Levine, A. M. & Lai, M. M. (2004). Hepatitis C virus induces a mutator phenotype: enhanced mutations of immunoglobulin and protooncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4262-7.
- Major, M. E. & Feinstone, S. M. (1997). The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* **25**, 1527-38.
- Malmgaard, L. (2004). Induction and regulation of IFN during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* **24**, 439-54.
- Malmgaard, L., Melchjorsen, J., Bowie, A. G., Mogensen, S. C. & Paludan, S. R. (2004). Viral activation of macrophages through TLR-dependent and -independent pathways. *J Immunol* **173**, 6890-8.
- Manabe, S., Fuke, I., Tanishita, O., Kaji, C., Gomi, Y., Yoshida, S., Mori, C., Takamizawa, A., Yosida, I. & Okayama, H. (1994). Production of nonstructural proteins of hepatitis C virus requires a putative viral protease encoded by NS3. *Virology* **198**, 636-44.
- Marie, I., Durbin, J. E. & Levy, D. E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J* **17**, 6660-9.
- Marie, I., Rebouillat, D. & Hovanessian, A. G. (1999). The expression of both domains of the 69/71 kDa 2',5'-OAS generates a catalytically active enzyme and mediates an anti-viral response. *Eur J Biochem* **262**, 155-65.
- Marko, M., Leichter, M., Patrinoiu-Georgoula, M. & Gualis, A. (2010). hnRNP M interacts with PSF and p54(nrb) and co-localizes within defined nuclear structures. *Exp Cell Res* **316**, 390-400.
- Martinez-Salas, E., Pineiro, D. & Fernandez, N. (2012). Alternative Mechanisms to Initiate Translation in Eukaryotic mRNAs. *Comp Funct Genomics* **2012**, 391546.
- Marusawa, H., Osaki, Y., Kimura, T., Ito, K., Yamashita, Y., Eguchi, T., Kudo, M., Yamamoto, Y., Kojima, H., Seno, H., Moriyasu, F. & Chiba, T. (1999). High prevalence of anti-hepatitis B virus serological markers in patients with hepatitis C virus related chronic liver disease in Japan. *Gut* **45**, 284-8.

- Masson, N. & Ratcliffe, P. J.** (2014). Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab* **2**, 3.
- Mazroui, R., Sukarieh, R., Bordeleau, M. E., Kaufman, R. J., Northcote, P., Tanaka, J., Gallouzi, I. & Pelletier, J.** (2006). Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol Biol Cell* **17**, 4212-9.
- McAllister, C. S. & Samuel, C. E.** (2009). The RNA-activated protein kinase enhances the induction of interferon-beta and apoptosis mediated by cytoplasmic RNA sensors. *J Biol Chem* **284**, 1644-51.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G. & Martoglio, B.** (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* **21**, 3980-8.
- Meares, G. P., Liu, Y., Rajbhandari, R., Qin, H., Nozell, S. E., Corbett, J. A. & Benveniste, E. N.** (2014). PERK Dependent Activation of JAK1 and STAT3 Contributes to ER Stress Induced Inflammation. *Mol Cell Biol*.
- Melton, D. A., Krieg, P., Zinn, K. & Green, M. R.** (1984). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res* **12**, 7035-56.
- Merquiol, E., Uzi, D., Mueller, T., Goldenberg, D., Xavier, R. J., Tirosh, B. & Shibolet, O.** (2011). HCV causes chronic ER stress leading to adaptation and interference with the unfolded protein response. *PLoS One* **6**, e24660.
- Micallef, J. M., Kaldor, J. M. & Dore, G. J.** (2006). Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat* **13**, 34-41.
- Michelotti, E. F., Michelotti, G. A., Aronsohn, A. I. & Levens, D.** (1996). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Mol Cell Biol* **16**, 2350-60.
- Mikula, M., Bomszyk, K., Chojnowski, K. & Ostrowski, J.** (2013). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K genome-wide binding survey reveals its role in regulating 3'-end RNA processing and transcription termination at the early growth response 1 gene through XRN2 exonuclease. *J Biol Chem* **288**, 24788-98.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U.** (2003). Molekulare Virologie. *Spektrum Verlag Heidelberg-Berlin*, **2. Auflage**
- Mokas, S., Mills, J. R., Garreau, C., Fournier, M. J., Robert, F., Arya, P., Kaufman, R. J., Pelletier, J. & Mazroui, R.** (2009). Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition. *Mol Biol Cell* **20**, 2673-83.
- Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H. E., Bartenschlager, R., Penin, F. & Lohmann, V.** (2004). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **78**, 13278-84.
- Moradpour, D., Penin, F. & Rice, C. M.** (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* **5**, 453-63.
- 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.** (1995). Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol* **69**, 5621-30.
- Murphy, L. D., Herzog, C. E., Rudick, J. B., Fojo, A. T. & Bates, S. E.** (1990). Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of mdr-1 gene expression. *Biochemistry* **29**, 10351-6.
- Nagy, P. D. & Pogany, J.** (2012). The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat Rev Microbiol* **10**, 137-49.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. & Sato, J.** (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* **42**, 3858-63.
- Nasimuzzaman, M., Waris, G., Mikolon, D., Stupack, D. G. & Siddiqui, A.** (2007). Hepatitis C virus stabilizes hypoxia-inducible factor 1alpha and stimulates the synthesis of vascular endothelial growth factor. *J Virol* **81**, 10249-57.
- Nemeth, J., Stein, I., Haag, D., Riehl, A., Longerich, T., Horwitz, E., Gebhardt, C., Schirmacher, P., Hahn, M., Ben-Neriah, Y., Pikarsky, E., Angel, P. & Hess, J.** (2009a). S100A8 and S100A9 are novel nuclear factor kappa B target genes during malignant progression of murine and human liver carcinogenesis. *Hepatology* **50**, 1251-62.
- Nemeth, J., Stein, I., Haag, D., Riehl, A., Horwitz, E., Breuhahn, K., Gebhardt, C., Schirmacher, P., Hahn, M., Ben-Neriah, Y., Pikarsky, E., Angel, P. & Hess, J.** (2009b). S100A8 and S100A9 are novel nuclear factor kappa B target genes during malignant progression of murine and human liver carcinogenesis. *Hepatology* **50**, 1251-62.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. & Poltorak, Z.** (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* **13**, 9-22.
- Neufeld, G., Tessler, S., Gitay-Goren, H., Cohen, T. & Levi, B. Z.** (1994). Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog Growth Factor Res* **5**, 89-97.
- Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J. & Perelson, A. S.** (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **282**, 103-7.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. & Hofschneider, P. H.** (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* **1**, 841-5.

- Nissen, N. N., Polverini, P. J., Koch, A. E., Gamelli, R. L. & DiPietro, L. A. (1998). Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* **152**, 1445-52.
- Niu, G., Wright, K. L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., Zhang, S., Wang, T., Sinibaldi, D., Coppola, D., Heller, R., Ellis, L. M., Karras, J., Bromberg, J., Pardoll, D., Jove, R. & Yu, H. (2002). Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* **21**, 2000-8.
- Nourbakhsh, M. & Hauser, H. (1997). The transcriptional silencer protein NRF: a repressor of NF-kappa B enhancers. *Immunobiology* **198**, 65-72.
- Novick, D., Cohen, B., Tal, N. & Rubinstein, M. (1995). Soluble and membrane-anchored forms of the human IFN-alpha/beta receptor. *J Leukoc Biol* **57**, 712-8.
- Ohn, T. & Anderson, P. (2010). The role of posttranslational modifications in the assembly of stress granules. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**, 486-93.
- Ohn, T., Kedersha, N., Hickman, T., Tisdale, S. & Anderson, P. (2008). A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat Cell Biol* **10**, 1224-31.
- Ohta, Y., Endo, Y., Tanaka, M., Shimizu, J., Oda, M., Hayashi, Y., Watanabe, Y. & Sasaki, T. (1996). Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* **2**, 1411-6.
- Okamoto, K., Moriishi, K., Miyamura, T. & Matsuura, Y. (2004). Intramembrane proteolysis and endoplasmic reticulum retention of hepatitis C virus core protein. *J Virol* **78**, 6370-80.
- Oleynikov, Y. & Singer, R. H. (2003). Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol* **13**, 199-207.
- Ostareck-Lederer, A. & Ostareck, D. H. (2012). Precision mechanics with multifunctional tools: how hnRNP K and hnRNPs E1/E2 contribute to post-transcriptional control of gene expression in hematopoiesis. *Curr Protein Pept Sci* **13**, 391-400.
- Otto, G. A. & Puglisi, J. D. (2004). The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* **119**, 369-80.
- Pang, P. S., Jankowsky, E., Planet, P. J. & Pyle, A. M. (2002). The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO J* **21**, 1168-76.
- Park, S. H., Kim, K. W., Lee, Y. S., Baek, J. H., Kim, M. S., Lee, Y. M., Lee, M. S. & Kim, Y. J. (2001). Hypoglycemia-induced VEGF expression is mediated by intracellular Ca²⁺ and protein kinase C signaling pathway in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Int J Mol Med* **7**, 91-6.
- Patel, R. C. & Sen, G. C. (1998). PACT, a protein activator of the IFN-induced protein kinase, PKR. *EMBO J* **17**, 4379-90.
- Patton, J. G., Porro, E. B., Galceran, J., Tempst, P. & Nadal-Ginard, B. (1993). Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev* **7**, 393-406.
- Pavlovic, D., Neville, D. C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R. A., Fischer, W. B. & Zitzmann, N. (2003). The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6104-8.
- Pelletier, J. & Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**, 320-5.
- Pestova, T. V. & Hellen, C. U. (2000). The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* **57**, 651-74.
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J. & Hellen, C. U. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* **12**, 67-83.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Pflugheber, J., Fredericksen, B., Sumpter, R., Jr., Wang, C., Ware, F., Sodora, D. L. & Gale, M., Jr. (2002). Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4650-5.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F. & Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997-1001.
- Pieczyk, M., Wax, S., Beck, A. R., Kedersha, N., Gupta, M., Krays, V., Streuli, M. & Anderson, P. (2000). TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *EMBO J* **19**, 4154-63.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. & Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938-41.
- Piotrowska, J., Hansen, S. J., Park, N., Jamka, K., Sarnow, P. & Gustin, K. E. (2010). Stable formation of compositionally unique stress granules in virus-infected cells. *J Virol* **84**, 3654-65.

- Polyak, S. J., Khabar, K. S., Paschal, D. M., Ezelle, H. J., Duverlie, G., Barber, G. N., Levy, D. E., Mukaida, N. & Gretch, D. R.** (2001). Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* **75**, 6095-106.
- Proud, C. G.** (1995). PKR: a new name and new roles. *Trends Biochem Sci* **20**, 241-6.
- Pyronnet, S., Pradayrol, L. & Sonenberg, N.** (2000). A cell cycle-dependent IRES. *Mol Cell* **5**, 607-16.
- Quentmeier, H., Pommerenke, C., Ammerpohl, O., Geffers, R., Rosati, E., Rosén, A., Hauer, V., MacLeod, R.A.F., Nagel, S., Zaborski, M., Drexler, H.G.** (2016). Subclones in B-lymphoma cell lines: isogenic models for the study of gene regulation. *Oncotarget* **7**, 63456-63465.
- Ramp, U., Krieg, T., Caliskan, E., Mahotka, C., Ebert, T., Willers, R., Gabbert, H. E. & Gerharz, C. D.** (2004). XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas. *Hum Pathol* **35**, 1 022-8.
- Randall, G., Panis, M., Cooper, J. D., Tellinghuisen, T. L., Sukhodolets, K. E., Pfeffer, S., Landgraf, P., Kan, S., Lindenbach, B. D., Brownstein, M. J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M., Tuschl, T. & Rice, C. M.** (2007). Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12884-9.
- Rastogi, R., Jiang, Z., Ahmad, N., Rosati, R., Liu, Y., Beuret, L., Monks, R., Charron, J., Birnbaum, M. J. & Samavati, L.** (2013). Rapamycin induces mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression through activation of protein kinase B and mitogen-activated protein kinase kinase pathways. *J Biol Chem* **288**, 33966-77.
- Ray, U. & Das, S.** (2011). Interplay between NS3 protease and human La protein regulates translation-replication switch of Hepatitis C virus. *Sci Rep* **1**, 1.
- Rebouillat, D. & Hovanessian, A. G.** (1999). The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 295-308.
- Reed, K. E., Xu, J. & Rice, C. M.** (1997). Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein in vitro and in vivo: properties of the NS5A-associated kinase. *J Virol* **71**, 7187-97.
- Reyes, R., Alcalde, J. & Izquierdo, J. M.** (2009). Depletion of T-cell intracellular antigen proteins promotes cell proliferation. *Genome Biol* **10**, R87.
- Ripoli, M., D'Aprile, A., Quarato, G., Sarasin-Filipowicz, M., Gouttenoire, J., Scrima, R., Cela, O., Boffoli, D., Heim, M. H., Moradpour, D., Capitanio, N. & Piccoli, C.** (2010). Hepatitis C virus-linked mitochondrial dysfunction promotes hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated glycolytic adaptation. *J Virol* **84**, 647-60.
- Riva, M., Kallberg, E., Bjork, P., Hancz, D., Vogl, T., Roth, J., Ivars, F. & Leanderson, T.** (2012). Induction of NF-kappaB responses by the S100A9 protein is Toll-like receptor-4-dependent. *Immunology* **137**, 172-82.
- RKI (Robert Koch Institut).** (2016). Informationstechnikzentrum Bund. http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/H/HepatitisC/HepatitisC.html?cms_box=1&cms_current=Hepatitis+C&cms_lv2=2389780
- Robinson, C. J. & Stringer, S. E.** (2001). The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* **114**, 853-65.
- Roth, J., Vogl, T., Sunderkotter, C. & Sorg, C.** (2003). Chemotactic activity of S100A8 and S100A9. *J Immunol* **171**, 5651.
- Rubtsova, M. P., Sizova, D. V., Dmitriev, S. E., Ivanov, D. S., Prassolov, V. S. & Shatsky, I. N.** (2003). Distinctive properties of the 5'-untranslated region of human hsp70 mRNA. *J Biol Chem* **278**, 22350-6.
- Ruggieri, A., Dazert, E., Metz, P., Hofmann, S., Bergeest, J. P., Mazur, J., Hiet, M. S., Kallis, S., Alvisi, G., Samuel, C. E., Lohmann, V., Frese, M., Stoecklin, G. & Bartenschlager, R.** (2012). Dynamic oscillation of translation and stress granule formation mark the cellular response to virus infection. *Cell Host Microbe* **12**, 71-85.
- Saito, K., Chen, S., Piecyk, M. & Anderson, P.** (2001). TIA-1 regulates the production of tumor necrosis factor alpha in macrophages, but not in lymphocytes. *Arthritis Rheum* **44**, 2879-87.
- Saito, T. & Gale, M., Jr.** (2008). Regulation of innate immunity against HCV infection. *Hepatol Res* **38**, 115-22.
- Sakai, A., Claire, M. S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Bukh, J.** (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11646-51.
- Sakatsume, M., Igarashi, K., Winestock, K. D., Garotta, G., Larner, A. C. & Finbloom, D. S.** (1995). The Jak kinases differentially associate with the alpha and beta (accessory factor) chains of the interferon gamma receptor to form a functional receptor unit capable of activating STAT transcription factors. *J Biol Chem* **270**, 17528-34.
- Salceda, S. & Caro, J.** (1997). Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* **272**, 22642-7.
- Salojin, K. V., Owusu, I. B., Millerchip, K. A., Potter, M., Platt, K. A. & Oravec, T.** (2006). Essential role of MAPK phosphatase-1 in the negative control of innate immune responses. *J Immunol* **176**, 1899-907.

- Salven, P., Ruotsalainen, T., Mattson, K. & Joensuu, H. (1998). High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. *Int J Cancer* **79**, 144-6.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York* 2nd edition
- Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**, 778-809, table of contents.
- Sanchez-Jimenez, C., Carrascoso, I., Barrero, J. & Izquierdo, J. M. (2013). Identification of a set of miRNAs differentially expressed in transiently TIA-depleted HeLa cells by genome-wide profiling. *BMC Mol Biol* **14**, 4.
- Sarcar, B., Ghosh, A. K., Steele, R., Ray, R. & Ray, R. B. (2004). Hepatitis C virus NS5A mediated STAT3 activation requires co-operation of Jak1 kinase. *Virology* **322**, 51-60.
- Sarma, N. J., Tiriveedhi, V., Crippin, J. S., Chapman, W. C. & Mohanakumar, T. (2014). Hepatitis C virus-induced changes in microRNA 107 (miRNA-107) and miRNA-449a modulate CCL2 by targeting the interleukin-6 receptor complex in hepatitis. *J Virol* **88**, 3733-43.
- Sarrazin, C., Berg, T., Ross, R. S., Schirmacher, P., Wedemeyer, H., Neumann, U., Schmidt, H. H., Spengler, U., Wirth, S., Kessler, H. H., Moradpour, D., Heim, M., Cornberg, M., Protzer, U., Manns, M. P., Fleig, W. E., Dollinger, M. M. & Zeuzem, S. (2010a). [Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis C virus (HCV) infection: the German guidelines on the management of HCV infection]. *Z Gastroenterol* **48**, 289-351.
- Sarrazin, C., Shiffman, M. L., Hadziyannis, S. J., Lin, A., Colucci, G., Ishida, H. & Zeuzem, S. (2010b). Definition of rapid virologic response with a highly sensitive real-time PCR-based HCV RNA assay in peginterferon alfa-2a plus ribavirin response-guided therapy. *J Hepatol* **52**, 832-8.
- Sataranatarajan, K., Lee, M. J., Mariappan, M. M. & Feliers, D. (2008). PKCdelta regulates the stimulation of vascular endothelial factor mRNA translation by angiotensin II through hnRNP K. *Cell Signal* **20**, 969-77.
- Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Nakaya, T., Taniguchi, T. & Tanaka, N. (1998). Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett* **441**, 106-10.
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N. & Taniguchi, T. (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* **13**, 539-48.
- Schmidt, A., Schwerd, T., Hamm, W., Hellmuth, J. C., Cui, S., Wenzel, M., Hoffmann, F. S., Michallet, M. C., Besch, R., Hopfner, K. P., Endres, S. & Rothenfusser, S. (2009). 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12067-72.
- Schnell, G., Loo, Y. M., Marcotrigiano, J. & Gale, M., Jr. (2012). Uridine composition of the poly-U/UC tract of HCV RNA defines non-self recognition by RIG-I. *PLoS Pathog* **8**, e1002839.
- Sehgal, P. B. & Tamm, I. (1978). Halogenated benzimidazole ribosides, Novel inhibitors of RNA synthesis. *Biochem Pharmacol* **27**, 2475-85.
- Semenza, G. L. (2000). HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev* **14**, 1983-91.
- Sharma, K., D'Souza, R. C., Tyanova, S., Schaab, C., Wisniewski, J. R., Cox, J. & Mann, M. (2014). Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling. *Cell Rep* **8**, 1583-94.
- Sherman, K. E., Flamm, S. L., Afdhal, N. H., Nelson, D. R., Sulkowski, M. S., Everson, G. T., Fried, M. W., Adler, M., Reesink, H. W., Martin, M., Sankoh, A. J., Adda, N., Kauffman, R. S., George, S., Wright, C. I., Poordad, F. & Team, I. S. (2011). Response-guided telaprevir combination treatment for hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **365**, 1014-24.
- Shi, P. Y., Tilgner, M. & Lo, M. K. (2002). Construction and characterization of subgenomic replicons of New York strain of West Nile virus. *Virology* **296**, 219-33.
- Shi, S. T. & Lai, M. M. C. (2006). HCV 5' and 3'UTR: When Translation Meets Replication. In *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology* (ed. S. L. Tan): Norfolk (UK).
- Shi, S. T., Lee, K. J., Aizaki, H., Hwang, S. B. & Lai, M. M. (2003). Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *J Virol* **77**, 4160-8.
- Shi, Y. H., Ding, W. X., Rabinowich, H., Fan, J. & Yin, X. M. (2008). Expression of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein in hepatocellular carcinoma promotes metastasis and tumor recurrence. *Hepatology* **48**, 497-507.
- Shi, D. D., Shi, H., Lu, D., Li, R., Zhang, Y. & Zhang, J. (2012). NDR1/STK38 potentiates NF-kappaB activation by its kinase activity. *Cell Biochem Funct* **30**, 664-70.
- Shih, S. C. & Claffey, K. P. (1999). Regulation of human vascular endothelial growth factor mRNA stability in hypoxia by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *J Biol Chem* **274**, 1359-65.
- Shima, D. T., Deutsch, U. & D'Amore, P. A. (1995). Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett* **370**, 203-8.

- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E.** (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843-5.
- Sillanpaa, M., Kaukinen, P., Melen, K. & Julkunen, I.** (2008). Hepatitis C virus proteins interfere with the activation of chemokine gene promoters and downregulate chemokine gene expression. *J Gen Virol* **89**, 432-43.
- Silverman, S., Jr. & Miller, C. S.** (2003). Diagnosis and treatment of viral infections. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* **15**, 79-89.
- Simard, J. C., Cesaro, A., Chapeton-Montes, J., Tardif, M., Antoine, F., Girard, D. & Tessier, P. A.** (2013). S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF-kappaB(1.). *PLoS One* **8**, e72138.
- Simmonds, P.** (1995). Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* **21**, 570-83.
- Simons, J. N., Pilot-Matias, T. J., Leary, T. P., Dawson, G. J., Desai, S. M., Schlauder, G. G., Muerhoff, A. S., Erker, J. C., Buijk, S. L., Chalmers, M. L. & et al.** (1995). Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3401-5.
- Sobell, H. M.** (1985). Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 5328-31.
- Spangberg, K., Goobar-Larsson, L., Wahren-Herlenius, M. & Schwartz, S.** (1999). The La protein from human liver cells interacts specifically with the U-rich region in the HCV 3' untranslated region. *J Hum Virol* **2**, 296-307.
- Spangenberg, H. C., Thimme, R. & Blum, H. E.** (2009). Targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **6**, 423-32.
- Spriggs, K. A., Stoneley, M., Bushell, M. & Willis, A. E.** (2008). Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell* **100**, 27-38.
- Srikrishna, G.** (2012). S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. *J Innate Immun* **4**, 31-40.
- Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H. & Schreiber, R. D.** (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**, 227-64.
- Steinhauer, D. A., Domingo, E. & Holland, J. J.** (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* **122**, 281-8.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A. H., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T.** (2007). Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* **3**, e103.
- Stohr, N., Lederer, M., Reinke, C., Meyer, S., Hatzfeld, M., Singer, R. H. & Huttelmaier, S.** (2006). ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J Cell Biol* **175**, 527-34.
- Stone, A. E., Giugliano, S., Schnell, G., Cheng, L., Leahy, K. F., Golden-Mason, L., Gale, M., Jr. & Rosen, H. R.** (2013). Hepatitis C virus pathogen associated molecular pattern (PAMP) triggers production of lambda-interferons by human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog* **9**, e1003316.
- Su, A. I., Pezacki, J. P., Wodicka, L., Brideau, A. D., Bukh, J., Purcell, R. H., Schultz, P. G. & Chisari, F. V.** (2002). Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15669-74.
- Su, Q., Wang, S., Baltzis, D., Qu, L. K., Raven, J. F., Wong, A. H. & Koromilas, A. E.** (2007). Interferons induce tyrosine phosphorylation of the eIF2alpha kinase PKR through activation of Jak1 and Tyk2. *EMBO Rep* **8**, 265-70.
- Sudhakar, A., Ramachandran, A., Ghosh, S., Hasnain, S. E., Kaufman, R. J. & Ramaiah, K. V.** (2000). Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry* **39**, 12929-38.
- Sumpter, R., Jr., Loo, Y. M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M. & Gale, M., Jr.** (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* **79**, 2689-99.
- Sun, H., Charles, C. H., Lau, L. F. & Tonks, N. K.** (1993). MKP-1, an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* **75**, 487-93.
- Sutter, G. & Moss, B.** (1995). Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus. *Dev Biol Stand* **84**, 195-200.
- Sutter, G., Ohlmann, M. & Erfle, V.** (1995). Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Lett* **371**, 9-12.
- Taguchi, T., Nagano-Fujii, M., Akutsu, M., Ohgimoto, S., Ishido, S. & Hotta, H.** (2004). Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. *J Gen Virol* **85**, 959-69.
- Tai, A. W., Benita, Y., Peng, L. F., Kim, S. S., Sakamoto, N., Xavier, R. J. & Chung, R. T.** (2009). A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe* **5**, 298-307.

- Takahashi, H. & Shibuya, M.** (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* **109**, 227-41.
- Tamaskovic, R., Bichsel, S. J., Rogniaux, H., Stegert, M. R. & Hemmings, B. A.** (2003). Mechanism of Ca²⁺-mediated regulation of NDR protein kinase through autophosphorylation and phosphorylation by an upstream kinase. *J Biol Chem* **278**, 6710-8.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Sugiyama, K. & Shimotohno, K.** (1996). Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* **70**, 3307-12.
- Tao, W. A., Wollscheid, B., O'Brien, R., Eng, J. K., Li, X. J., Bodenmiller, B., Watts, J. D., Hood, L. & Aebersold, R.** (2005). Quantitative phosphoproteome analysis using a dendrimer conjugation chemistry and tandem mass spectrometry. *Nat Methods* **2**, 591-8.
- Tardif, K. D., Waris, G. & Siddiqui, A.** (2005). HCV, ER stress, and oxidative stress. *Trends Microbiol* **13**, 159-63.
- Tardif, K. D., Mori, K. & Siddiqui, A.** (2002). Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J Virol* **76**, 7453-9.
- Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N. & Lai, M. M.** (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* **285**, 107-10.
- Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E. & Shatsky, I. N.** (2008). Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 836-41.
- Thomas, P., Forse, R. A. & Bajenova, O.** (2011). Carcinoembryonic antigen (CEA) and its receptor hnRNP M are mediators of metastasis and the inflammatory response in the liver. *Clin Exp Metastasis* **28**, 923-32.
- Thomis, D. C. & Samuel, C. E.** (1995). Mechanism of interferon action: characterization of the intermolecular autophosphorylation of PKR, the interferon-inducible, RNA-dependent protein kinase. *J Virol* **69**, 5195-8.
- Tian, Q., Streuli, M., Saito, H., Schlossman, S. F. & Anderson, P.** (1991). A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* **67**, 629-39.
- Tian, Q., Taupin, J., Elledge, S., Robertson, M. & Anderson, P.** (1995). Fas-activated serine/threonine kinase (FAST) phosphorylates TIA-1 during Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* **182**, 865-74.
- Tilgner, M. & Shi, P. Y.** (2004). Structure and function of the 3' terminal six nucleotides of the west Nile virus genome in viral replication. *J Virol* **78**, 8159-71.
- Toroney, R., Nallagatla, S. R., Boyer, J. A., Cameron, C. E. & Bevilacqua, P. C.** (2010). Regulation of PKR by HCV IRES RNA: importance of domain II and NS5A. *J Mol Biol* **400**, 393-412.
- Tourriere, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J. M., Bertrand, E. & Tazi, J.** (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol* **160**, 823-31.
- Tscherne, D. M., Jones, C. T., Evans, M. J., Lindenbach, B. D., McKeating, J. A. & Rice, C. M.** (2006). Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* **80**, 1734-41.
- Tsuzuki, Y., Fukumura, D., Oosthuysen, B., Koike, C., Carmeliet, P. & Jain, R. K.** (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha--> hypoxia response element--> VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res* **60**, 6248-52.
- Tu, H., Gao, L., Shi, S. T., Taylor, D. R., Yang, T., Mircheff, A. K., Wen, Y., Gorbalenya, A. E., Hwang, S. B. & Lai, M.** (1999). Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* **263**, 30-41.
- Tuplin, A., Wood, J., Evans, D. J., Patel, A. H. & Simmonds, P.** (2002). Thermodynamic and phylogenetic prediction of RNA secondary structures in the coding region of hepatitis C virus. *RNA* **8**, 824-41.
- Ule, J., Stefani, G., Mele, A., Ruggiu, M., Wang, X., Taneri, B., Gaasterland, T., Blencowe, B. J. & Darnell, R. B.** (2006). An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation. *Nature* **444**, 580-6.
- Uribe, D. J., Guo, K., Shin, Y. J. & Sun, D.** (2011). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and nucleolin as transcriptional activators of the vascular endothelial growth factor promoter through interaction with secondary DNA structures. *Biochemistry* **50**, 3796-806.
- Vassilaki, N. & Mavromara, P.** (2009). The HCV ARFP/F/core+1 protein: production and functional analysis of an unconventional viral product. *IUBMB Life* **61**, 739-52.
- Vichalkovski, A., Gresko, E., Cornils, H., Schmitz, D. & Hemmings, B.** (2008). NDR kinase is activated by RASSF1A/MST1 in response to Fas receptor stimulation and promotes apoptosis. *Curr Biol* **18**, 1889-95.
- Vidalain, P. O. & Tangy, F.** (2010). Virus-host protein interactions in RNA viruses. *Microbes Infect* **12**,
- Villace, P., Marion, R. M. & Ortin, J.** (2004). The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **32**, 2411-20.

- Vogl, T., Tenbrock, K., Ludwig, S., Leukert, N., Ehrhardt, C., van Zoelen, M. A., Nacken, W., Foell, D., van der Poll, T., Sorg, C. & Roth, J. (2007). Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med* **13**, 1042-9.
- Vrancken, K., Paeshuyse, J. & Liekens, S. (2012). Angiogenic activity of hepatitis B and C viruses. *Antivir Chem Chemother* **22**, 159-70.
- Vumbaca, F., Phoenix, K. N., Rodriguez-Pinto, D., Han, D. K. & Claffey, K. P. (2008). Double-stranded RNA-binding protein regulates vascular endothelial growth factor mRNA stability, translation, and breast cancer angiogenesis. *Mol Cell Biol* **28**, 772-83.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R. & Liang, T. J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**, 791-6.
- Walters, R. D., Kugel, J. F. & Goodrich, J. A. (2009). Invaluable junk: the cellular impact and function of Alu and B2 RNAs. *IUBMB Life* **61**, 831-7.
- Wang, B., Ren, J., Ooi, L. L., Chong, S. S. & Lee, C. G. (2005). Dinucleotide repeats negatively modulate the promoter activity of Cyr61 and is unstable in hepatocellular carcinoma patients. *Oncogene* **24**, 3999-4008.
- Wang, I., Hennig, J., Jagtap, P. K., Valcarcel, J. & Sattler, M. (2014). Structure, dynamics and RNA binding of the multi-domain splicing factor TIA-1. *Nucleic Acids Res* **42**, 5949-66.
- Warburg, O. (1925). Iron, the Oxygen-Carrier of Respiration-Ferment. *Science* **61**, 575-82.
- Waris, G., Turkson, J., Hassanein, T. & Siddiqui, A. (2005). Hepatitis C virus (HCV) constitutively activates STAT-3 via oxidative stress: role of STAT-3 in HCV replication. *J Virol* **79**, 1569-80.
- Wasley, A. & Alter, M. J. (2000). Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* **20**, 1-16.
- Wathelet, M. G., Lin, C. H., Parekh, B. S., Howley, P. M. & Maniatis, T. (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell* **1**, 507-18.
- Watson, J. A. (1972). Regulation of lipid metabolism in in vitro cultured minimal deviation hepatoma 7288C. *Lipids* **7**, 146-55.
- Weidensdorfer, D., Stohr, N., Baude, A., Lederer, M., Kohn, M., Schierhorn, A., Buchmeier, S., Wahle, E. & Huttelmaier, S. (2009). Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *RNA* **15**, 104-15.
- Weinlich, S., Huttelmaier, S., Schierhorn, A., Behrens, S. E., Ostareck-Lederer, A. & Ostareck, D. H. (2009). IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *RNA* **15**, 1528-42.
- Welbourn, S., Green, R., Gamache, I., Dandache, S., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Meerovitch, K. & Pause, A. (2005). HCV NS2/3 processing is required for NS3 stability and viral RNA replication. *J Biol Chem* **280**, 29604-11.
- Wen, X., Huang, X., Mok, B. W., Wang, P., Song, W., Jin, D. Y., Yuen, K. Y. & Chen, H. (2014). NF90 exerts antiviral activity through regulation of PKR phosphorylation and stress granules in infected cells. *J Immunol* **192**, 3753-64.
- Westaway, E. G. (1987). Flavivirus replication strategy. *Adv Virus Res* **33**, 45-90.
- White, J. P. & Lloyd, R. E. (2012). Regulation of stress granules in virus systems. *Trends Microbiol* **20**, 175-83.
- White, J. P., Cardenas, A. M., Marissen, W. E. & Lloyd, R. E. (2007). Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase. *Cell Host Microbe* **2**, 295-305.
- WHO (World Health Organization) (2016). <http://www.who.int/topics/hepatitis/en/>
- Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I. R. & DesGroseillers, L. (1999). Mammalian stau6 is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **19**, 2220-30.
- Williams, B. R. (1991). Transcriptional regulation of interferon-stimulated genes. *Eur J Biochem* **200**, 1-11.
- Williams, B. R. (1999). PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* **18**, 6112-20.
- Wilson, G. K., Brimacombe, C. L., Rowe, I. A., Stamatakis, Z., Bhogal, R. H., Simoes, M. L., Ashcroft, M., Afford, S. C., Mitry, R. R., Dhawan, A., Mee, C. J., Hubscher, S. G., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2012). A dual role for hypoxia inducible factor-1alpha in the hepatitis C virus lifecycle and hepatoma migration. *J Hepatol* **56**, 803-9.
- Wirth W., Gloxhuber, C. (1993). Toxikologie . Fischer Verlag Stuttgart **5. Auflage**
- Wittwer, C. T., Ririe, K. M., Andrew, R. V., David, D. A., Gundry, R. A. & Balis, U. J. (1997). The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* **22**, 176-81.
- Wu, F., Wang, P., Zhang, J., Young, L. C., Lai, R. & Li, L. (2010). Studies of phosphoproteomic changes induced by nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK) highlight deregulation of tumor necrosis factor (TNF)/Fas/TNF-

- related apoptosis-induced ligand signaling pathway in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Mol Cell Proteomics* **9**, 1616-32.
- Xiao, Z., Ko, H. L., Goh, E. H., Wang, B. & Ren, E. C.** (2013). hnRNP K suppresses apoptosis independent of p53 status by maintaining high levels of endogenous caspase inhibitors. *Carcinogenesis* **34**, 1458-67.
- Xu, Y., Gao, X. D., Lee, J. H., Huang, H., Tan, H., Ahn, J., Reinke, L. M., Peter, M. E., Feng, Y., Gius, D., Siziopikou, K. P., Peng, J., Xiao, X. & Cheng, C.** (2014). Cell type-restricted activity of hnRNPM promotes breast cancer metastasis via regulating alternative splicing. *Genes Dev* **28**, 1191-203.
- Xu, Z., Choi, J., Lu, W. & Ou, J. H.** (2003). Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J Virol* **77**, 1578-83.
- Yang, R., Kong, E., Jin, J., Hergovich, A. & Puschel, A. W.** (2014). Rassf5 and Ndr kinases regulate neuronal polarity through Par3 phosphorylation in a novel pathway. *J Cell Sci* **127**, 3463-76.
- Yarilina, A. & Ivashkiv, L. B.** (2010). Type I IFN: a new player in TNF signaling. *Curr Dir Autoimmun* **11**, 94-104.
- Yoneyama, M. & Fujita, T.** (2007). RIG-I family RNA helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**, 545-51.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Akira, S. & Fujita, T.** (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730-7.
- Zachary, I.** (2001). Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C1375-86.
- Zamanian-Daryoush, M., Mogensen, T. H., DiDonato, J. A. & Williams, B. R.** (2000). NFkB activation by ds-RNA-activated protein kinase is mediated through NFkB-inducing kinase and IkappaB kinase. *Mol Cell Biol* **20**, 1278-90.
- Zhang, M. X., Zhao, X., Wang, Z. G., Zhao, W. M. & Wang, Y. S.** (2010). Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3 regulates expression of vascular endothelial growth factor in human meningioma differentiation. *J Cancer Res Clin Oncol* **136**, 981-8.
- Zhao, K. W., Li, D., Zhao, Q., Huang, Y., Silverman, R. H., Sims, P. J. & Chen, G. Q.** (2005). Interferon-alpha-induced expression of phospholipid scramblase 1 through STAT1 requires the sequential activation of protein kinase Cdelta and JNK. *J Biol Chem* **280**, 42707-14.
- Zhao, S. & Fernald, R. D.** (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Comput Biol* **12**, 1047-64.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T. & Chisari, F. V.** (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9294-9.
- Zhong, W., Uss, A. S., Ferrari, E., Lau, J. Y. & Hong, Z.** (2000). De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J Virol* **74**, 2017-22.
- Zhou, H., Di Palma, S., Preisinger, C., Peng, M., Polat, A. N., Heck, A. J. & Mohammed, S.** (2013). Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. *J Proteome Res* **12**, 260-71.
- Zhu, C., Liu, X., Wang, S., Yan, X., Wu, K., Li, Y. & Liu, F.** (2014). HCV core protein induces hypoxia-inducible factor 1alpha-mediated vascular endothelial growth factor expression in Huh7.5.1 cells. *Mol Med Rep* **9**, 2010-4.
- Zuccato, E., Buratti, E., Stuani, C., Baralle, F. E. & Pagani, F.** (2004). An intronic polypyrimidine-rich element downstream of the donor site modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 alternative splicing. *J Biol Chem* **279**, 16980-8.

7 Anhang

7.1 Verwendete Materialien

Tab. 5: Verwendete Antikörper

primäre Antikörper	Verdünnung		Bezugsquelle
Kaninchen polyklonal Anti-HCV-NS5A	IB 1: 100	IF:1:300	Eurogentec (Seraing, Belgien)
Kaninchen polyklonal Anti-IGF2BP1	IB: 1: 1000	IF: 1:200	AG Hüttelmaier (ZAMED Halle)
Kaninchen polyklonal Anti-NEOII	IB: 1:1000		abcam (Cambridge, UK)
Kaninchen polyklonal Anti-VEGF	IB: 1.500		abcam (Cambridge, UK)
Kaninchen polyklonal Anti-WNV-NS5	IB: 1:1000	IF: 1:100	Eurogentec (Seraing, Belgien)
Maus monoklonal Anti-FLAG	IB: 1:1000		Agilent (Santa Clara, USA)
Maus monoklonal Anti-G3BP1	IB: 1:1000		BD Bioscience (San Jose, USA)
Maus monoklonal Anti-GAPDH	IB: 1:10000		Santa Cruz(Santa Cruz, USA)
Maus monoklonal Anti-HCV-NS3	IB: 1:1000	IF: 1:150	abcam (Cambridge, UK)
Maus monoklonal Anti-HIF1 α	IB: 1:1000		abcam (Cambridge, UK)
Maus monoklonal Anti-Vinculin	IB: 1:2000		Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Meerschweinchen Anti-HCV-NS5B	IF: 1:100		Eurogentec (Seraing, Belgien)
Ziege polyclonal Anti-TIA1	IB: 1:1000	IF: 1:200	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
Ziege polyclonal Anti-TIAR	IB: 1:1000	IF: 1:200	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
sekundäre Antikörper	Verdünnung		Bezugsquelle
Ziege Anti-Meerschweinchen, Rhodaminrot	IF: 1:500		Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
ECL™ Esel Anti-Kaninchen IgG, HRP konjugiert	IB: 1:7500		GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
ECL™ Schaf Anti-Maus IgG, HRP konjugiert	IB: 1:7500		GE Healthcare(Buckinghamshire, UK)
Esel Anti-Maus IgG, Rhodaminrot-markiert	IF: 1:500		Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Esel Anti-Ziege IgG, Cy2	IF: 1:500		Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Esel Anti-Kaninchen IgG,Rhodaminrot	IF: 1:500		Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Ziege Anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor 488	IF: 1:500		life™ (Darmstadt, Deutschland)
Esel Anti-Maus IgG, IRDye® 680LT/800CW	IB: 1:5000		Li-Cor (Lincoln, USA)
Esel Anti-Kaninchen IgG, IRDye® 680LT/800CW	IB: 1:5000		Li-Cor (Lincoln, USA)
Esel Anti-Ziege IgG, IRDye® 800CW	IB: 1:5000		Li-Cor (Lincoln, USA)
Ziege Anti-Kaninchen, Fluorescein	IF: 1:500		life™ (Darmstadt, Deutschland)

IB:Immunoblot; IF: Immunfluoreszenz

Tab. 6: Verwendete Plasmide und Vektoren

Plasmid/Vektor	Resistenz	Charakteristika	Referenz/Herkunft
pcDNA™3.1/Zeo	amp ^r , NEO ^r	Expressionsvektor	life™ (Carlsbad, CA, USA)
pCITE2a	amp ^r	Expressionsvektor	Merk (Darmstadt, Deutschland)
HCV-JFH_pUC18	amp ^r	Derivat des pSGR-JFH1 Replikon HDVr <i>downstream</i> der 3'-UTR	Dr. René Geissler (pSGR-JFH1: Prof. Takaji Wakita, NIID, Tokyo; <i>mta</i>)
HCV-GND_pUC18	amp ^r	Derivat des pSGR -JFH1 Replikon mit HDVr <i>downstream</i> der 3'-UTR; replikationsdefizient NS5b _{D318N} ,	Dr. René Geissler (Martin-Luther-Universität, Deutschland)
pWNV-HDVr	amp ^r	Derivat des pWNVReplikons Stamm NY2000-crow3356 mit HDVr <i>downstream</i> der 3'-UTR	Dr. Susann Friedrich (Martin-Luther-Universität, Deutschland)

pWNV-mut-HDVr	amp ^r	Derivat des pWNV-HDVr, replikationsdefizient NS5 _{D669A} ,	Dr. Susann Friedrich (Martin-Luther-Universität, Deutschland)
FLAG-HCV-NS3_pCite2a	amp ^r	Expressionsvektor, NS3 (HCV Genotyp 2a) in pCITE2a mit N-term. FLAG	diese Arbeit
FLAG-HCV-NS4a_pCite2a	amp ^r	Expressionsvektor, NS4a (HCV Genotyp 2a) in pCITE2a mit N-term. FLAG	diese Arbeit
FLAG-HCV-NS4b_pCite2a	amp ^r	Expressionsvektor, NS4b (HCV Genotyp 2a) in pCITE2a mit N-term. FLAG	diese Arbeit
FLAG-HCV-NS5a_pCite2a	amp ^r	Expressionsvektor, NS5a (HCV Genotyp 2a) in pCITE2a mit N-term. FLAG	diese Arbeit
FLAG-HCV-NS5b_pCite2a	amp ^r	Expressionsvektor, NS5b (HCV Genotyp 2a) in pCITE2a mit N-term. FLAG	diese Arbeit
HCV-Δcore-NEO_pCite2a	amp ^r	Expressionsvektor, Δcore-NEO (HCV Genotyp 2a) in pCITE2a	diese Arbeit
HCV-Δcore-NEO_pcDNA3	amp ^r , NEO ^r	Expressionsvektor, Δcore-NEO (HCV Genotyp 2a) in pcDNA3	diese Arbeit
FLAG-TIA1vl_pcDNA3	amp ^r , NEO ^r	Expressionsvektor, TIA1 Isoform I (kurz) in pcDNA3 mit N-term. FLAG	diese Arbeit
FLAG-TIA1vII_pcDNA3	amp ^r , NEO ^r	Expressionsvektor, TIA1 Isoform II (lang) in pcDNA3 mit N-term. FLAG	diese Arbeit
TIA1vl_pEYFP-C1	kan ^r , NEO ^r	Expressionsvektor, TIA1 Isoform I (kurz) in pEYFP-C1	Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier (ZAMED, Halle, Deutschland)
TIA1vII_pEYFP-C1	kan ^r , NEO ^r	Expressionsvektor, TIA1 Isoform II (lang) in pEYFP-C1	diese Arbeit

Plasmidkonstruktion:

HCV-JFH_pUC18 (HCV): Dieses Plasmid beruht auf dem pSGR-JFH1-Vektor (Prof. T. Wakita, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan) Es enthält die cDNA-Sequenz, die für ein bicistronisches HCV-Replikon kodiert (GenBank: AB114136). Die cDNA wurde aus einem viralen Isolat des HCV-Genotyps 2a (JFH1) generiert (Kato *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2003a; Kato *et al.*, 2005). Am 5'-Ende der cDNA befindet sich die Sequenz eines T7-Promoters für die *in vitro*-Transkription (siehe 2.5.2). Die cDNA besteht aus den kodierenden Regionen für die HCV-5'-UTR, das Δcore-Fragment, die Neomycin-Phosphotransferase II, die EMCV-5'-UTR, die HCV-Region NS3-NS5B, die HCV-3'-UTR und ein Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym (HDVr). Linearisiert wurde dieses Plasmid mit dem Restriktionsenzym *Xba*I. Das Plasmid wurde von Dr. Geißler (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland) generiert und zur Verfügung gestellt.

HCV-GND_pUC18 (HCV-mut): Dieses Plasmid entspricht dem oben genannten HCV-JFH_pUC18-Plasmid. Es besitzt jedoch eine Mutation, die zum Austausch der Aminosäure Asparaginsäure zu Asparagin an der Position 318 führt über *site-directed mutagenesis*-PCR eingeführt wurde. Das Plasmid wurde von Dr. Geißler (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland) generiert und zur Verfügung gestellt.

pWNV-HDVr (WNV): Das Plasmid wurde von Dr. Friedrich (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland) generiert und zur Verfügung gestellt. Es enthält die cDNA eines Replikons des West-Nil-Virus (WNV) mit einem zusätzlich eingefügten Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym (HDVr) am 3'-Ende der cDNA des WNV. Am 5'-Ende der cDNA befindet sich die Sequenz eines T7-Promoters für die *in vitro*-Transkription (siehe 2.5.2). Die cDNA besteht aus den kodierenden Regionen für die WNV-5'-UTR, das Δcore-Fragment, Δenvelope-Fragment, die WNV-Region NS1-NS5, die WNV-3'-UTR und ein Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym (HDVr). Linearisiert wurde dieses Plasmid mit dem Restriktionsenzym *Xba*I. Dieses Plasmid wurde aus einem Vorläuferplasmid generiert, das von Prof. P.Y. Shi (Novartis, Institute for Tropical Diseases, Singapore) zur Verfügung gestellt wurde (Shi *et al.*, 2002).

pWNV-mut-HDVr (WNV mut): Dieses Plasmid entspricht dem oben genannten pWNV-HDVr-Plasmid. Es besitzt jedoch eine Mutation, die zum Austausch der Aminosäure Aspartat zu Alanin an der Position 669 führt und über *site-directed mutagenesis*-PCR eingeführt wurde. Das Plasmid wurde von Dr. Friedrich (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland) generiert und zur Verfügung gestellt.

pCite2a-Expressionskonstrukte: Der pCite2a-Vektor (Merk, Darmstadt, Deutschland) erlaubt die konstitutive Genexpression in humanen Zellen. Es kodiert eine Erkennungssequenz für die T7-Polymerase und einen HIS-tag. Es

wurde in Kombination mit dem MVA-T7-System verwendet (siehe 2.2.2.3), welches die T7-Polymerase kodiert, um die Nichtstrukturproteine des HCV zu exprimieren. Die cDNAs, die für die Nichtstrukturproteine und das Δ core-Neomycin kodieren, wurden durch PCR aus dem HCV-JFH_pUC18-Plasmid mit spezifischen Primern amplifiziert (core-BamHI-fwd, Neo-XhoI-rev; NS3_BglII_fwd, NS3-NotI-oSt-rev; NS4a_BglII_fwd, NS4a-NotI-oSt-rev; NS4b_BglII_fwd, NS4b-NotI-oSt-rev; NS5a_BglII_fwd, NS5a-NotI-oSt-rev; NS5b_BglII_fwd, NS5b-NotI-oSt-rev). Über die *BglII*- und *NotI*- (NS3-NS5B) bzw. *BamHI*- und *XhoI*-Restriktionsschnittstellen (Δ core-NEO) wurden sie in pCite2a ligiert. Zusätzlich wurde ein N-terminaler FLAG-tag angefügt, welcher durch PCR-Amplifikation mit den Primern (EcoRV-Flag-fwd, BamHI-Flag-fwd, Flag-BamHI-rev) amplifiziert und über die *EcoRI*- (NS1-NS5a) bzw. *BamHI* (NS5b)- und *BamHI*-Restriktionsschnittstellen in pCite2a ligiert wurde. Daraus ergaben sich die Plasmide: **FLAG-HCV-NS3_pCite2a**, **FLAG-HCV-NS4a_pCite2a**, **FLAG-HCV-NS4b_pCite2a**, **FLAG-HCV-NS5a_pCite2a**, **FLAG-HCV-NS5b_pCite2a**, **HCV- Δ core-NEO_pCite2a**.

pcDNATM3.1/Zeo-Expressionskonstrukte: Dieser Vektor (life technologiesTM, Carlsbad, CA, USA) ermöglicht ebenfalls die konstitutive Genexpression in humanen Zelllinien. Die cDNAs, die für die TIA1-Isoformen TIA1vl und TIA1vll kodieren, wurden durch RT-PCR von Gesamt-RNA (siehe 2.5.1.1) aus Huh7-Zellen mit den Primern TIA1-f-XhoI-cds und TIA1-r-XbaI-cds amplifiziert und über die *XhoI*- und *XbaI*-Restriktionsschnittstellen in pcDNA3TM3.1/Zeo ligiert. Eine für einen FLAG-tag kodierende Sequenz wurde über zwei Hybridisierungsoligonukleotide (FLAG-KpnI-fwd, FLAG-XhoI-rev) und Ligation in die *KpnI*- und *XhoI*-Restriktionsschnittstellen eingefügt. Außerdem wurde das Δ core-NEO-Fragment mittels PCR aus dem HCV-JFH_pUC18-Plasmid mit den Primern core-BamHI-fwd und Neo-XhoI-rev amplifiziert und über die *BamHI*- und *XhoI*-Restriktionsschnittstelle in pcDNATM3.1/Zeo ligiert. Daraus ergaben sich die Plasmide: **HCV- Δ core-NEO_pcDNA3**, **FLAG-TIA1vl_pcDNA3**, **FLAG-TIA1vll_pcDNA3**.

pEYFP-C1-Expressionskonstrukte: Der pEYFP-C1-Vektor ermöglicht die Expression von Zielproteinen mit N-terminalen EYFP-Fusionsprotein (gelb-grüne Variante des grün fluoreszierenden Proteins aus *aequorea victoria*). Das **TIA1vl_pEYFP-C1**-Plasmid wurde von Prof. Dr. Hüttelmaier (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Aus dem FLAG-TIA1vll_pcDNA3-Plasmid wurde, durch Restriktionsverdau mit *BspHI* und *EcoRV* ein Teil der kodierenden Sequenz für TIA1vll isoliert. Aus dem TIA1vl_pEYFP-C1-Plasmid wurde durch diesen Restriktionsverdau ebenfalls der entsprechende Teil der kodierenden Sequenz für TIA1vl entfernt. Durch Ligation wurde das TIA1vll-Fragment in den deletierten TIA1vl-pEYFP-C1-Plasmid kloniert und dadurch das **TIA1vll_pEYFP-C1**-Plasmid generiert.

Tab. 7: Verwendete Oligonukleotide und siRNAs

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	↔	Verwendung
JFH-rev-RT	CGCTCTAAGCCTGACGGTG	rev	für HCV-spezifische cDNA-Synthese, bindet im NS3-kodierenden Bereich
Oligo_dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTT	rev	für poly-A-spezifische cDNA-Synthese
CIAP-fwd	TGGGTCTTCTAGGCAGCTT	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von CIAP
CIAP-rev	GTCCACAGCAGGTTTCACTG	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von CIAP
Cyr61-fwd	AAGAAACCCGGATTGTGAG	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von Cyr61
Cyr61-rev	GCTGCATTTCTGCCCTTT	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von Cyr61
GAPDH-fwd-RT	AGCCTCAAGATCATCAGCAATGC	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von GAPDH
GAPDH-rev-RT	ATGGCATGGACTGTGGTCATG	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von GAPDH
GRP78-fwd	AGCTGTAGCGTATGGTGCTG	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von GRP78
GRP78-rev	AAGGGGACATACATCAAGCAGT	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von GRP78
HIF1-alpha-fwd	AAGGAACCTGATGCTTTAACTTTG	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von HIF1 α
HIF1-alpha-rev	TGGTCATCAGTTTCTGTGTCG	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von HIF1 α
hnRNPK-fwd	CAGACGCCATTATCCTCTGTT	fwd	für qRT-PCR, erkennt von hnRNPK Isoform 1 und 3
hnRNPK-rev	CCCAGTGCTGCAGTAGCC	rev	für qRT-PCR, erkennt von hnRNPK Isoform 1 und 3
hnRNPL-fwd	GGAGGTGACCGAGGAGAACT	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von hnRNPL
hnRNPL-rev	CGCTCACTTTGCTGAGA	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von hnRNPL
hnRNPM-fwd	AGGGCCTTACAAAAGGAGA	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von hnRNPM
hnRNPM-rev	TCCTAACCCCATGCCAATAC	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von hnRNPM

hnRNPQ-fwd	CAATAGAGGTTATGCGTTTGTC	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von hnRNPQ
hnRNPQ-rev	TTCCAGAACGAATTCATGATT	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von hnRNPQ
HSP7C-fwd	TTTTGTGGCTTCCTTCGTT	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von Hsp70
HSP7C-rev	TCCCTGGACATGGTTGC	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von Hsp70
IGF2BP1-fwd	AAGTTCGGGAGGCCTATGAG	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von IGF2BP1
IGF2BP1-rev	CAGGGATCAGGTGAGACTGC	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von IGF2BP1
JAK1-fwd	TGCGCACGGATAACATCA	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von JAK1
JAK1-rev	CACCAGCAGGTTGGAGATTT	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von JAK1
JFH1-fwd	TCGACGTTGTTACAAGTCTCC	fwd	für qRT-PCR, bindet im NS3-kodierenden Bereich
JFH1-rev	CTGCCAGTTGGAGCATGC	rev	für qRT-PCR, bindet im NS3-kodierenden Bereich
MATR3-fwd	GCAGCAGCCTTCCTCATTAT	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von MATR3
MATR3-rev	CCTTGACATCTTAAGTTTCCTTC	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von MATR3
MEP50-fwd	GCATCAAGGTTTGGGACCT	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von MEP50
MEP50-rev	GAGGCAGCAACACAAGTGAC	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von MEP50
MKP1-fwd	TACAAGAGCATCCCTGTGGAG	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von MKP1
MKP1-rev	TCTTGATGGAGTCTATGAAGTCAATGG	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von MKP1
MOV10-fwd	CCTTCCTAGCTCCATCTACCG	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von MOV10
MOV10-rev	TCTTTGCGTCCCAGTTGC	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von MOV10
NF90-fwd	CATGAATGCCGGTGCTGG	fwd	für qRT-PCR, erkennt die Isoformen 1 und 2
NF90-rev	AAGTCACTGTAGCCTGCTGTCG	rev	für qRT-PCR, erkennt die Isoformen 1 und 2
NONO-fwd	ACAGCAGGAAGGATTCAAGG	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von NONO
NONO-rev	GCATGGCACCTCTGTTGTT	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von NONO
NRF-fwd	CCATCTGGTGGCCTGAAG	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von NRF1
NRF-rev	GTAGTGCCTGGTCCATGA	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von NRF1
PABP1-fwd	TGTAACAAGCCCAACAGC	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von PABP1
PABP1-rev	TCATGGTCCCTGATCAATTTT	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von PABP1
Pim1-fwd	ATCAGGGGCCAGGTTTTC	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von Pim1
Pim1-rev	GGGCCAAGCACCATCTAAT	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von Pim1
PRMT5-fwd	TGAATTGTCGCTGAGTGC	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von PRMT5
PRMT5-rev	GGGATGCTCACACCATCAT	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von PRMT5
R060-fwd	CCTTGCTCTGGCAGTTACAA	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von R060
R060-rev	GGTACAATTGCAAGTCCTTC	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von R060
RBM10-fwd	CCAAGCCCAAGATCAATGAG	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von RBM10
RBM10-rev	CTTCTCTCGGCGTTTGAAGT	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von RBM10
S10A9-fwd	ACGCAACATAGAGACCATCATC	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von S100A9
S10A9-rev	CCTTTTCATTCTTATTCTCCTTCTTG	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von S100A9
SFPQ-fwd	GAGGAGAAGATCTCGGACTCG	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von SFPQ
SFPQ-rev	CGACATCGCTGTGTGAAGTTT	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von SFPQ
STAU1-fwd	ATGGTATCGGCAAGGATGTG	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von STAU1
STAU1-rev	TGGTCCAACCTCAGACAGCAA	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von STAU1
STK38-fwd	GGATTGGAAGATTTGAGTCCTT	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von STK38
STK38-rev	TTCTTCTGAACAAGCCGTACCT	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von STK38
TIA1-fwd-qRT	GCTGCTATGAATGGACGGAAG	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von TIA1
TIA1-rev-qRT	GGGCTGAGATCACCAACAAAG	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von TIA1
TIA1vII-Insert-S-rev	TGTGCTGACAACGGTACTAC	rev	für qRT-PCR, zusammen mit TIA1-f-qRT spezifisch für TIA1vII, bindet im Insert

TIA1vl-InsFlan-S-rev	ATGGAAATGATTGCTTGTATCTTTC	rev	für qRT-PCR, zusammen mit TIA1-f-qRT spezifisch für TIA1vl, bindet flankierende Bereiche des Inserts
VEGF_111-fwd	CAAATGTGAATGCAGATGTGAC	fwd	für qRT-PCR, erkennt Isoform 111 von VEGF, zusammen mit VEGF_145-rev zu nutzen
VEGF_121-fwd	GCAAGACAAGAAAAATGTGACAAGCC	fwd	für qRT-PCR, erkennt Isoform 121 von VEGF, zusammen mit VEGF_145-rev zu nutzen
VEGF_145-fwd	CCTGGAGCGTATGTGACAAG	fwd	für qRT-PCR, erkennt Isoform 145 von VEGF
VEGF_145-rev	GAGATCTGGTCCCGAAAC	rev	für qRT-PCR, erkennt Isoform 145 von VEGF
VEGF_148-rev	CACATCTTGAACGCGAGTC	rev	für qRT-PCR, erkennt Isoform 148 von VEGF, zusammen mit VEGF_165-fwd zu nutzen
VEGF_165-fwd	GACAAGAAAATCCCTGTGGGC	fwd	für qRT-PCR, erkennt Isoform 165 von VEGF, zusammen mit VEGF_189-rev zu nutzen
VEGF_183-fwd	CAAGAAATCCCGTCCCTGTGG	fwd	für qRT-PCR, erkennt Isoform 183 von VEGF, zusammen mit VEGF_189-rev zu nutzen
VEGF_189-fwd	TCCTGGAGCGTTCCTGTG	fwd	für qRT-PCR, erkennt Isoform 189 von VEGF
VEGF_189-rev	CCTTGCAACGCGAGTCTGTG	rev	für qRT-PCR, erkennt Isoform 189 von VEGF
VEGF_206-fwd	TGCCCGCTGCTGTCTAAT	fwd	für qRT-PCR, erkennt Isoform 206 von VEGF
VEGF_206-rev	TCTCCGCTCTGAGCAAGG	rev	für qRT-PCR, erkennt Isoform 206 von VEGF
VEGF-fwd	GTACCCTGATGAGATCGAGTAC	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von VEGF
VEGF-rev	GGCCTTGGTGAGGTTTGATC	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von VEGF
WNV-NS5-fwd	AGAGTTCGGAAAGGCCAAG	fwd	für qRT-PCR, erkennt NS5-kodierenden Bereich
WNV-NS5-rev	CAGAGCTCGAACTCCAGAA	rev	für qRT-PCR, erkennt NS5-kodierenden Bereich des WNV-Genoms, für WNV-spez. cDNA-Synthese
XIAP-fwd	TTTTGGGACATGGATATACTCAGTT	fwd	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von XIAP
XIAP-rev	AGCACTTTACTTTATCACCTTCACC	rev	für qRT-PCR, erkennt alle Isoformen von XIAP
NS3-RT	GGTCATGACCTCAAGGTCAGCTTGC	rev	für spezifische cDNA Synthese des HCV-Proteins NS3 des Genotyps 2a; Sequenzierprimer
NS4a-RT	GCATTCTCCATCTCATCAAAGCC	rev	für spezifische cDNA Synthese des HCV-Proteins NS4a des Genotyps 2a; Sequenzierprimer
NS4b-RT	GCATGGGATGGGGCAGTCCTCA	rev	für spezifische cDNA Synthese des HCV-Proteins NS4b des Genotyps 2a; Sequenzierprimer
NS5a-RT	GCAGCACACGGTGGTATCGTCC	rev	für spezifische cDNA Synthese des HCV-Proteins NS5a des Genotyps 2a; Sequenzierprimer
NS5b-RT	CCGAGCGGGGAGTAGGAAGAG	rev	für spezifische cDNA Synthese des HCV-Proteins NS5b des Genotyps 2a; Sequenzierprimer
CITE-seq	GGGGACGTGTTTTCTTT	fwd	Sequenzierprimer, bindet pCITE2a-Vektor
NS3-Seq-fwd	CCTATCCAAGGCACATGGCATCAATC	fwd	Sequenzierprimer, bindet im HCV-NS3-kodierenden Bereich
NS5a-Seq-fwd	ACAGGACTGACCACTGACAATC	fwd	Sequenzierprimer, bindet im HCV-NS5A-kodierenden Bereich
NS5b-Seq-fwd	GCGGTAATGGGAGCTTCTATG	fwd	Sequenzierprimer, bindet im HCV-NS5B-kodierenden Bereich des Genotyps 2a
TIA1-f-XhoI-cds	GGCTCGAGATGGAGGACGAGATGCCCAAGACT	fwd	Klonierungsprimer von TIA1, cds mit XhoI-Stelle
TIA1-r-XbaI-cds	GGTCTAGATCACTGGGTTTCATACCCTGCCACTCG	rev	Klonierungsprimer von TIA1, mit Stoppcodon und XbaI-Stelle
FLAG-KpnI-fwd	CATGGATTACAAGGATGACGACGATAAAGC	fwd	Hybridisierungsoligo: FLAG mit Startcodon, ohne Stoppcodon; mit FLAG-XhoI-rev hybridisieren; über KpnI und XhoI klonieren
FLAG-XhoI-rev	TCGAGCTTATCGTCGCATCCTTGTAAATCATGGTAC	rev	Hybridisierungsoligo: FLAG mit Startcodon, ohne Stopp; mit FLAG-KpnI-fwd hybridisieren
core-BamHI-fwd	CGGGATCCATGAGCACAAATCCTAAACC	fwd	Klonierungsprimer von HCV-Δcore mit NEO, mit Startcodon
Neo-XhoI-rev	CCGCTCGAGTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG	rev	Klonierungsprimer von HCV-Δcore mit NEO über BamHI und XhoI klonieren, mit Stoppcodon
EcoRV-Flag-fwd	GCGATATCGCCACCATGGATTACAAGGATG	fwd	Klonierungsprimer für N-terminalen FLAG-tag mit EcoRV-Schnittstelle; mit Startcodon

BamHI-Flag-fwd	CGGGATCCGCCACCATGGATTACAAG GATG	fwd	Klonierungsprimer für N-terminalen FLAG-tag mit BamHI-Schnittstelle; mit Startcodon
NS3-NotI-oSt-rev	ATAGTTTAGCGGCCGCGGTATGACCT CAAGGTGACG	rev	Klonierungsprimer für HCV-NS3 in pCite2a-Vektor mit NotI-Schnittstelle, hat kein Stoppcodon
NS4a-NotI-oSt-rev	ATAGTTTAGCGGCCGCGCATTCTCCA TTCATCAAAAG	rev	Klonierungsprimer für HCV-NS4a in pCite2a-Vektor mit NotI-Schnittstelle, hat kein Stoppcodon
NS4b-NotI-oSt-rev	ATAGTTTAGCGGCCGCGCATGGGATG GGGCAGTCC	rev	Klonierungsprimer für HCV-NS4b in pCite2a-Vektor mit NotI-Schnittstelle, hat kein Stoppcodon
NS5a-NotI-oSt-rev	ATAGTTTAGCGGCCGCGCAGCACACG GTGGTATCGTCC	rev	Klonierungsprimer für HCV-NS5a in pCite2a-Vektor mit NotI-Schnittstelle, kein Stoppcodon
NS5b-NotI-oSt-rev	ATAGTTTAGCGGCCCGGAGCGGGG AGTAGGAAGAG	rev	Klonierungsprimer für HCV-NS5b in pCite2a-Vektor mit NotI-Schnittstelle, hat kein Stoppcodon
NS3_BglII_fwd	ggAGATCTgGCTCCCATCTACTGCTTATG CCCA	fwd	Klonierung des HCV-Proteins NS3 in CMV2a über BglII und EcoRI klonieren ohne Startcodon
NS4a_BglII_fwd	ggAGATCTgAGCACGTGGGTCCTAGCT GGAG	fwd	Klonierung des HCV-Proteins NS4a in CMV2a über BglII und EcoRI klonieren ohne Startcodon
NS4b_BglII_fwd	ggAGATCTgGCCTCTAGGGCGGCTCTCA TC	fwd	Klonierung des HCV-Proteins NS4b in CMV2a über BglII und EcoRI klonieren ohne Startcodon
NS5a_BglII_fwd	ggAGATCTgTCCGGATCCTGGCTCCGC GA	fwd	Klonierung des HCV-Proteins NS5a in CMV2a über BglII und EcoRI klonieren ohne Startcodon
NS5b_BglII_fwd	ggAGATCTgTCCATGTCATACTCTGGA CCGG	fwd	Klonierung des HCV-Proteins NS5b in CMV2a über BglII und EcoRI klonieren ohne Startcodon
Flag-BamHI-rev	CAGATCCGCCGGGC CTTATCGTCGTCATCCTTGAATC	rev	Klonierungsprimer für N-terminalen FLAG-tag mit BamHI-Schnittstelle; ohne Stoppcodon

↔: Orientierung rev-reverse; fwd-forward

siRNA	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
siANM5	GGCCAUCUAUAAAUGUCUG	bindet im ORF von ANM5 Spleißvarianten 2-6
siG3BP1	AAAGCCUGAGCCAGUAUUA	bindet im ORF von G3BP1, alle Spleißvarianten
siGFP	GGCUACGUCCAGGAGCGCA	Kontroll-siRNA, bindet im ORF von GFP
siGRP78	GGAGCGCAUUGAUACUAGA	bindet im ORF von GRP78, alle Spleißvarianten
sihnRNP K	UCUAGCAGGAGGAUUUAUU	bindet im ORF von hnRNPK, alle Spleißvarianten
sihnRNP L	CUACGAUGACCCGCACAAA	bindet im der 5'-UTR von hnRNPL, alle Spleißvarianten
sihnRNP M	AUAUGCCAAUCCAACUAAA	bindet im ORF von hnRNPM, Spleißvariante 2 von 3
sihnRNP Q	GCAUCUCAGUUGCCAACAA	bindet im ORF von hnRNPM, Spleißvarianten 2-7
siHSP70	CGACGGAGACAAGCCCAAG	bindet im ORF von HSP70, alle Spleißvarianten
siIGF2BP1	CCGGGAGCAGACCAGGCAA	bindet im ORF von IGF2BP1, Spleißvariante 1 von 2
siJAK1	GCCUGAGAGUGGAGGUAAC	bindet im ORF von JAK1, alle Spleißvarianten
siMATR3	GUAAGAACAAGAAGAGAA	bindet im ORF von MATR3, erkennt Spleißvarianten 2-6
siMEP50	AGUUGGAGGUGCGCGGUA	bindet im ORF von MEP50, alle Spleißvarianten
siMOV10	GCAAAGAGGUGCUGACCCU	bindet im ORF von MOV10, alle Spleißvarianten
siNONO	GGCUUGACUAUUGACCUGA	bindet im ORF von NONO, alle Spleißvarianten
siPAPB1	CCUAAAUGAUCGCAAAGUA	bindet im ORF von PAPB1, alle Spleißvarianten
siRMB10	GCAAAGAGAAGAAGGAGAA	bindet im ORF von RMB10, alle Spleißvarianten
siRO60	GGAAAGAAGUUAUGAAUU	bindet im ORF von R060, alle Spleißvarianten
siS10A9	UCAAGAAGGAGAAUAAGAA	bindet im ORF von S10A9, alle Spleißvarianten
siSFPQ	GGGAAAGAGACAUGCGAAU	bindet im ORF von SFPQ, alle Spleißvarianten
siSTAU1	CCAACAAGAAGGUGGCCAA	bindet im ORF von STAU1, alle Spleißvarianten
siSTK38	GCACAUUCUGGAAGGAAA	bindet im ORF von STK38, alle Spleißvarianten
siTIA1	AUUCGAGUCUUCCAGUAU	bindet im ORF von TIA1, alle Spleißvarianten
siTIAR	UGACAGAAGUCCUUUAUCU	bindet im ORF von TIAR, alle Spleißvarianten

7.2 Putative Bindepertner von FLAG-TIA1vl

Tab. 8: Durch Massenspektrometrie identifizierte, putative Bindepertner von FLAG-TIA1vl

Protein	NCBI-Nr.	Anzahl der Spektren				
		Huh7 (-)	Huh7 (+)	HCV-pers. (-)	HCV-pers. (+)	
<i>40S ribosomal protein SA</i>	RSSA/RPSA	GI: 125969	0	4	0	12
<i>5'-3' exoribonuclease 2</i>	XRN2	GI: 30173484	2	0	0	0
<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	CH60/HSPD1	GI: 129379	3	3	1	2
<i>60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein</i>	RO60/TROVE2	GI: 52788235	8	0	0	0
<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	GRP78/HSPA5	GI: 14916999	10	12	5	19
<i>Actin, aortic smooth muscle</i>	ACTA/ACTA2	GI: 51316972	1	2	3	0
<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	ACTB	GI: 46397333	0	0	0	3
<i>APOBEC1 complementation factor</i>	A1CF	GI: 74761651	2	0	3	0
<i>ATP-dependent RNA helicase A</i>	DHX9	GI: 116241330	3	1	0	0
<i>ATP-dependent RNA helicase DHX29</i>	DHX29	GI: 110278938	0	7	0	6
<i>Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase</i>	SYEP/EPRS	GI: 288558855	0	0	0	3
<i>Clathrin heavy chain 1</i>	CLH1/CLTC	GI: 1705916	0	1	2	3
<i>Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase</i>	AL1L1/ALDH1L1	GI: 59802911	0	0	2	11
<i>DBIRD complex subunit KIAA1967</i>	K1967/KIAA1967	GI: 85701135	9	0	0	0
<i>ds- RNA-binding protein Staufen homolog 1</i>	STAU1	GI: 90185286	3	0	1	1
<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	EF1A1/EEF1A1	GI: 55584035	0	1	0	4
<i>Elongation factor 1-gamma</i>	EF1G/EEF1G	GI: 119165	0	1	0	3
<i>Elongation factor 2</i>	EF2/EEF2	GI: 119172	0	20	0	8
<i>Eukaryotic initiation factor 4A-I</i>	IF4A1/EIF4A1	GI: 46397463	0	1	0	3
<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 B</i>	EIF3B	GI: 218512094	1	15	0	28
<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 C</i>	EIF3C	GI: 6685539	0	19	0	24
<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 D</i>	EIF3D	GI: 6685526	0	2	0	0
<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 E</i>	EIF3E	GI: 41019126	0	0	0	5
<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 F</i>	EIF3F	GI: 6685511	2	8	2	14
<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 G</i>	EIF3G	GI: 23503064	0	1	0	2
<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 L</i>	EIF3L	GI: 23396631	3	13	2	18
<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 g1</i>	IF4G1/ EIF4G1	GI: 294862538	0	4	0	5
<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 g2</i>	IF4G2/EIF4G2	GI: 30315906	0	2	0	2
<i>Eukaryotic translation initiation factor 4B</i>	IF4B/EIF4B	GI: 205371761	0	1	0	2
<i>Fibrinogen alpha chain</i>	FIBA/FGA	GI: 1706799	1	1	6	3
<i>Fibrinogen beta chain</i>	FIBB/FGB	GI: 399492	1	0	2	2
<i>Filaggrin</i>	FILA/FLG	GI: 84028206	0	5	0	0
<i>Glutamine--tRNA ligase</i>	SYQ/QARS	GI: 1351170	0	2	0	0
<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1</i>	GBLP/GNB2L1	GI: 54037168	0	1	0	2
<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	HSP7C/HSPA8	GI: 123648	0	13	3	17
<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	HS90A/HSP90AA1	GI: 92090606	0	6	1	5
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>	HNRH1/HNRNPH1	GI: 1710632	12	0	8	0
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>	HNRPK/HNRNPK	GI: 48429103	16	1	5	2
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L</i>	HNRPL/HNRNPL	GI: 215274006	23	0	13	0
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M</i>	HNRPM/HNRNPM	GI: 55977747	7	0	2	1

<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q</i>	HNRPQ/SYNCRIP	GI: 92090361	2	0	0	0
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>	HNRPU/HNRNPU	GI: 254763463	0	7	0	4
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1</i>	HNRL1/HNRNPUL1	GI: 90101344	3	0	0	0
<i>Histone H4</i>	H4/HIST1H4A	GI: 51317339	0	3	0	0
<i>Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1</i>	IF2B1/IGF2BP1	GI: 296434536	18	8	16	14
<i>Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2</i>	IF2B2/IGF2BP2	GI: 224471831	3	0	5	0
<i>Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3</i>	IF2B3/IGF2BP3	GI: 254763311	6	0	3	0
<i>Keratin, type I cytoskeletal 10</i>	K1C10/KRT10	GI: 269849769	17	15	19	18
<i>Keratin, type I cytoskeletal 14</i>	K1C14/KRT14	GI: 229463044	2	4	7	6
<i>Keratin, type I cytoskeletal 16</i>	K1C16/KRT16	GI: 23503075	0	2	6	5
<i>Keratin, type I cytoskeletal 9</i>	K1C9/KRT9	GI: 239938886	7	14	19	16
<i>Keratin, type II cytoskeletal 1</i>	K2C1/KRT1	GI: 238054406	14	18	29	24
<i>Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal</i>	K22E/KRT2	GI: 239938650	9	10	19	13
<i>Keratin, type II cytoskeletal 5</i>	K2C5/KRT5	GI: 143811411	1	3	7	3
<i>Keratin, type II cytoskeletal 6A</i>	K2C6A/KRT6A	GI: 1346344	0	1	5	2
<i>Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	SYLC/LARS	GI: 48428689	0	1	0	2
<i>Matrin-3</i>	MATR3	GI: 12643409	3	0	0	0
<i>Methylosome protein 50</i>	MEP50/WDR77	GI: 32171507	1	1	3	6
<i>Non-POU domain-containing octamer-binding protein</i>	NONO	GI: 67469924	0	1	0	9
<i>Nucleolysin TIA-1 Isoform p40</i>	TIA1	GI: 206729905	18	21	13	17
<i>O-phosphoseryl-tRNA(Sec) selenium transferase</i>	SPCS/SEPSECS	GI: 62287911	12	0	0	0
<i>Peroxisomal multifunctional enzyme type 2</i>	DHB4/HSD17B4	GI: 1706396	0	11	0	11
<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i>	PARP1	GI: 130781	0	3	0	4
<i>Polyadenylate-binding protein 1</i>	PABP1/PABPC1	GI: 3183544	20	7	3	12
<i>Polyadenylate-binding protein 4</i>	PABP4/PABPC4	GI: 12229875	6	2	1	6
<i>Polypyrimidine tract-binding protein 1</i>	PTBP1	GI: 131528	2	0	0	0
<i>Prelamin-A/C</i>	LMNA	GI: 125962	0	0	0	2
<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5</i>	DDX5	GI: 129383	3	1	0	1
<i>Protein arginine N-methyltransferase 5</i>	ANM5/PRMT5	GI: 32171585	4	12	4	23
<i>Protein S100-A7 GN=S100A7</i>	S10A7/S100A7	GI: 172046820	0	2	0	0
<i>Protein S100-A9</i>	S10A9/S100A9	GI: 115444	0	3	0	0
<i>Putative helicase MOV-10</i>	MOV10	GI: 24638063	3	0	0	0
<i>Ras GTPase-activating protein-binding protein 1</i>	G3BP1	GI: 14916572	0	0	0	3
<i>Regulator of nonsense transcripts 1</i>	RENT1/UPF1	GI: 17380291	14	0	0	0
<i>RNA-binding protein 10</i>	RBM10	GI: 218512116	0	0	0	2
<i>RuvB-like 2</i>	RUVB2/RUVBL2	GI: 28201890	0	0	0	2
<i>Serine/threonine-protein kinase 38</i>	STK38	GI: 56749457	1	0	0	2
<i>Signal recognition particle 54 kDa protein</i>	SRP54	GI: 46577650	0	2	0	2
<i>Splicing factor 3A subunit 1</i>	SF3A1	GI: 2498882	1	0	0	2
<i>Splicing factor 3B subunit 1</i>	SF3B1	GI: 269849656	1	1	1	5
<i>Splicing factor 3B subunit 3</i>	SF3B3	GI: 116242787	3	2	0	4
<i>Splicing factor, proline- and glutamine-rich</i>	SFPQ	GI: 1709851	0	10	0	6

<i>Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1</i>	SND1	GI: 60415926	0	15	0	19
<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	GRP75/HSPA9	GI: 21264428	0	6	2	11
<i>T-complex protein 1 subunit theta</i>	TCPQ/CCT8	GI: 9988062	0	1	0	2
<i>Transcription intermediary factor 1-beta</i>	TIF1B/TRIM28	GI: 3183179	0	2	0	1
<i>tRNA-splicing ligase RtcB homolog</i>	RTCB/ C22orf28	GI: 74753486	0	0	0	3
<i>Tubulin alpha-1A chain</i>	TBA1A/TUBA1A	GI: 55977864	3	4	5	4
<i>Tubulin beta chain</i>	TBB5/TUBB	GI: 56757569	0	7	4	10
<i>Tubulin beta-2A chain</i>	TBB2A/ TUBB2A	GI: 75075976	4	1	0	1
<i>Tyrosine-protein kinase JAK1</i>	JAK1	GI: 215274013	0	0	1	3
<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10</i>	UBP10/USP10	GI: 2501458	0	6	0	7
<i>Ubiquitin-associated protein 2-like</i>	UBP2L/UBAP2L	GI: 109940042	0	0	0	2
<i>Unconventional myosin-Ib</i>	MYO1B	GI: 68583739	0	1	0	2
<i>Unconventional myosin-VI</i>	MYO6	GI: 122065628	0	0	0	3
<i>Valine--tRNA ligase</i>	SYVC/VARS	GI: 12644177	0	7	0	10
<i>Vigilin</i>	VIGLN/HDLBP	GI: 218511884	0	1	0	6
<i>X-ray repair cross-complementing protein 5</i>	XRCC5	GI: 125731	1	3	0	0

(-) ohne RNase-Behandlung, (+) mit RNase-Behandlung

Tab. 9: putative FLAG-TIA1vl-Bindepartner

Protein	NCBI-Nummer
MEP50 (<i>methylosome protein 50</i>)	GI:32171507
NONO (<i>non-POU domain-containing octamer-binding protein</i>)	GI:67469924
Hsp70 (<i>heat shock cognate 71 protein</i>)	GI:123648
JAK1 (<i>tyrosine-protein kinase, Janus Kinase 1</i>)	GI:215274013
hnRNP Q (<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q</i>)	GI:92090361
PAPB1 (<i>polyadenylate binding-protein 1</i>)	GI:3183544
RO60 (<i>60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein</i>)	GI:52788235
S10A9 (<i>protein S100 calcium-binding protein-A9</i>)	GI:115444
MATR3 (<i>Matrin-3</i>)	GI:12643409
MOV10 (<i>moloney leukemia virus 10 protein</i>)	GI:24638063
hnRNP L (<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L</i>)	GI:215274006
hnRNP M (<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M</i>)	GI:55977747
hnRNP K (<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>)	GI:48429103
STK38 (<i>Serin-/Threonine-protein kinase 38</i>)	GI:56749457
RBM10 (<i>RNA-binding protein 10</i>)	GI:218512116
SFPQ (<i>splicing factor, proline- and glutamine rich</i>)	GI:1709851
GRP78 (<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>)	GI:14916999
IGF2BP1 (<i>insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein1</i>)	GI:296434536
STAU1 (<i>double- stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1</i>)	GI:90185286
ANM5 (<i>protein arginine N-methyltransferase 5</i>)	GI:32171585

Publikationsliste

Tagungsbeiträge-Vorträge

E.Winkler, R. Geissler, H. Aurich, A. Mensch, N. Stöhr, S. Friedrich, S. Hüttelmaier, S.-E. Behrens: *Hepatitis C Virus replication induces expression of vascular endothelial growth factor by different mechanisms and accelerates vascularization of human hepatoma*, 22. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 14.-17.03.2012, Essen.

E.Winkler, R. Geissler, H. Aurich, A. Mensch, N. Stöhr, S. Friedrich, S. Hüttelmaier, S.-E. Behrens: *Hepatitis C Virus replication induces expression of vascular endothelial growth factor and accelerates vascularization of human hepatoma*, First international meeting-Posttranscriptional Control of Gene Expression-Mechanism and Role in Pathogenesis, 15.-17.03.2012, Halle.

Tagungsbeiträge-Poster

E.Winkler, H. Aurich, R. Geissler, A. Mensch, N. Stöhr, S. Friedrich, S. Hüttelmaier, S.-E. Behrens: *Hepatitis C Virus replication induces expression of vascular endothelial growth factor and accelerates vascularization of human hepatoma*, 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses", 08.-12.09.2011, Seattle, Washington, USA

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben und somit zum Gelingen beitrugen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Sven-Erik Behrens für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe dieses Thema zu bearbeiten. Mit seinem stetigen Interesse und kritischen Diskussionen sowie seinem Vertrauen war er maßgeblich am Entstehen dieser Doktorarbeit beteiligt.

Zudem danke ich ihm sowie Herrn Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier und Prof. Dr. Norbert Tautz für die freundliche Übernahme der Gutachten.

Bei PD Dr. habil. Ralph Peter Golbik möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Außerdem danke ich ihm und Aniseh Poshtgohian Madi für die Reinigung des TIA1-Proteins. Für die exzellenten Arbeitsbedingungen in der Zellkultur und moralischer Unterstützung bedanke ich mich bei Christine Hamann

Mein spezieller Dank gilt Dr. Anika Penzel, Dr. Jana Schuck und Dr. Torsten Gursinsky für die vielen motivierenden Diskussionen, ihre stete Hilfsbereitschaft und die angenehme Zusammenarbeit sowie Arbeitsatmosphäre.

Dr. René Geißler und Dipl.-Biochemiker Paul Knick sowie Dr. Susann Friedrich danke ich für die Zurverfügungstellung von Plasmiden und gereinigten Proteinen, sowie für konstruktive Gespräche im Laboralltag. Dr. Martina Behrens danke ich für die Bereitstellung des MVA-T7-Virus. Bei Dr. Thomas Ruppert, vom Zentrum für molekulare Biologie der Universität Heidelberg, sowie bei Dr. Angelika Schierhorn, vom Institut für Biochemie und Biotechnologie der Universität Halle-Wittenberg, bedanke ich mich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen. Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, Dr. Nadine Stöhr und Herrn Dr. Hendryk Aurich bedanken, die durch anregende wissenschaftliche Gespräche zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung Mikrobielle Biotechnologie bedanke ich mich für ein freundliches und angenehmes Arbeitsklima sowie die stets gute Zusammenarbeit.

Mein größtes Dankeschön gilt meiner Familie, meinen Eltern und meinem Freund. Ihnen danke ich für die Liebe, die ständige Unterstützung in allen Lebenslagen und dass sie unentwegt an mich geglaubt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Eileen-Christin Winkler
 Geburtsdatum 31. Mai 1984
 Geburtsort Leipzig
 Geschlecht weiblich
 Staatsangehörigkeit deutsch

Ausbildung

10/2004-09/2009 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Diplomstudium der Biologie mit Abschluss: Diplom-Biologe
 Diplomarbeit: *Einfluss der Hepatitis-C-Virus Replikation auf zelluläre Genexpression*

08/2002 - 07/2004 Thomas-Müntzer/Trotha-Gymnasium Halle (Saale)
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

08/2001 - 05/2002 Theodore F. Riggs Senior High School, Pierre, SD, USA
 Abschluss: High School Diploma

08/1995 - 06/2001 Thomas-Müntzer/Trotha-Gymnasium Halle (Saale)

08/1991 - 07/1995 Grundschule Kröllwitz Halle (Saale)

Arbeitserfahrung

seit 02/2015 Mitarbeiterin bei Visufarma GmbH

10/2009 – 12/2013 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Mikrobielle Biotechnologie
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Thema: Einfluss der RNA-Replikation des Hepatitis-C-Virus auf die Expression des *vascular endothelial growth factor A*
 Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

07/2007 - 10/2007 Studentische Hilfskraft, Abteilung Allgemeine Genetik
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

06/2005 - 09/2005 Studentische Hilfskraft am Umweltforschungszentrum
 11/2004 – 12/2004 Leipzig/Halle, Abteilung Isotopenhydrologie

Oberursel, den 20.12.2017

.....
 Eileen-Christin Winkler

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der im Quellen- und Literaturverzeichnis aufgeführten Werke angefertigt habe. Textstellen, die aus diesen Werken inhaltlich oder wörtlich übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt wurde und ich mich erstmals für die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Oberursel, den 20.12.2017

.....
Eileen-Christin Winkler