

**Inhibition der Replikation und Translation eines
subgenomischen Hepatitis C Virus Replikons durch
HCV RNA- und Kofaktor-gerichtete Strategien**

Von der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Mortimer Korf

geb. am 06.09.1967
in Hannover

2005

Referent: Prof. Dr. W. Müller
Koreferent: Prof. Dr. B. Otto
Tag der Promotion: 09. Juni 2005

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	7
2.	Abstract	8
3.	Einleitung	9
3.1	Virale Hepatitis.....	9
3.2	Hepatitis C Virus Infektion und Therapie	9
3.3	Genomstruktur.....	11
3.4	Replikationszyklus	14
3.5	Kofaktoren der HCV Replikation und Translation.....	16
3.6	HCV Replikation im Zellkultursystem.....	18
3.7	Inhibition durch Antisense Konstrukte.....	19
3.8	Mechanismus der RNA Interferenz.....	20
3.9	Mechanismus der Inhibition viraler RNA durch Ribozyme.....	23
3.10	Ziel der Arbeit	26
4	Materialien und Methoden	29
4.1	Plasmide	29
4.1.1	Allgemeine Plasmide	29
4.1.2	Expressions-Plasmide	32
4.1.3	Ribozym-Plasmide.....	32
4.1.4	tCD4-Plasmide.....	34
4.2	Geräte	35
4.3	Verbrauchsmaterialien.....	37
4.4	Chemikalien.....	37
4.5	Puffer, Lösungen und Enzyme	39
4.5.1	Puffer und Lösungen.....	39
4.5.2	Kits.....	40
4.5.3	Restriktionsendonukleasen	40
4.5.4	Enzyme	41
4.5.5	Enzymreaktionspuffer.....	41
4.5.6	Molekulargewichtsstandard	41
4.6	Organismen	42
4.6.1	Bakterien.....	42
4.6.1.1	Verwendete Bakterienstämme	42
4.6.1.2	Verwendete Kulturmedien	42
4.6.2	Eukaryotische Zelllinien	43
4.7	Molekularbiologische Methoden.....	44
4.7.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	44
4.7.2	Fusions-PCR	45
4.7.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	45
4.7.4	Agarose-Gelelektrophorese	46
4.7.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	46
4.7.6	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	47
4.7.7	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	47

4.7.8	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	47
4.7.9	Dephosphorylierung.....	48
4.7.10	Generierung glatter Enden.....	48
4.7.10.1	Abbau überhängender 5'-Enden	48
4.7.10.2	Auffüllung überhängender 5'Enden.....	49
4.7.11	Ligation.....	49
4.7.12	Plasmid-DNA-Präparationen	49
4.7.12.1	Quick-DNA-Check-Methode.....	49
4.7.12.2	Plasmid-Mini-Präparation	50
4.7.12.3	Plasmid-Maxi-Präparation	50
4.7.13	Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	51
4.7.14	DNA-Sequenzierung.....	51
4.7.15	Herstellung kompetenter Zellen	51
4.7.15.1	Herstellung chemisch kompetenter E.coli (RbCl).....	51
4.7.15.2	Herstellung elektrokompenter Bakterien	52
4.7.16	Transformation kompetenter Zellen	52
4.7.16.1	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	52
4.7.16.2	Transformation elektrokompenter Bakterien	53
4.8	Zellbiologische Methoden	53
4.8.1	Einfrieren von Zellen	53
4.8.2	Auftauen von Zellen	54
4.8.3	Zellzählung	54
4.8.4	Transiente Transfektion	54
4.8.4.1	Calciumphosphat-Präzipitation.....	54
4.8.4.2	Lipofectamine 2000	55
4.8.5	Stabile Transfektion.....	55
4.8.6	Immunofluoreszenz-Färbung.....	56
4.8.7	Magnetische Zellseparation	56
4.8.8	Propidiumiodid-Färbung.....	57
4.8.9	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS).....	58
4.8.10	Präparation nukleärer Extrakte	58
4.8.11	β -Galactosidase-Test	59
4.8.12	Luciferase-Test	60
4.9	RNA Methoden.....	61
4.9.1	RNA-Extraktion und Aufreinigung	61
4.9.2	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	61
4.9.3	RNA-Agarosegelelektrophorese.....	62
4.9.4	Northern blot.....	63
4.9.5	Radioaktive „random-primed“ DNA-Markierung.....	63
4.9.6	Hybridisierung der RNA mit radioaktiven DNA-Sonden.....	64
4.10	Biochemische Methoden.....	65
4.10.1	Proteinbestimmung nach Bradford	65
4.10.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	65
4.10.3	Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung von SDS-Gelen.....	66
4.10.4	Western blot.....	66

4.11	Retrovirale Arbeitsmethoden	68
4.11.1	Produktion von Retroviren.....	68
4.11.2	Virus-Titer-Test	68
4.11.3	Transduktion von HuH-7 mit Retroviren.....	69
5.	Ergebnisse	70
5.1	Charakterisierung der Bedeutung zellulärer Proteine für die subgenomische HCV Replikation und Translation.....	70
5.1.1	Klonierung von Sense- und Antisense-Plasmiden.....	70
5.1.2	Überexpression der Gene in monocistronischen HCV Replikonzellen	70
5.1.3	Einfluss zellulärer Proteine auf die subgenomische HCV Replikation und Translation ...	72
5.1.4	Bedeutung zellulärer Proteine für die HCV IRES-abhängige Translation im Luciferase-Reportersystem.....	74
5.2	Inhibition der Replikation und Translation des Hepatitis C Virus durch RNA Interferenz.....	76
5.2.1	Auswahl des Expressionssystems und der Zielsequenzen.....	76
5.2.2	Nachweis der intrazellulären Aktivität von shRNAs.....	78
5.2.3	RNA Interferenz im bicistronischen Luciferase Reportersystem	78
5.2.4	Inhibition der subgenomischen Replikation und Translation eines monocistronischen HCV Replikons in Huh7-Zellen durch RNAi.....	79
5.3	RNA Interferenz gegen zelluläre HCV Kofaktoren.....	81
5.3.1	Auswahl von Zielsequenzen für HCV Kofaktor-gerichtete shRNAs	81
5.3.2	Genexpression auf RNA-Ebene durch RNAi	82
5.3.3	Inhibition der genspezifischen Translation durch RNAi	83
5.3.4	RNAi gegen HCV Kofaktoren im Luciferase Reportersystem.....	84
5.3.5	Indirekte Wirkung von HCV Kofaktor-gerichteter RNAi auf die subgenomische HCV Replikation und Translation	85
5.4	Synergistische und protektive Effekte bei RNA-gerichteten Strategien.....	87
5.4.1	Synergistische Wirkung von siHCV3'X und siHuR151 im Luciferase Reportersystem .	87
5.4.2	Identifizierung verschiedener synergistischer Kombinationen im Luciferase Reportersystem	88
5.4.3	Synergismus von HCV-gerichteten und HCV Kofaktor-gerichteten shRNAs in monocistronischen HCV Replikonzellen.....	90
5.4.4	Kombination von shRNAs und Ribozymen	93
5.4.5	Nachweis der cytoplasmatischen Lokalisation von Ribozymen.....	95
5.4.6	Protektive Wirkung stabil transfizierter shRNAs in HuH-7 Zellen	97
5.5	Untersuchungen von Veränderungen biologischer Eigenschaften durch antivirale RNA-gerichtete Moleküle.....	99
5.5.1	Proliferation	99
5.5.2	Induktion von Interferon	100
5.6	Generierung eines HCV IRES-tCD4-Expressionssystems	102
5.6.1	Oberflächenexpression des tCD4-Rezeptors eines bicistronischen Reporterkonstruktes in HuH-7 Zellen.....	102
5.6.2	Generierung einer stabilen tCD4-Zelllinie.....	105
5.6.3	Funktionalität des tCD4-Expressionssystem	106
6.	Diskussion.....	107
6.1	Untersuchungen zum Einfluss zellulärer Proteine auf die subgenomische Replikation und Translation eines Hepatitis C Virus Replikons	107

6.1.1	Modulation der subgenomischen HCV Replikation und Translation durch PTB und hnRNP C	108
6.1.2	RNA Stabilisierung durch das AU-reiche Element (ARE)-bindende Protein HuR.....	110
6.1.3	Überexpression von IRF1/IRF3 induziert die Transkription von Interferon-assoziierten Genen	111
6.1.4	Proteosom-Untereinheiten PSMA1 und PSMA7.....	112
6.1.5	Der eukaryotische Initiationsfaktor 3 (eIF3)	114
6.1.6	Modulation der HCV IRES-vermittelten Luciferase Expression durch zelluläre Proteine	115
6.2	Inhibition der subgenomischen Hepatitis C Virus Replikation und Translation durch RNA Interferenz.....	116
6.2.1	Auswahl der Zielsequenzen für shRNAs gegen HCV RNA.....	117
6.2.2	ShRNAs gegen hoch konservierte 5' und 3' Regionen des HCV Replikons inhibieren die subgenomische Replikation und Translation	118
6.3	RNA Interferenz gegen zelluläre HCV Kofaktoren.....	120
6.3.1	PTB ist essentiell für die subgenomische HCV IRES-vermittelte Translation.....	121
6.3.2	PSMA7 moduliert die subgenomische HCV Replikation und Translation	122
6.3.3	RNAi gegen HuR.....	122
6.4	Synergistische Wirkung durch Kombination von HCV RNA-gerichteten Strategien	123
6.4.1	Synergistische inhibitorische Effekte von shRNA Kombinationen auf die IRES-vermittelte Translation eines Luciferase Reporters	124
6.4.2	Inhibition der subgenomischen HCV Replikation und Translation durch Kombination von shRNAs.....	125
6.4.3	Kombination aus RNA Interferenz und Ribozym-vermittelter Spaltung	126
6.4.4	Wirkung durch Kombination von U6- und tRNA ^{Val} -Promoter.....	127
6.5	Untersuchung des Zellzyklus und der Induktion von Interferon in shRNA-transfizierten Replikonzellen	129
6.6	Generierung eines HCV IRES tCD4-Expressionssystems.....	131
6.6.1	Untersuchung zur Funktionalität des HCV IRES tCD4-Expressionssystem.....	133
7.	Literatur.....	135
8.	Anhang	146
8.1	Oligonukleotide.....	146
8.1.1	SiRNA-Oligonukleotide	146
8.1.2	Sense-/Antisense-Oligonukleotide.....	148
8.1.3	Ribozym-Oligonukleotide	151
8.1.4	Diverse Oligonukleotide	151
8.2	Ribozym-Sequenzen	152
8.3	Constitutive Transport Element	152
8.4	Gene	153
8.5	Verwendete Antikörper.....	153
8.6	Hepatitis C virus [gi:22129792] - Isolat H77 - Genotyp 1a.....	154
8.7	Monocistronisches HCV Replikon-Genotyp 1b	156
9.	Abkürzungen	158
10.	Lebenslauf.....	160

1. Zusammenfassung

Das Hepatitis C Virus (HCV) ist die Hauptursache für chronische Lebererkrankungen und führt in einer Vielzahl von Fällen zur Entstehung von Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom. HCV gehört zu der Familie der *Flaviviridae* und besteht aus einem einzelsträngigen RNA-Genom in Plusstrangorientierung mit einer Länge von etwa 9,6 kB. Hoch konservierte untranslatierte 5' (IRES) und 3' Regionen schließen den HCV ORF (Open Reading Frame) ein, wobei die IRES (Interne Ribosomen Eintrittsstelle) als Bindungsstelle für Ribosomen und zelluläre Kofaktoren essentiell für die Cap-unabhängige Translation ist. Ziel dieser Arbeit war, durch verschiedene HCV RNA- und HCV Kofaktor RNA-gerichtete antivirale Strategien die subgenomische Replikation und Translation des Hepatitis C Virus zu inhibieren.

Zuerst wurden diverse zelluläre Proteine in Bezug auf ihre potentielle Rolle als Kofaktoren des HCV Replikationszyklus überprüft. Mittels PCR wurden die cDNAs mehrere Gene in Sense- und in Antisense-Orientierung in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert und transient in HuH-7 Zellen, die ein subgenomisches monocistronisches HCV Replikon exprimieren, transfiziert. Die Expression der Gene wurde zunächst auf RNA Ebene bestätigt und anschließend auf Verminderung, bzw. Erhöhung des Protein Levels überprüft. Durch die genspezifische Expression von a) PTB (Polypyrimidin Tract Binding Protein), b) PSMA7 (Proteasome α -subunit 7) und c) HuR (Human Antigen R) in Sense-Orientierung zeigte sich eine deutliche erhöhte HCV RNA und NS5B Protein Expression, wohingegen durch die genspezifische Expression von Antisense-RNA der HCV RNA und Protein Level wesentlich vermindert wurde und diese Proteine somit als essentielle HCV Kofaktoren identifiziert werden konnten.

RNA Interferenz ist ein evolutionär konservierter Mechanismus um Ziel-RNA sequenzspezifisch durch small interfering RNA zu spalten und die Genexpression zu unterbinden. So wurden Plasmid-exprimierte shRNAs, die gegen die HCV 5' und 3' UTR sowie gegen HCV Kofaktoren gerichtet sind, einerseits in einem Luciferase Reportersystem und andererseits in monocistronischen HCV Replikonzellen auf Inhibition der HCV Replikation und IRES-vermittelten Translation überprüft. ShRNAs, die gegen die hoch konservierten HCV Regionen gerichtet sind, vermochten die Replikation und Translation effektiv zu inhibieren. Durch die genspezifische Inhibition von PTB, PSMA7 und HuR konnte ein indirekter inhibitorischer, wenn auch vergleichsweise geringerer Effekt auf den HCV Replikationszyklus detektiert werden.

HCV- und HCV Kofaktor-gerichtete shRNAs wurden in unterschiedlichen Kombinationen in dem HCV Replikonsystem auf synergistische Effekte überprüft und zeigten in einigen Fällen moderate Verstärkungen des inhibitorischen Effektes. Dabei war RNA Interferenz gegen die HCV 5' UTR und gleichzeitig gegen die HCV 3' UTR besonders effektiv. Bei der Kombination von Kofaktor-gerichteten shRNAs konnte die Inhibition des HCV Replikationszyklus im Vergleich zu einzelnen shRNAs additiv verstärkt werden. In einer dualen antiviralen RNA-gerichteten Strategie wurde die Wirkung der Kombination von RNA Interferenz und Ribozym-vermittelter Spaltung auf HCV getestet. Haarnadel Ribozyme, kleine katalytische RNA Moleküle, werden dabei im Gegensatz zu U6 Promoter getriebenen shRNAs unter der Kontrolle des tRNA^{Val} Promotersystem exprimiert. Bei der Nutzung unterschiedlicher Systeme konnte die subgenomische HCV Replikation und Translation durch Kombinationen von HCV-gerichteten shRNAs und HCV-gerichteten Haarnadel Ribozymen besonders effektiv inhibiert werden.

In Proliferationsuntersuchungen wurde dann ausgeschlossen, dass die Inhibition von zellulären Proteinen durch shRNAs neben der HCV inhibitorischen Wirkung auch zur Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der HuH-7 Zellen führte. Die Induktion von Interferon aufgrund der Expression von small hairpin RNAs, Ribozymen und Antisense-RNA in den HuH-7 Zellen wurde anschließend durch Überprüfung einer möglichen Aktivierung des Interferon-induzierten Jak-Stat-Signalweg ausgeschlossen.

Für die Identifikation von Gensequenzen neuer effektiver HCV inhibierender siRNAs und Ribozyme aus Bibliotheken wurde ein tCD4-Expressionssystem entwickelt und stabil in HuH-7 Zellen exprimiert, bei dem ein funktionell inaktiver CD4-Oberflächenrezeptor unter der Kontrolle der HCV 5' und 3' Region translatiert wird. Effiziente HCV 5' und 3' UTR- oder HCV Kofaktor-gerichtete siRNAs und Ribozyme unterbinden die Oberflächenexpression von CD4 und können dadurch identifiziert werden.

Schlagwörter: Hepatitis C Virus, RNA Interferenz, Ribozym

2. Abstract

Persistent infection with Hepatitis C virus (HCV), a member of the *Flaviviridae* family of viruses, is a major cause of chronic liver disease. HCV infection can lead to the development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The HCV genome is a positive-stranded ≈ 9.6 -kb RNA molecule consisting of a single open reading frame (ORF), which is flanked by highly conserved 5' and 3' UTR. The HCV 5' UTR contains a highly structured internal ribosome entry site (IRES) that serves as a binding site for 40s ribosomes and necessary cofactors.

The aim of this study was to inhibit subgenomic HCV replication and translation by different HCV- and HCV cofactor-directed antiviral strategies.

Initially, several selected cellular proteins were tested for their role as potential cofactors of the HCV replication cycle. Genes were amplified by PCR and inserted in sense and antisense orientation into a eucaryotic expression vector. HuH7 cells that stably express a subgenomic monocistronic HCV replicon were transfected with sense and antisense plasmids and analyzed for gene expression as well as the decrease or increase of gene specific protein expression. These methods allowed identification of cellular proteins which are essential HCV cofactors. HCV RNA and NS5B protein expression were enhanced significantly by gene expression of a) PTB (Polypyrimidine Tract Binding Protein), b) PSMA7 (Proteasome α -subunit 7) and c) HuR (Human Antigen R) in sense orientation, whereas expression of gene specific antisense RNA diminished HCV RNA and protein levels.

RNA interference is an old evolutionarily conserved mechanism that is triggered by small interfering RNA, which is responsible for specific cleavage of target sequences. A panel of plasmid-based small hairpin RNAs targeting highly conserved HCV 5' and 3' regions and HCV cofactors were designed and tested for inhibition of HCV replication and IRES-mediated translation in a luciferase reporter system and in subgenomic HCV replicon cells. ShRNAs targeting highly conserved HCV regions inhibited subgenomic HCV replication and translation efficiently. A clear but comparatively slighter inhibitory effect on HCV replication cycle could be shown by gene specific inhibition of PTB, PSMA7 and HuR.

Synergistic effects of combinations of HCV and HCV cofactor-directed shRNAs were tested and shRNAs revealed moderate increase of the HCV inhibitory effect. The combination of HCV 5' and 3'UTR-directed shRNAs have been especially effective. Silencing of two HCV cofactors simultaneously by shRNA combination showed an additive enhancement of HCV replication cycle inhibition compared with single shRNAs. Next, the effect of RNA interference and hairpin ribozyme-mediated cleavage on HCV has been tested in a dual antiviral RNA-directed strategy by combining shRNAs and ribozymes. Hairpin ribozymes are small catalytic RNA molecules under the control of the tRNA^{Val} promoter in contrast to shRNAs which are driven by U6 promoter. HCV-directed ribozyme and shRNA combinations revealed a strong inhibition of HCV subgenomic replication as well as IRES-mediated translation.

It is possible that viability of shRNA-transfected HuH7 cells could have been impaired by inhibition of cellular proteins that might have essential functions. The possibility of unwelcome effects was ruled out by examination of cell cycle proliferation. Transfection of shRNAs, ribozymes or antisense RNA might also lead to the induction of interferon by activating the Jak/Stat-signal pathway. The induction of interferon was excluded to confirm the specific HCV inhibitory effects of RNA-directed strategies.

In order to identify new, efficient HCV inhibiting siRNAs and ribozymes from libraries, a CD4 expressionsystem was developed and stably expressed in HuH7 cells: a functional inactive CD4 surface receptor is expressed under the control of HCV 5' and 3'UTR. Efficiently cleaving HCV 5' and 3'UTR-directed shRNAs and ribozymes prevent CD4 surface expression and can be easily identified.

Keywords: hepatitis C virus, RNA interference, ribozyme

3. Einleitung

3.1 Virale Hepatitis

Als Hepatitis wird ein Krankheitsbild bezeichnet, das sich primär auf die Leber beschränkt und nur sekundär andere Organsysteme in Mitleidenschaft zieht. Neben Autoimmunhepatitiden, alkoholtoxischen Hepatitiden, der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) und metabolischen Lebererkrankungen sind vor allem virusbedingte Hepatitiden durch Hepatitis A Virus (*Picornaviren*) [1], Hepatitis B Virus (*Hepadnaviren*) [2], Hepatitis C Virus (*Flaviviren*) [3], Hepatitis D Virus (*Hepadnaviren*) [4], Hepatitis E Virus (*Caliciviren*) [5], Hepatitis G Virus (*Flaviviren*) [6, 7] und Transfusion Transmissible Virus (*Circinoviren*) [8] vorherrschend. Einige Hepatitiserkrankungen können neben der unterschiedlichen Ätiologie und Klinik pathologische, nekrotisierende Veränderung des Leberparenchyms verursachen. Trotzdem kann manche Hepatitis auch durch symptomloses Trägertum gekennzeichnet sein, das auch ohne Dauerschäden der Leber vorkommen kann. Andere Formen der Hepatitis gehen schnell in eine chronisch verlaufende Hepatitis über, die im leichten Fall als milder nicht aggressiver Prozess verläuft und als chronisch-persistierende Hepatitis bezeichnet wird. Ausschlaggebend ist dabei, dass es nur zu einer ganz geringen Virusreplikation kommt und auch nur minimale Leberveränderungen zur Folge hat. Eine wesentlich schlechtere Prognose hat dabei die chronisch-aggressive Hepatitis, eine progrediente Lebererkrankung, die sich durch chronische hochreplikative Phasen (Virämie) auszeichnet und mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer irreversiblen Zerstörung der Läppchen- und Gefäßstruktur der Leber mit Bildung von Regeneratknoten (Leberzirrhose) führt. Letztlich kommt es bei einem Teil der Patienten mit Leberzirrhose auch zur Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms.

3.2 Hepatitis C Virus - Infektion und Therapie

Das Hepatitis C Virus (HCV) ist ein einzelsträngiges RNA-Virus in Plusstrangorientierung mit ca. 9,6 kB Länge und gehört zur Familie der *Flaviviridae* [9], in die auch das Gelbfieberevirus und das Denguevirus eingeordnet werden. HCV stellt ein bedeutendes gesundheitliches Problem dar, weil es zu chronischen Lebererkrankungen und in etwa 20% der HCV Infektionen auch zu der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms führt. HCV wird durch direkten Kontakt mit Blut und anderen Körperflüssigkeiten infizierter Personen

übertragen, wobei infizierte Blutkonserven, kontaminierte Injektionsbestecke von Drogenabhängigen sowie ungeschützter Geschlechtsverkehr als Hauptübertragungswege gelten. Weltweit sind 1-2% der Weltbevölkerung chronisch mit dem Hepatitis C Virus infiziert.

HCV besitzt eine hohe genetische Varianz, die zur Entstehung von 12 bisher bekannten Genotypen führte. Innerhalb dieser Genotypen wurden darüber hinaus zahlreiche genetisch modifizierte Subtypen klassifiziert. Transkriptionsungenauigkeit bei gleichzeitiger mangelhafter Proofreading Aktivität der viralen RNA-abhängigen RNA Polymerase während des HCV-Replikationszyklus (Abb.3.2) begünstigen die Etablierung genetischer Veränderungen im Virusgenom. So kann es im Bereich hypervariabler Regionen (HVR) zu entscheidenden Mutationen kommen, die zu neuen HCV Varianten führen oder neue rekombinante Hepatitis C Viren durch gleichzeitige Infektion mit zwei verschiedenen HCV Subtypen entstehen lassen. Dabei sind hauptsächlich Bereiche in den variablen Sequenzen der Hüllproteine (E1/2), des Core Proteins sowie des Nichtstrukturproteins NS5A (Abb.3.1) betroffen und ermöglichen dem Virus, dem Immunsystem durch veränderte Antigenstrukturen zu entkommen („immune escape“). Gerade aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer Therapieansätze, insbesondere von Kombinationen aus unterschiedlich wirkenden Substanzen, von besonderer Bedeutung. Dabei stellt die Entwicklung einer chronischen Hepatitis C ein besonderes Problem dar. Studien haben gezeigt, dass bei über 90 % der Patienten, denen bei einer frischen HCV Infektion sofort Interferon α über einen längeren Zeitraum in hoher Dosis appliziert wurde, keine HCV-RNA mehr nachweisbar war [10]. Da aber 80 % der akuten HCV Infektionen inapparent sind und deshalb oft unerkannt bleiben, gehen diese schließlich in chronische Hepatiden über. Bei einem großen Teil der Patienten mit chronischer HCV-Infektion treten fibrotische Veränderungen der Leber auf, die im weiteren Verlauf zur Leberzirrhose und zur Entwicklung eines hepatozellulärem Karzinoms (HCC) führen. Nach Lebertransplantation aufgrund HCV-induzierter Leberzirrhose oder HCC wurde bei zahlreichen transplantierten Patienten eine Reinfektion durch extrahepatische HCV Manifestationen diagnostiziert. Darüber hinaus führt die antivirale Behandlung bei vielen Patienten nicht zu einem Abfall der HCV-RNA unter die Nachweisgrenze (Non-responder oder bei zuerst auf die Therapie ansprechende Patienten zeigte sich nach Therapieende wieder ein erhöhter HCV-RNA Spiegel (Relapse-Patienten)). Die mangelhafte Effizienz der aktuellen HCV-Therapie macht die Entwicklung neuer antiviraler Strategien dringend notwendig. Die ursprüngliche Monotherapie mit Interferon α , die bei 20% der Patienten eine Heilung erzielte [11], wurde durch eine Kombinationstherapie mit Ribavirin wesentlich verbessert [12]. Eine

weitere Steigerung der Effektivität erfolgte durch chemische Modifikation des Interferons in Form einer Pegylierung [13] und durch die Kombinationstherapie mit Amantadin, einem chiralen trizyklischen Amin.

Ziel neuer HCV-gerichteter Therapieansätze ist eine spezifische und effektive Spaltung hochkonservierter Bereiche der genomischen HCV-RNA. Katalytische RNA-Moleküle, sogenannte Ribozyme, sind in der Lage spezifisch HCV-RNA in-vitro effektiv zu inhibieren, wobei eine erste in-vivo Pilotstudie nur bei 3 von 33 Patienten erfolgreich war. RNA Interferenz, eine spezifische Spaltung von RNA durch einen *RNA-Induced-Silencing-Complex* (RISC), zeigt in neuesten Studien in vitro eine noch effektivere Inhibition viraler HCV-RNA als Ribozyme. So könnten diese neuen antiviralen Strategien in Kombination mit Interferon und Ribavirin zur Optimierung der HCV-Therapie führen.

3.3 Genomstruktur

Das Hepatitis C Virus besteht aus einer Lipidhülle mit den viralen Oberflächenglykoproteinen E1 (gp33) und E2 (gp70) und hat einen Durchmesser von etwa 50nm. Im Inneren des Viruspartikels umgibt das Capsid, bestehend aus Core Protein Partikeln, das Genom mit einer Länge von etwa 9600 Nukleotiden, das aus einer einzelsträngigen RNA in Plusstrangorientierung besteht [3]. Das RNA-Genom des HCV beinhaltet einen offenen Leserahmen (Open Reading Frame), von dem ein Polyprotein von ca. 3000 Aminosäuren abgelesen wird [14]. Der HCV Leserahmen wird von 5' und 3' nicht-kodierenden Regionen umschlossen, die unter den verschiedenen HCV Genotypen hochkonserviert sind.

Die 5'UTR (untranslatierte Region) besteht aus ca. 341 Nukleotiden und faltet sich zu einer stark ausgebildeten, stabilen Sekundärstruktur, die insgesamt 4 stem loops mit intramolekularen, doppelsträngigen Sequenzabschnitten bildet. Diese Sekundärstruktur wird als HCV Internal Ribosomal Entry Site (IRES) bezeichnet [15] und initiiert die Translation des HCV-Genoms cap-unabhängig im Gegensatz zur cap-abhängigen Translation zellulärer mRNAs. Da das virale Genom bereits als RNA in Plusstrangorientierung vorliegt, erkennen die ribosomalen Untereinheiten das HCV-Genom als mRNA, binden an die IRES und interagieren mit dem Methionin-AUG-Startcodon des Polyproteins um die Translation zu initiieren. Eine besondere Rolle scheinen auch verschiedene zelluläre Proteine in der Funktion als Kofaktoren und RNA-bindende Proteine der HCV Replikation und Translation zu spielen.

Die untranslatierte 3'Region hinter dem offenen Leserahmen des Hepatitis C Virus besteht aus einer wenig konservierten 30-40 Nukleotide langen Region, einem Polypyrimidintrakt aus etwa 20-200 Nukleotiden und abschließend einer abermals hochkonservierten Region von 98 Nukleotiden (3'X), die ebenfalls eine aus 3 stem loops gefaltete Sekundärstruktur ausbildet. Die 3'X Region des HCV ist für die Initiierung der Synthese der Minusstrang-RNA unter Bildung eines Membran-assoziierten Komplex mit der NS5B RNA Polymerase und zellulären Proteinen von besonderer Bedeutung, zusätzlich stimuliert die 3'X Region die HCV IRES-abhängige Translation [16].

Während der Translation prozessieren zelluläre und virale Proteasen das Polyprotein in drei virale Strukturproteine und mindestens sechs virale Nichtstrukturproteine [17]. Das Core Protein ist ein ca. 21 kDa großes basisches Strukturprotein und bildet das Capsid (Abb.3.1). Durch die hohe Anzahl basischer Aminosäuren interagiert es mit dem RNA-Genom zum Nukleokapsid. Das carboxyterminale Ende des Core Proteins ist stark hydrophob und wirkt im Polyprotein als Signalpeptid für die Inkorporation der folgenden, in Translation befindlichen Strukturproteine E1 und E2 in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums und bewirkt dann erst die Spaltung durch zelluläre Signalpeptidasen. Dem Core Protein werden darüber hinaus umfangreiche Einflüsse auf zelluläre Prozesse zugeschrieben. In transgenen Mäusen induziert die Expression des Core die Entwicklung von Leberentzündungen und hepatozellulärem Karzinom [18]. Weiter interagiert das Core Protein mit dem *Tumornekrosefaktor Alpha* (TNF- α), wodurch weitere Cytokine freigesetzt werden, die für eine inflammatorische Reaktion bei der HCV-Infektion verantwortlich sind [19]. Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass bei HBV und HCV Koinfektionen die Genexpression und Replikation des HBV durch das HCV Core Protein supprimiert wird [20]. Darüber hinaus aktiviert das HCV Core Protein TGF Beta 1 (*Transforming Growth Factor - Beta 1*), welcher eine entscheidende Rolle bei der Narbenbildung und der HCV-abhängigen Fibrose spielt [21].

Die Strukturproteine E1 und E2 sind ca. 33 und 70 kDa große glykosylierte Proteine (Abb.3.1), die als stabile Heterodimere über eine hydrophobe Aminosäurefolge im carboxyterminalen Bereich in der Hüllmembran des HCV verankert sind. Die E1 und E2 Proteine verschiedener HCV Genotypen unterscheiden sich beträchtlich, was auf das Vorhandensein zweier hypervariablen Regionen (HVR1/ HVR2) im Bereich des E2 Proteins zurückzuführen ist [14, 22]. Diese Regionen verändern sich durch die hohe Mutationswahrscheinlichkeit des Virus und dem gleichzeitigen Selektionsdruck durch das Immunsystem. Die durch Mutation veränderten E1/E2 Hüllproteine sind als Epitop auf der

Hüllmembran durch Antikörper, die die ursprüngliche HVR Region als Epitop erkannt haben, nicht mehr zu binden („immune escape“). Darüber hinaus wird bei dem E2 Hüllprotein eine Funktion zur Hemmung antiviraler Abwehrmechanismen vermutet. Nach der Induktion durch Interferon vermindert die dsRNA-aktivierte Proteinkinase (PKR) normalerweise die Proteinsynthese durch Phosphorylierung des eukaryotischen Initiierungsfaktors eIF2a. In Zellen, die E2 exprimieren unterbleibt diese Reaktion, so dass die Translation trotz Interferon fortgeführt wird [22, 27, 28]. Das zwischen den Struktur- und Nichtstrukturproteinen gelegene HCV Protein p7 (Abb.3.1) wurde nach neuesten Erkenntnissen als Membranprotein mit der Funktion eines Ionenkanals beschrieben [23, 24].

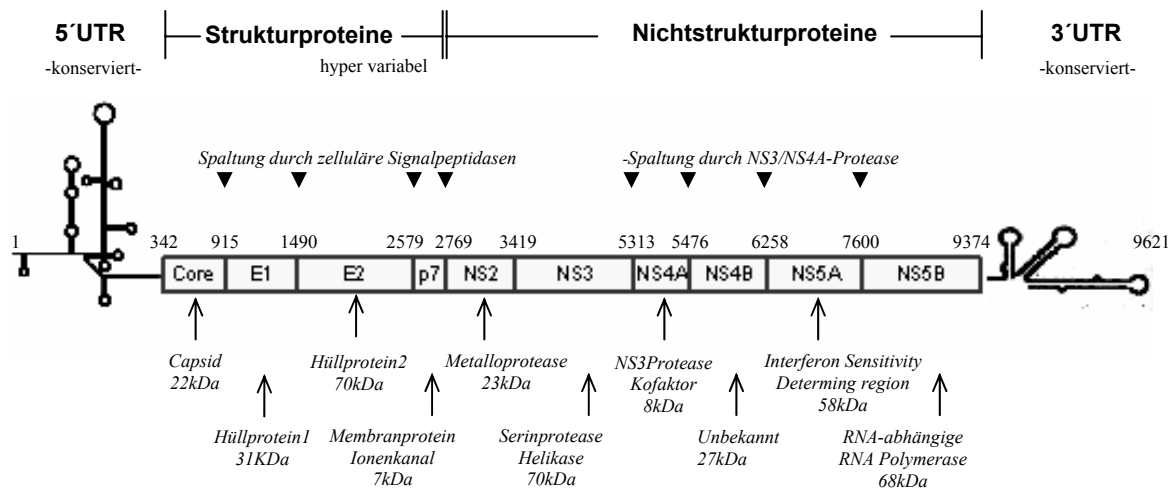


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Genoms des Hepatitis C Virus. Dargestellt ist der Open Reading Frame sowie die beiden 5' und 3' nicht kodierenden Regionen mit ihren potentiellen Sekundärstrukturen. Die Spaltung des Polyproteins in einzelne Proteine wird durch zelluläre, bzw. virale Proteasen umgesetzt. Die proteolysierten Proteine sind mit ihrer Funktion und Molekulargröße angegeben.

Das Nichtstrukturprotein NS2 ist ein 23 kDa großes hydrophobes Protein und besitzt in seinem carboxyterminalen Bereich eine katalytische Domäne einer Zn^{2+} -abhängigen Metalloprotease (NS3) (Abb.3.1) [25]. Dabei kommt es zu einer autokatalytischen Spaltung zwischen NS2 und NS3 des HCV Polyproteins. Neben der Funktion einer Serinprotease zur ebenfalls autokatalytischen Spaltung zwischen NS3 und NS4 [29] besitzt das Nichtstrukturprotein NS3 auch eine Helikasefunktion zur Entwindung von Sekundärstrukturen, die sich während der Replikation als störend erweisen würden [30, 31]. NS4A ist ein kleines Protein von ca. 8 kDa (Abb.3.1), dass neben der Funktion als Kofaktor

der NS3/ NS4-Protease auch an der Phosphorylierung des NS5A-Proteins beteiligt ist. Die Funktion des 27 kDa großen NS4B ist nicht bekannt. NS5A ist 58 kDa groß (Abb.3.1) und hat vermutlich transaktivierende Funktionen, in der sogenannten *Interferon Sensitivity Determining Region* (ISDR) von NS5A scheinen Mutationen dieser Region mit dem Ansprechen von Patienten auf die Therapie mit Interferon alpha zu korrelieren [26, 32]. Das Protein NS5B hat eine Größe von 68 kDa und konnte als RNA-abhängige RNA Polymerase identifiziert werden [33].

3.4 Replikationszyklus

Das Hepatitis C Virus infiziert in erster Linie die humanen Hepatozyten. Auch an experimentell infizierten Schimpansen [*Pan troglodytes*] wurde die Infektion gezeigt [44] und kann mittels immunhistochemischer Methoden oder in-situ Hybridisierung nachgewiesen werden [45]. Die Tatsache, dass alle Patienten, die eine Lebertransplantation erhalten haben, anschließend wieder re-infiziert wurden [46] lässt auf eine extrahepatische Virusvermehrung schließen. So wurde die Virusreplikation durch sensitive RT-PCR-Methoden extrahepatisch unter anderem in oralem Karzinomgewebe des Mundes [47], allgemein in der Mundschleimhaut [48], in peripheren dendritischen Blutzellen [49], in Knochenmarkszellen [50] und in der Speicheldrüse [51] nachgewiesen.

Die Adsorption des infektiösen HCV Partikels an die Rezeptoren der Zelloberfläche ist noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch scheinen die Glykoproteine E1 und E2 der Hüllmembran des Virus für die Rezeptorbindung und die Fusion von Virusmembran und Zellmembran im Cytoplasma verantwortlich zu sein. Das virale E2-Protein vermittelt dabei die Bindung an die zellulären Rezeptoren [52]. Als Bindungspartner von E2 sind mehrere zelluläre Rezeptoren diskutiert worden, wobei ein Zusammenspiel von mehreren Faktoren am wahrscheinlichsten ist. So konnte die Bindung des HCV an das CD 81-Molekül nachgewiesen werden [53]. Es wurde gezeigt, dass ursprünglich CD81 negative Zellen nach induzierter Expression von CD81 für die Infektion des Hepatitis C Virus zugänglich waren [54]. Außerdem bindet rekombinantes E2-Protein auch an CD81 von Tamarinen [*Saguinus oedipus*], afrikanischen Affen, die vorher nicht für HCV zugänglich waren [55]. CD81 hat vier Transmembranbereiche und bildet dementsprechend zwei extrazelluläre Loops, von denen der kleinere für die korrekte Oberflächenexpression des großen Loops, der mutmaßlichen Bindungsstelle des E2-Proteins, verantwortlich ist [56]. Der *Human Scavenger Receptor Class B Type 1* (SR-B1), ein *High Density Lipoprotein Internalization Molecule*,

wurde kürzlich als weiterer Kofaktor für den Eintritt von HCV in die Zelle identifiziert. Dabei wurde durch eine spezifische Blockierung von SR-B1 durch Antikörper die Infektiösität von HCV verhindert [57]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass HCV in Verbindung mit dem „low density protein“ als Komplex mit dem LDL Rezeptor reagiert und eine endocytotische Aufnahme fördert. Die Anzahl der LDL Rezeptoren korrelierte dabei mit der Menge aufgenommener viraler Partikel in der Zelle und war unabhängig von der Menge an CD81-Molekülen [58]. Der Mechanismus der Adsorption ist noch nicht vollkommen aufgeklärt, jedoch scheint es, dass eine Reihe von Faktoren und deren Zusammenspiel für eine optimale Adsorption und Aufnahme des Hepatitis C Virus nötig sind.

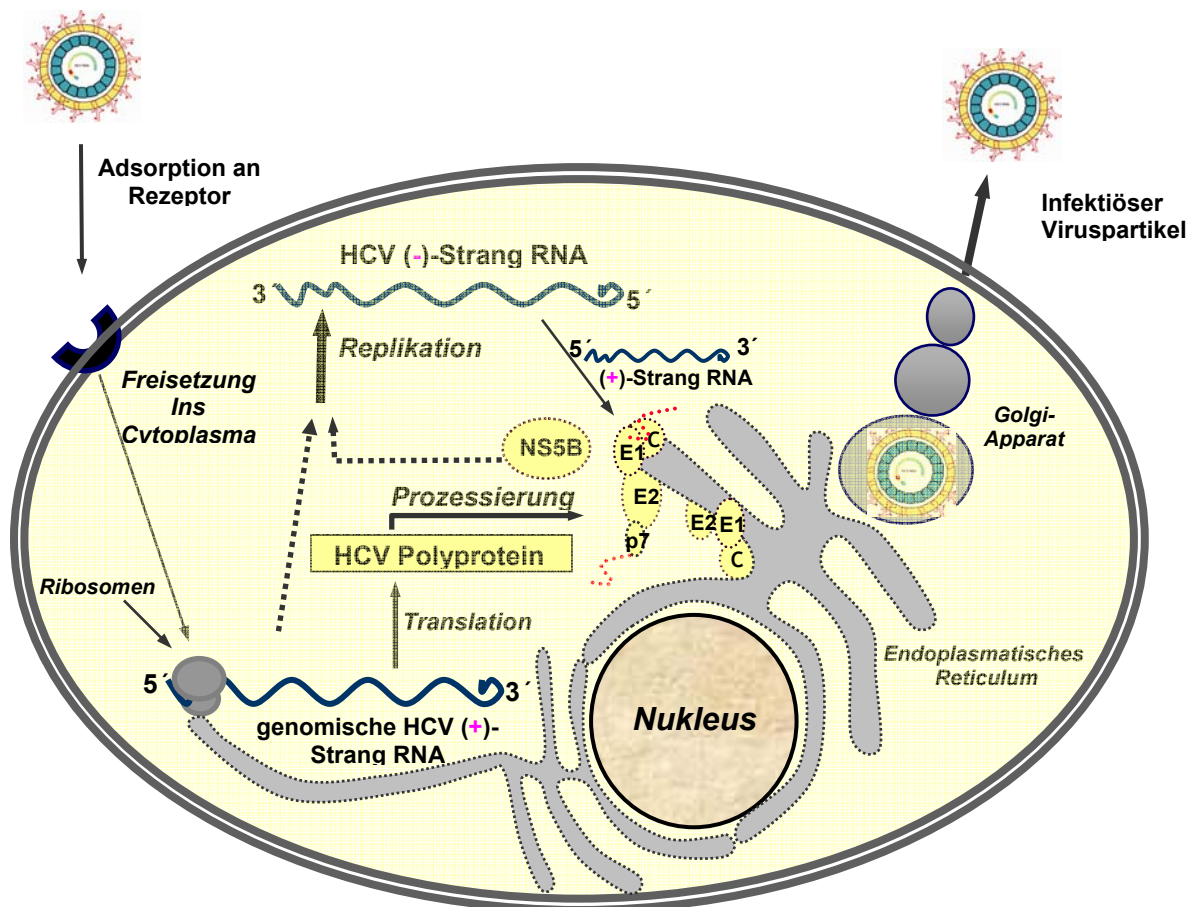


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des HCV Replikationszyklus.

Nach der Adsorption an der Zelloberfläche gelangt das Virus durch Endocytose in die Zelle. Durch Ansäuerung des Endosoms über eine ATP-abhängige H⁺-Ionenpumpe verschmilzt die Endosomenmembran unter Mithilfe des E-Proteins mit der des Virus und entlässt die genomische (+)-Strang-RNA ins Cytoplasma. Dort kommt es zur Ausbildung der

charakteristischen Sekundärstruktur der HCV Internal Ribosome Entry Site [59] und der nicht-kodierenden 3' Region. Die IRES interagiert daraufhin mit den zellulären Untereinheiten der Ribosomen und beginnt die Translation des Polyproteins. Der Vorgang wird kurzzeitig nach der Translation des aminoterminalen Bereiches des Core Proteins gestoppt, da eine hydrophobe Domäne im Bereich des carboxyterminalen Endes als Signalsequenz wirkt. Sie interagiert mit dem *Signal Recognition Particle* (SRP), einem aus mehreren zellulären Proteinen bestehenden Komplex, und bewirkt den Transport zum endoplasmatischen Retikulum [60]. Die Translation wird dann fortgeführt und bleibt dann fortwährend eng mit dem ER assoziiert. Dabei werden die Transmembran-Domänen der E-Proteine in der Lipidschicht verankert. Zelluläre und virale Proteasen prozessieren das Polyprotein dann in die einzelnen funktionellen Proteine. Sobald die RNA-abhängige RNA Polymerase (NS5B) im Cytoplasma prozessiert vorliegt, schreibt sie die genomische (+)-Strang RNA in den Minusstrang um, der in erster Hinsicht der Neubildung und Vervielfältigung von genomischer Plusstrang-RNA dient, die letztendlich im Vergleich zum Minusstrang in 10-facher Menge vorliegt [61].

Die Morphogenese zu infektiösen Hepatitis C Viruspartikeln findet letztlich ebenfalls an der ER Membran statt. Das an das ER angelagerte Core Protein bindet aufgrund seines basischen Charakters die neu synthetisierte Plusstrang-RNA und interagiert ebenso mit den in die ER Membran eingelagerten E-Proteinen und initiiert so die Einstülpung der Membran zu neuen Partikeln. Durch den Golgi-Apparat werden die neuen Viren zur Zelloberfläche gebracht und dort durch Verschmelzung von ER Membran und Zellmembran entlassen.

3.5 Kofaktoren der HCV Replikation und Translation

Das Hepatitis C Virus ist für die Aufrechterhaltung des viralen Replikationszyklus neben den viruseigenen Proteinen, wie die NSS2/3-Protease und die NS5B-Polymerase vor allem auch auf die Nutzung von zellulären Proteinen angewiesen. Dabei konnte für eine Vielzahl von zellulären Proteinen eine Interaktion mit der HCV RNA, insbesondere mit den hochkonservierten 5' und 3' Regionen, nachgewiesen werden. So wird für die Translation des HCV Polyproteins neben zum Teil auch noch unbekanntem Faktoren der Translationsapparat der Wirtszelle genutzt, bei dem ein Komplex, bestehend aus 40S Ribosomen/ eIF2/ GTP/ Met-tRNA^{Met} zur cap-unabhängigen Translation an die HCV IRES bindet [34]. Dabei wurden vor allem eIF2B γ und eIF2 γ als für die HCV IRES-vermittelte Translation wichtige

Kofaktoren identifiziert [35]. Als weiteres Element dieses Translationsapparates wurde der eukaryotische Initiationsfaktor 3 (eIF3), der aus mehreren Untereinheiten besteht, nachgewiesen und seine Bindung an den „stem loop III“ des HCV gezeigt [36]. Bei einigen zellulären RNA-Bindungsproteinen, wie PTB (*Polypyrimidine Tract Binding Protein*, 57 kDa) [37], hnRNP C (*Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein C*) [104] sowie dem humanen LA Autoantigen (50 kDa) [38] wurde ebenfalls die Protein-Bindung an verschiedenen Stellen im HCV Genom nachgewiesen und zusätzlich auch die Modulation der HCV IRES Aktivität durch diese zellulären Proteine gezeigt [39, 40].

Ein weiteres zelluläres Protein, bei dem eine Modulation der HCV IRES-vermittelten Translation gezeigt werden konnte, ist PSMA7 (*Proteasome Alpha-Subunit 7*) [42], welches eine Untereinheit des 20S Proteosoms ist. Das 20S Proteosom selbst ist ein multikatalytischer Komplex und besteht aus zwei äußeren Ringen mit jeweils 7 α -Untereinheiten und zwei inneren Ringen mit jeweils 7 β -Untereinheiten (Abb.3.3). Das 20S Proteosom und zwei Einheiten des 19S Proteosomen setzen sich zum katalytisch aktiven 26S Proteosomen mit Peptidase Aktivität zusammen. Das Proteosomen ist eine Komponente des ATP-abhängigen proteolytischen Weges und katalysiert den Abbau kritischer regulatorischer Proteine (z.B. Cycline) sowie transkriptioneller Regulatoren (z.B. I κ B) [43].

Bei dem RNA-Bindungsprotein HuR (*Human antigen R*, 38 kDa), das an AU-reichen Regionen bindet, konnte nachgewiesen werden, dass es an den Positiv- als auch an den

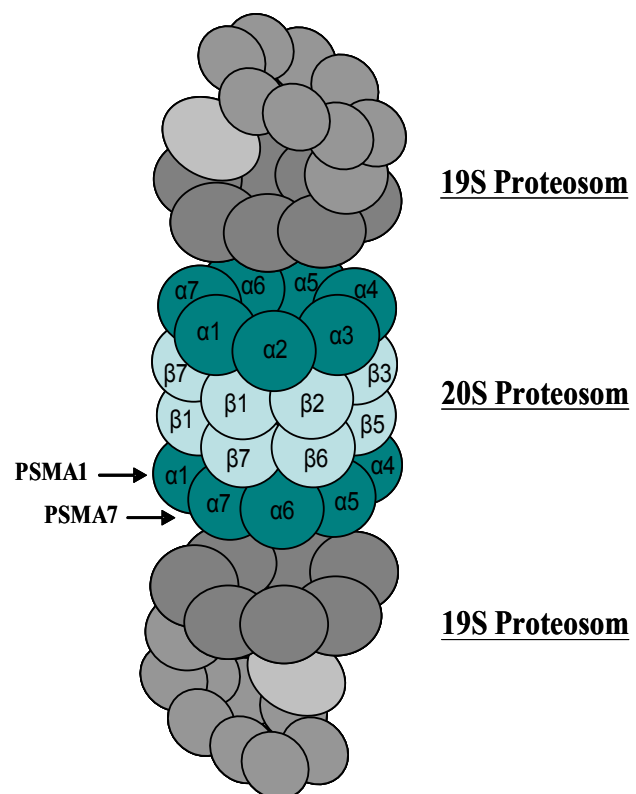


Abb.3.3: Schematische Darstellung des 26S Immuno-proteosoms. Dargestellt sind das zylinderförmige 20S Proteosomen und die beiden endständigen V-förmig eingestülpten 19S Proteosomen. Das 20S Proteosomen setzt sich aus 14 α - und 14 β - Untereinheiten zusammen. Die Positionen von PSMA1 und PSMA7 im 20S Proteosomen sind angezeigt.

Negativstrang von HCV bindet und vermutlich HCV RNA-stabilisierende Eigenschaften besitzt [41].

3.6 HCV Replikation im Zellkultursystem

Zur Erforschung der Mechanismen der Infektion und Replikation sowie zur Erprobung neuer antiviraler Therapieansätze wurden HCV replizierende Zellkulturen etabliert. Eine kurzzeitige Infektion humaner und simianer Hepatozyten konnte durch Kultur mit hochtitrigen HCV-positiven Seren erreicht werden [62]. Erst 1997 gelang die Zusammensetzung eines HCV cDNA Klons (H77 - Genotyp 1a) in mehreren Schritten aus dem Serum eines HCV infizierten Patienten [63]. Die Infektiosität konnte dann im Schimpansen-Modell einwandfrei nachgewiesen werden. Dabei wurde *in vitro* aus der erstellten cDNA eine Full-length-RNA synthetisiert und direkt in die Schimpansenleber injiziert. Im Verlauf der Infektion konnte die virale Replikation eindeutig nachgewiesen werden [64].

Die erste Zelllinie, die eine virale Replikation mit messbarem Level von HCV RNA des Genotyps 1b aufwies, wurde erst 1999 etabliert. In diesem Zellkultursystem mit bicistronischem Transkript steuert die EMCV IRES (*Encephalomyocarditis Virus*) die Expression der Nichtstrukturproteine NS3-NS5B mit abschließendem HCV 3'UTR, während die Strukturproteine nicht vorhanden sind. Die HCV IRES hingegen steuert die Expression der Neomycinphosphotransferase, mit der eine Selektion dieser HuH-7 Zellen mit G 418 gelang [65]. Dieses Konstrukt konnte daraufhin schon als Modell für die Testung von Interferon α eingesetzt werden. Mittlerweile gelang die Etablierung eines neuen subgenomischen Replikons (I389/hyg-ubi/NS3-3'/5.1)' in HuH-7 Zellen, bei der allerdings die Nichtstrukturproteine NS3-NS5B unter der Kontrolle der HCV IRES exprimiert werden. Dieses monocistronische subgenomische Replikon ermöglicht die Untersuchung der Replikation von HCV und die Überprüfung von antiviralen Strategien [56].

Da das HCV Genom durch seine viruseigene ungenaue RNA-abhängige RNA Polymerase über eine hohe Mutationsrate während der Replikation verfügt, kann es bei der Entwicklung von antiviralen Substanzen immer wieder zu Resistenzentwicklungen kommen. Um diese Möglichkeit zu minimieren, sollten die unter den verschiedenen Genotypen hochkonservierten 5' und 3' Regionen als Ziele anvisiert werden. Darüber hinaus wurde schon mehrfach gezeigt, dass diese Bereiche Bindungsregionen für mehrere zelluläre Proteine darstellen [67, 38, 68], so dass neben direkten HCV-gerichteten Strategien auch indirekte

Einflüsse durch Inhibition von HCV Kofaktoren eine Rolle spielen können. Der Umstand, dass HCV cap-unabhängig durch die IRES und die meisten Proteine der Zelle cap-abhängig translatiert werden, könnte zelluläre Prozesse durch HCV Kofaktor-gerichtete Strategien weitgehend unberührt lassen. Da das Genom des Hepatitis C Virus genau wie das (-)-Strang RNA Intermediat während der Replikation aus Ribonukleinsäuren besteht, ist das Virus prädestiniert für den Ansatz von antiviralen Strategien auf der Basis von RNA-gerichteten Strategien. Entscheidend ist dabei auch die Tatsache, dass HCV ausschließlich im Cytoplasma der Zelle repliziert und keine Integration des Virusgenoms ins Genom der Zelle erfolgt. So können erfolgversprechende antivirale Strategien entwickelt werden, entweder durch die Blockierung des RNA Virusgenoms durch Antisense-Moleküle, durch Spaltung der HCV RNA mittels Ribozyme oder durch RNA Interferenz.

3.7 Inhibition durch Antisense Konstrukte

Die Anwendung der Antisense-Technik (Abb.3.4) [69] bietet die Möglichkeit, Proteine und deren Funktion näher zu charakterisieren. Bei dem Prozess kann die Translation relevanter Gene in Proteine spezifisch durch den Einsatz von Antisense Oligonukleotiden unterbunden oder zumindest herunterreguliert werden.

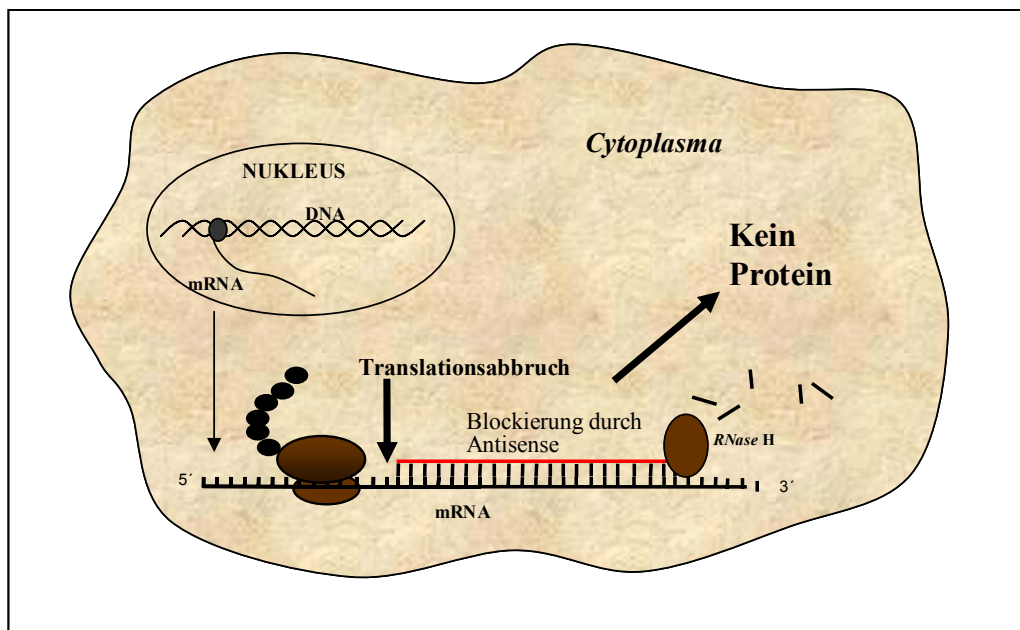


Abb. 3.4: Schematische Darstellung des Prinzips der Inhibition der Protein-Translation durch Antisense-Oligonukleotide. Die mRNA wird spezifisch von Antisense-RNA gebunden und das Entlanggleiten der Ribosomenuntereinheiten blockiert und die Proteinsynthese gestoppt. *RNaseH* baut anschließend die doppelsträngige RNA ab.

Dabei werden entweder DNA-Moleküle direkt in die Empfängerzellen injiziert oder aber durch ein Expressionsplasmid in die Zelle transfiziert. Nach der Transfektion des eingebrachten Plasmids in die Zelle wird das Gen mit der komplementären Sequenz zum Zielgen durch den Replikationsapparat des Rezipienten abgelesen und als Antisense RNA freigesetzt. Eine intermolekulare Bindung zwischen der Antisense RNA und der mRNA des Zielgens verhindert dann die Bildung des Proteins, zum einen durch die sterische Blockierung des am Strang entlangleitenden Ribosomen und zum anderen durch die intrazelluläre *Ribonuklease H*. Diese wird aufgrund der doppelsträngigen RNA aktiviert und degradiert irreversibel die durch den Antisense-Strang markierte mRNA [70].

Bei in-vitro Studien konnte eine Hemmung der HCV Genexpression durch Antisense Oligonukleotide schon gezeigt werden [71]. In Hepatozyten, die das HCV Strukturprotein Core exprimierten, wurde spezifisch die Translation unterbunden. Auch in-vivo konnte eine Suppression durch Antisense-Moleküle schon gezeigt werden. Mäuse wurden mit einem rekombinanten HCV Luciferase Vaccinia Virus infiziert und exprimierten in der Leber die Luciferase. Die Aktivität der HCV IRES-abhängigen Luciferase konnte gezielt durch Antisense-Moleküle inhibiert werden [72]. Um die Stabilität von Antisense-Molekülen im Serum zu erhöhen und sie unempfindlicher gegen Nukleasen zu machen, wurden verschiedene chemische Modifikationen vorgenommen (z.B. Phosphothiorat). Jedoch wurden in einigen Fällen dabei auch eine erhöhte Toxizität durch Stimulation der Immunantwort, der Komplementaktivierung und einer veränderten Blutgerinnung beobachtet [73]. Doch wurde nicht bei allen Modifikationen toxische Begleiterscheinungen beobachtet, denn einen Schritt weiter ist die Untersuchung von Fomivirsen, ein Antisense-Molekül, das schon als erstes Medikament in klinischen Studien zur Behandlung von CMV Retinitis bei HIV-Patienten zugelassen ist [74]. Ein Resultat, das zeigt, dass Antisense-Medikamente als antivirale Strategie durchaus erfolgreich sein können.

3.8 Mechanismus der RNA Interferenz

RNA Interferenz (RNAi) ist ein evolutionär konservierter Prozess, in dem die Genexpression spezifisch durch homologe doppelsträngige RNA (dsRNA) von 21- 23 Nukleotide Länge supprimiert wird (Abb.3.5). Dieser Prozess wurde zuerst in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* sowie in Pflanzen entdeckt und ist evolutionär als Abwehrmechanismus gegen doppelsträngige RNA-Viren entstanden [75, 76]. Sobald dsRNA, ob durch artifizielle Injektion oder durch Viren, in das Cytoplasma einer Zelle übertragen

wird, erkennt ein *RNaseIII*-ähnliches Enzym („Dicer“) [77] diese dsRNA als fremd und spaltet sie in RNA-Fragmente, sogenannte *small interfering RNA* (siRNA) von 21-23 bp Länge [78]. Die siRNA wird dann in einen Proteinkomplex eingebunden, den „RNA-Induced Silencing Complex“ (RISC) (Abb.3.5), der unter anderem eine Helikase beinhaltet, die unter ATP-Verbrauch die Duplex-siRNA in einzelsträngige RNA entwindet [79]. In der Theorie wird dabei der Antisense-Strang vom RISC inkorporiert und als Vorlage zum Auffinden, zur Anheftung und zur Spaltung der Zielsequenz durch die Endonuklease genutzt [80]. Dabei wurde gezeigt, dass aber genauso der Sense-Strang vom RISC zur spezifischen Spaltung verwendet werden kann, wenn bestimmte Stabilitätsbedingungen am 5' und 3' Ende vorliegen [81].

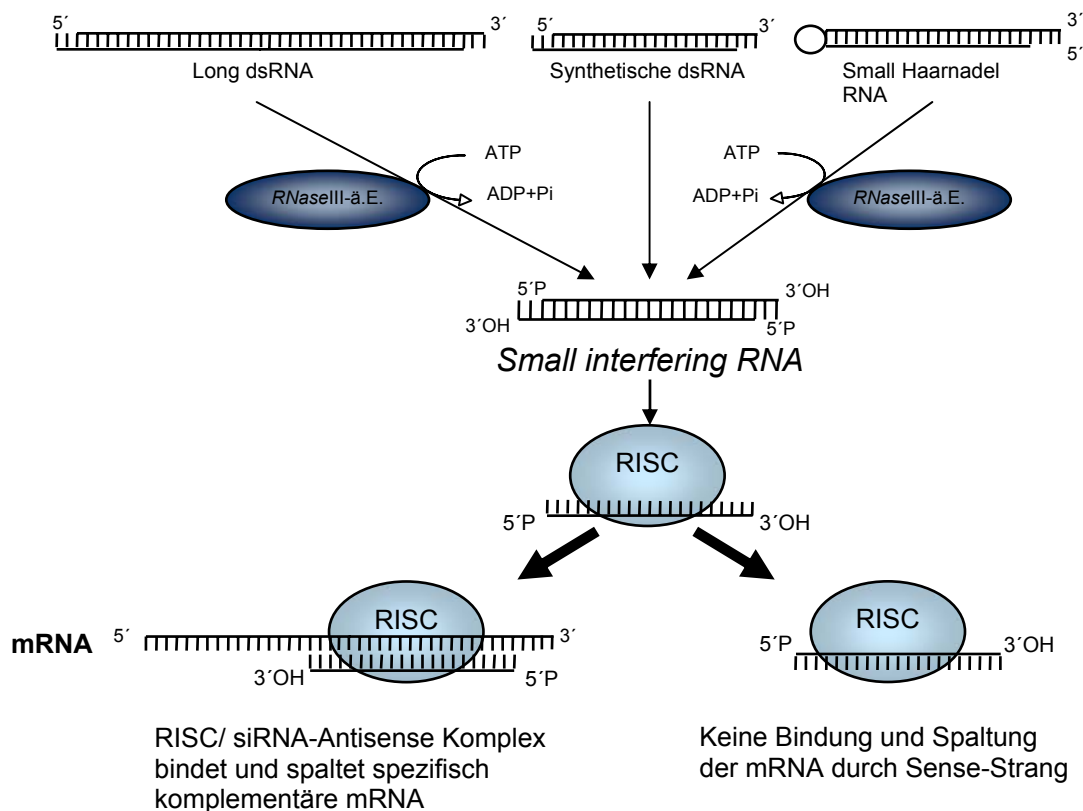


Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Prinzips der RNA Interferenz. Dargestellt ist die Modifizierung der Ausgangs-RNA durch ein RNaseIII-ähnliches Enzym in die funktionell aktive Form der siRNA. Der RISC (RNA-Induced Silencing Complex) inkorporiert den Sense- oder Antisense-Strang als Vorlage für die spezifische Bindung und Spaltung der Zielsequenz.

RNA Interferenz hat sich seit der Entdeckung der siRNAs zu einem essentiellen und effektiven Werkzeug der Molekularbiologie entwickelt. So kann mittels dsRNAs, die kleiner als 30 bp sind, spezifisch die RNA des Zielgens gespalten und somit die Translation und Expression von Proteinen unterbunden werden. Eine unspezifische Interferonantwort der

Zelle, die generell sämtliche mRNA Moleküle der Zelle degradiert und damit erheblich in den Metabolismus der Zelle eingreift, wird durch diese kurzen doppelsträngigen RNAs in der Regel nicht hervorgerufen [78], wenn auch bei einigen Plasmid-kodierten shRNAs eine Interferonantwort gezeigt werden konnte [82, 83].

Deshalb wurden Methoden entwickelt, um chemisch synthetisierte siRNAs oder siRNA-exprimierende Plasmide vorerst *in vitro* auf ihre Funktionalität zu überprüfen. Da nicht jede siRNA ihren Zweck erfüllt, wurde gezeigt, dass bestimmte Bedingungen in dem Design von siRNAs, neben der allgemeinen Formel $5'-AA(N_{19})TT-3'$, vorhanden sein müssen, um wirkungsvolle RNAi zu erreichen. Zielsequenzen sollten dabei nicht im Bereich der 5'UTR und 3'UTR gewählt werden, da Sekundärstrukturen oder Bindung von Translationsfaktoren die Zugänglichkeit für siRNAs wesentlich erschweren oder sogar verhindern könnten. Weiterhin scheinen 2 Nukleotide Überhang am 3'Ende von entscheidender Bedeutung zu sein, ebenso ein G/C-Gehalt von nicht mehr als 50 % sowie die Vermeidung von mehr als 3 Guanosen in einer Reihe [84, 85].

Die effiziente Transfektion von synthetischen siRNAs in Zellen kann durch Elektroporation oder durch lipophile Reagentien erreicht werden. Jedoch kann die Transfektionstoxizität durch die lipophile Reagenz oder durch das Phosphatrückgrat der synthetischen siRNA das Einbringen in die Zelle stören. Um diese Schwierigkeiten zu überwinden, wurden Plasmide entwickelt, die siRNA als small Haarnadel RNA (shRNA) unter der Kontrolle von verschiedenen Promotoren konstitutiv exprimieren. Eine effiziente als auch stabile Suppression von Zielgenen konnte durch shRNAs in retroviralen Plasmiden gezeigt werden, die vom RNA Polymerase III - U6 und H1 Promoter [86], vom tRNA^{Val} Promoter [87] und RNA-Pol II basierten CMV Promoter [88] exprimiert wurden. Plasmid-basierende shRNA Expression durch adenovirale Konstrukte, die nicht ins humane Genom integrieren [89], könnten bei einer Gentherapie eine durchaus erfolgreiche Strategie sein.

Die Anwendung von RNA Interferenz *in vivo* wurde schon mehrmals gezeigt. Dabei verhinderte die Co-Transfektion von siRNA und Reporterplasmid die Expression des Reporters in murinen Geweben [90]. Ebenso wurde die Repression des endogenen proapoptotischen Fas Rezeptors [91] und des Tyrosin Hydrolasegens im Gehirn von Mäusen durch siRNAs nachgewiesen [92]. In weiteren Untersuchungen wurde ein Fusionsprotein aus NS5B und Luciferase in die Leber von Mäusen injiziert und die Expression anhand der Luciferase Aktivität quantifiziert. Die Injektion von synthetischer spezifischer NS5B-gerichteter siRNA in die Leber führte nachweislich zur signifikanten Reduktion der Luciferase Aktivität. Die Ergebnisse zeigen, dass RNAi *in vivo* mit Erfolg anwendbar sein

andersartigen Wirkungsweise und der funktionellen Aufrechterhaltung der Ribozym Aktivität nach einer Spaltung der Antisense-Strategie überlegen. Die von den Ribozymen entwickelte Endonuklease Aktivität kann praktisch gegen alle RNA-Strukturen wirksam werden. Bei antiviralen Strategien können Ribozyme derart gestaltet werden, dass sie direkt gegen das virale Genom von RNA-Viren gerichtet sind und die Replikation gezielt unterbinden.

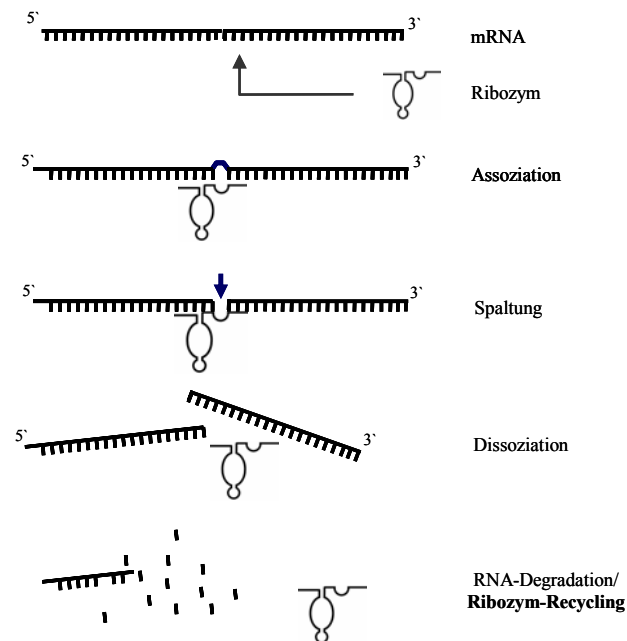


Abb. 3.7: Schematische Darstellung des Mechanismus der Ribozym-vermittelten Spaltung und Degradation von RNA.

Indirekte antivirale Strategien können sich gegen essentielle zelluläre Kofaktoren richten und durch Inhibition der Genexpression zellulärer Proteine eventuell die virale Replikation und Translation unterbinden oder zumindest vermindern. So wurden Hammerkopf-Ribozyme gegen die Hepatitis C Virus 5'UTR eingesetzt und konnten die HCV RNA spezifisch spalten und die virale Protein Translation supprimieren [94, 95]. In HCV-infizierten Hepatozyten, konnte weiter gezeigt werden, dass die Hammerkopf Ribozyme exprimiert wurden und die HCV RNA effizient vermindert wurde [96]. Im transgenen Mausmodell wurde eine effiziente katalytische Aktivität gegen die HCV RNA nachgewiesen und aufgrund der positiven Untersuchungen wurden auch schon erste klinische Untersuchungen durchgeführt, bei der sich eine nebenwirkungsfreie Anwendung zeigte [97]. Weitere Anwendungsbereiche von Ribozymen werden durch die Erstellung von Ribozym Bibliotheken verwirklicht. Transfektionen einer solchen Ribozym Bibliothek in humane Zellen hat schon zur Entdeckung und Charakterisierung neuer zellulärer Proteine, die als

Kofaktoren von HCV agieren, geführt [42]. Auch im Bereich der Tumorforschung in Lungengewebe konnten mit Ribozymen Erfolge erzielt werden, dabei konnte die Genexpression von Onkogenen wie *RAS*, *BCR-ABL* oder *C-FOS* in vitro erfolgreich mit Ribozymen ausgeschaltet werden [98].

Da Ribozyme sich aktiv nicht aus dem Zellkern ins Cytoplasma der Zelle bewegen können, kann man sie unter der Kontrolle eines starken tRNA^{Val} Promoters exprimieren lassen. Dieser verfügt über ein Transportsignal ins Cytoplasma [99], so dass Substrat RNA und Ribozym im gleichen Zellkompartiment vorhanden sind, eine wesentliche Voraussetzung für eine effektive Spaltung der mRNA. Dabei wurde durch cytoplasmatisch lokalisierte Ribozyme schon eine Steigerung der Spaltungseffizienz im Vergleich zu Ribozymen mit nukleärer Lokalisation gezeigt [100]. Zur Optimierung und Verstärkung des RNA-inhibierenden Effekts von Ribozymen, wurden schließlich weitere erfolgversprechende Modifikationen getestet, von denen einige auch nachweislich eine deutliche Steigerung der Ribozym Aktivität mit sich brachten.

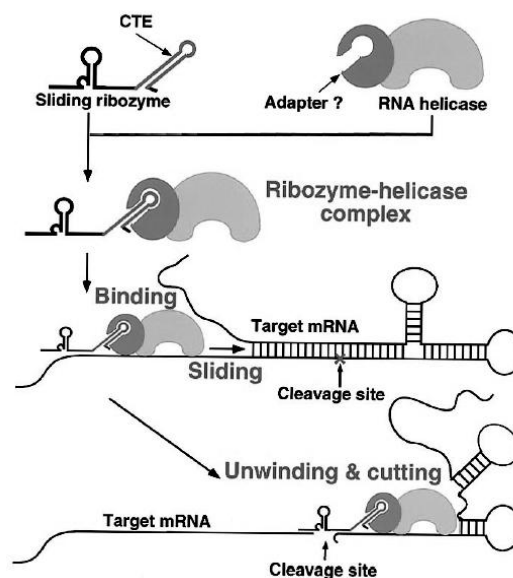


Abb. 3.8: Schematische Darstellung des Spaltungsmechanismus bei Ribozym-CTE/Helikase-Komplexen. Das CTE-konjugierte Ribozym bindet an eine RNA Helikase, die Sekundärstrukturen der RNA entwindet und so dem Ribozym einen besseren Zugang zur sequenzspezifischen Spaltungsstelle erlaubt.

Ribozyme sind ebenso wie die Ziel RNA negativ geladen und können deshalb nicht an der mRNA entlanggleiten, um die Zielsequenz zu finden. Im Vergleich dazu sind Restriktionsenzyme durch ihre positiv geladenen katalytischen Zentren in der Lage, effizient

an der zu schneidenden DNA bis zur Schnittstelle entlang zu gleiten [101]. Deshalb kommt es bei Ribozym-mRNA Interaktionen zu einer Reihe von kinetisch ungünstigen Assoziations- und Dissoziationsvorgängen, bis dann die Spaltung nach Auffinden der richtigen Sequenz zustande kommt. Entscheidend war dann die Entdeckung des konstitutiven Transport Elements (CTE), das als cis-wirkendes Element in RNA Introns die RNA befähigt hat, aus dem Nukleus ins Cytoplasma zu wandern. Das CTE vermittelt dabei die Interaktion mit RNA Helikasen. Dieser Ribozym-Helikase Komplex kann RNA-Moleküle binden, an ihr entlanggleiten und sie entwinden [102, 103]. An das tRNA^{Val}-Ribozym Vehikel wurde folglich das CTE angehängt, um dadurch die Schnelligkeit der Zielfindung durch den Ribozym-Helikase Komplex und damit die Spaltungseffizienz zu erhöhen (Abb.3.8).

Die Steigerung der Effizienz von CTE-verbundenen Ribozymen wurde schon mehrmals gezeigt und durch die Funktion der Helikase, RNA Sekundärstrukturen zu entwinden, wurden auch Fortschritte in Bezug auf die Wahl vorher schwer zugänglicher Zielsequenzen gemacht. Andere Modifikationen wurden bei Hammerkopf Ribozymen etabliert, indem der Stemloop II verkürzt wurde und sogenannte „Minizyme“ erbrachte, die im Vergleich zum Basis-Ribozym eine reduzierte Aktivität mit sich brachten. Jedoch wurden aus diesen einzelnen katalytisch noch aktiven Minizymen jeweils zwei zu einem Dimer konstruiert. Da beide unterschiedliche katalytische Zentren besaßen, handelt es sich um Heterodimere, die als „Maxizyme“ bezeichnet wurden. Maxizyme und die ursprünglichen Hammerkopf-Ribozyme, beide unter der Kontrolle eines tRNA^{Val} Promoters, wurden dann in der Möglichkeit, den Level der HIV1 tat mRNA in humanen Zellen effektiv zu reduzieren, miteinander verglichen. Dabei konnte eine wesentlich stärkere Inhibition der HIV1 tat mRNA durch Maxizyme als durch Original-Ribozyme festgestellt werden [104].

3.10 Ziel der Arbeit

Das Hepatitis C Virus stellt trotz voranschreitender Aufklärung des Genoms und verbesserter antiviraler Therapien immer noch wegen der häufigen Entstehung von Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom ein immenses gesundheitliches Problem dar. Neue Therapieansätze müssen entwickelt werden, da die bisher erfolgreich angewandte Kombinationstherapie aus pegyliertem Interferon α und Ribavirin nur bei etwa 60 % der Patienten zu einer dauerhaften Eliminierung des Virus führt. Ein neues Zellkulturmodell, bestehend aus HuH-7 Zellen mit einem stabil exprimierten subgenomischen HCV Replikon, ist Ausgangspunkt für das bessere Verständnis des Replikationszyklus von HCV. So können

neue antivirale Strategien entwickelt werden, die sich direkt gegen die HCV RNA richten, um spezifisch die Replikation und Translation des Virus zu inhibieren. Darüber hinaus könnte die RNA-gerichtete Beeinflussung von potentiellen HCV Kofaktoren eine Aufklärung über deren Bedeutung für die Replikation und Translation von HCV bringen.

Das Ziel dieser Arbeit war, mittels direkter und indirekter HCV RNA-gerichteter Strategien die Replikation und Translation des Hepatitis C Virus in monocistronischen subgenomischen HCV Replikonzellen spezifisch zu inhibieren:

- 1] **RNA Interferenz gegen die hochkonservierten 5' und 3' untranslatierten Regionen des Hepatitis C Virus.** Direkte HCV-gerichtete RNA Interferenz sollte durch Plasmid-exprimierte shRNAs gegen hochkonservierte Bereiche des Hepatitis C Virus gerichtet sein. Aktive shRNAs sollten zuerst in einem Luciferase-Reportersystem, in dem die Firefly Luciferase HCV IRES-abhängig translatiert wird, identifiziert werden. Im HCV Replikon System sollte dann der Grad der Inhibition der subgenomischen Replikation in Northern Blot- und der Translation in Western Blot- Analysen bestimmt werden.
- 2] **Charakterisierung und Inhibition von HCV Kofaktoren.** Die cDNAs von potentiellen Kofaktoren des HCV Replikationszyklus sollten in Sense- und Antisense-Orientierung exprimiert werden. In HuH-7 Zellen, die ein subgenomisches HCV Replikon stabil exprimieren, sollte zuerst die Veränderung des RNA- und Proteinlevels der Kofaktoren durch cDNA-Transfektion gezeigt werden. Anschließend sollte untersucht werden, ob die quantitativ veränderte Genexpression der potentiellen HCV Kofaktoren die Replikation und Translation des HCV Replikons beeinflusst. Zelluläre Proteine, die durch Antisense-RNA einen indirekten inhibitorischen Effekt auf die HCV Replikation oder Translation zeigen, sollten dann weitergehend auf Ebene der Ribonukleinsäuren durch shRNAs inhibiert werden. In HCV Replikonzellen sollte der inhibitorische Effekt von shRNAs auf HCV RNA und HCV NS5B Protein Level untersucht werden. Zusätzlich sollte der protektive Charakter (Suppression der HCV Replikation) von wirksamen HCV Kofaktor-gerichteten shRNAs in stabil shRNA-exprimierenden HuH-7 Zellen durch Transfektion mit einem Luciferase Reporter überprüft werden. Aufgrund der Beeinflussung essentieller zellulärer Proteine durch RNA Interferenz könnten biologische Eigenschaften der Zelle verändert worden sein. Dies sollte durch Untersuchungen der Proliferation und einer möglichen Induktion von Interferon ausgeschlossen werden.

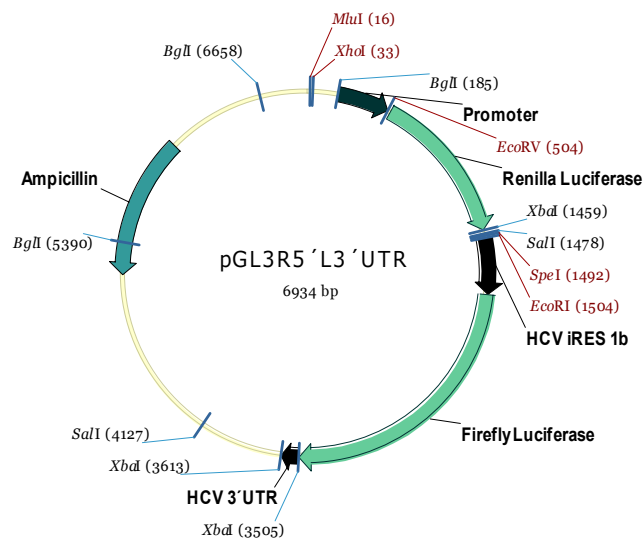
- 4] **Synergistische inhibitorische Effekte auf die HCV Replikation und Translation.** HCV-gerichtete und Kofaktor-gerichtete shRNAs sollten durch Transfektionen verschiedener shRNA-Kombinationen dahingehend überprüft werden, ob intrazellulär synergistische HCV-inhibitorische Wirkungen entfaltet werden, die die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von resistenten HCV Mutanten verringern. Ziel weiterer Untersuchung sollte sein, durch die Kombination von unterschiedlichen HCV RNA-gerichteten Substanzen die Verstärkung der inhibitorischen Wirkung auf HCV zu erreichen. Dabei sollte im HCV Replikon System die Wirkung von shRNA und Ribozym jeweils einzeln und beide in Kombination in Northern Blot- und Western Blot-Analysen untersucht werden.
- 5] **Generierung eines Reportersystems zur Identifizierung von effektiven gegen die HCV 5' UTR, 3' UTR und HCV Kofaktoren gerichtete shRNAs.** Es sollte zusätzlich ein Reportersystem konstruiert werden, mit dem aktive siRNAs aus einer siRNA Bibliothek identifiziert werden können. So war das Ziel, einen trunkierten Oberflächenrezeptor (tCD4), der keine Signalkaskade auslöst, auf der Zelloberfläche zu exprimieren. Die Translation des tCD4 sollte in einem eukaryotischen Expressionsplasmid HCV IRES-vermittelt sein und eventuell weitere HCV Bestandteile, wie das Core Protein oder die 3' UTR, beinhalten. Aktive siRNAs gegen hochkonservierte Regionen oder gegen essentielle HCV Kofaktoren sollten bei diesen Zellen die Translation des CD4-Oberflächenmoleküls supprimieren und die HuH-7 Zellen nach tCD4-Verlust mittels magnetischer Zellselektion von den Zellen mit inaktiven siRNAs getrennt werden können.

4. Materialien und Methoden

4.1 Plasmide

4.1.1 Allgemeine Plasmide

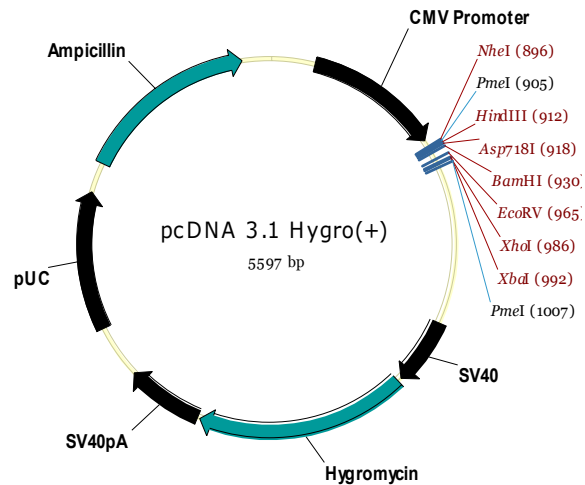
pGL3R5'L3'UTR



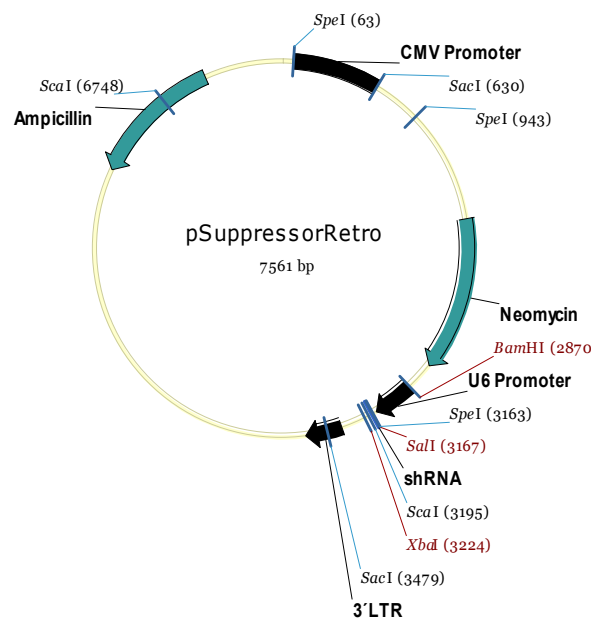
pGL3R5'L3'UTR setzt sich zusammen aus dem eukaryotischen Expressionsplasmid pGL3 und einem bicistronischen Reporterkonstrukt, in dem die Translation der Renilla Luciferase Cap-abhängig vom SV40-Promoter und die Translation der Firefly Luciferase Cap-unabhängig von der HCV-IRES vermittelt wird und zusätzlich die nicht translatierte 3' Region des Hepatitis C Virus angehängt wurde

pGL3R5'L

pGL3R5'L besteht ebenfalls aus dem eukaryotischen Expressionsplasmid pGL3 und einem bicistronischen Reporterkonstrukt, in dem die Translation der Renilla Luciferase Cap-abhängig vom SV40-Promoter und die Translation der Firefly Luciferase Cap-unabhängig von der HCV-IRES vermittelt wird.

pcDNA3.1(+)-hygro

Es handelt sich um einen eukaryotischen Expressionsvektor (Invitrogen) mit einem CMV Promoter (Cytomegalie Virus) mit hoher Aktivität. Neben der Multiple cloning site (MCS) verfügt das Plasmid über ein Ampicillinresistenzgen für die selektive Kultivierung in Bakterien sowie über ein Hygromycinresistenzgen als Selektionsmarker in eukaryotischen Zellen. Das Plasmid stand als Ausgangsplasmid für die Generierung von Sense- und Antisense-Konstrukten zur Verfügung.

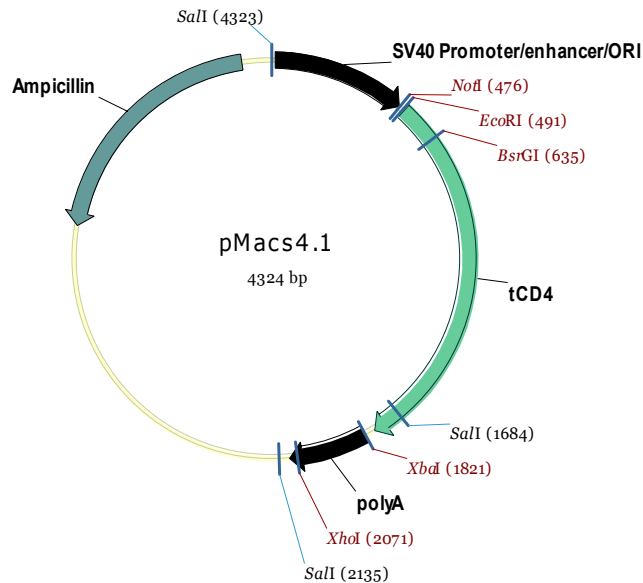
pSuppressorRetro

pSuppressorRetro (Imgenex) ist ein retroviraler Vektor von 7,6 KB und Ausgangsvektor für die Klonierung von siRNA und Ribozymen über SalI- und XbaI-Schnittstellen hinter den U6-Promoter.

phygEGFP

phygEGFP ist ein 6,1 kB grosses Plasmid (Clontech), das EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) unter der Kontrolle des CMV Promoters exprimiert und als Transfektionskontrolle genutzt werden kann.

pMacs 4.1



pMACS 4.1 ist ein 4,3 KB grosses Plasmid (Miltenyi Biotec), das den humanen CD4-Oberflächen Rezeptor (trunkiert) exprimiert, wobei der Part, der die cytoplasmatische Domäne kodiert, entfernt worden ist, so dass keine Signaltransduktion stattfinden kann. Das Oberflächenmolekül tCD4 wird vom SV40 Promoter exprimiert, der einen hohen CD4-Level sicherstellt.

pCMVβ-Gal

Aufgrund schwankender Transfektionseffizienzen bei unterschiedlichen Transfektionen musste eine Normalisierung der Luciferase-Assays durchgeführt werden. pCMVβ (Clontech) ist ein eukaryotischer Expressionsvektor, der die β-Galaktosidase unter der Kontrolle des starken CMV-Promoters exprimiert. Die gemessene β-Galaktosidase-Aktivität wurde dann zum Abgleich der Transfektionseffizienzen verwendet

4.1.2 Expressions-Plasmide

pcPTB-s

pcPTB-s wurde generiert aus dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/hygro und der über XhoI und HindIII eingefügten DNA-Sequenz des Polypyrimidin Tract Binding Proteins (PTB) in Sense Orientierung.

pcPTB-as

pcPTB-as setzt sich aus dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/hygro und der über HindIII und XhoI eingefügten DNA-Sequenz des Polypyrimidin Tract Binding Proteins (PTB) in Antisense Orientierung zusammen.

pcPSMA7-s

pcPSMA7-s wurde generiert aus dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/hygro und der über XhoI und HindIII eingefügten DNA-Sequenz der Proteasom α -Untereinheit 7 (PSMA7) in Sense-Orientierung.

pcPSMA7-as

pcPSMA7-as wurde generiert aus dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/hygro und der über XhoI und HindIII eingefügten DNA-Sequenz der Proteasom α -Untereinheit 7 (PSMA7) in Antisense-Orientierung

4.1.3 Ribozym-Plasmide

Die folgenden Ribozym-exprimierenden Plasmide wurden im Rahmen der Dissertation von Dominik Jarczak generiert:

uRzHBV-CTE

uRzHBV-CTE besteht aus dem retroviralen Vektor pSuppressorRetro der ein gegen das Genom des Hepatitis B Virus-gerichtetes Ribozym inklusive CTE-Sequenz (Constitutive Transport Element) unter der Kontrolle des U6-Promoters exprimiert. uRzHBV-CTE dient in den Untersuchungen ausschließlich als Kontrolle.

uRz323-CTE

uRz323-CTE besteht aus dem retroviralen Vektor pSuppressorRetro der ein gegen die HCV-IRES des Hepatitis C Virus gerichtetes Ribozym inklusive CTE-Sequenz (Constitutive Transport Element) unter der Kontrolle des U6-Promoters exprimiert.

tRzHBV

tRzHBV besteht aus dem retroviralen Vektor pLHPM und dem gegen das Genom des Hepatitis B Virus gerichteten Ribozym, das über BamHI und MluI Restriktionsschnittstellen eingefügt wurde, unter der Kontrolle des tRNA^{Val}-Promoters.

tRzHBV-CTE

tRzHBV-CTE besteht aus dem retroviralen Vektor pLHPM mit dem tRNA^{Val}-Promoter dem gegen das Genom des Hepatitis B Virus gerichteten Ribozym (tRzHBV) und der CTE-Sequenz (Constitutive Transport Element), die über MluI hinter das Ribozym kloniert wurde und dient als Negativkontrolle.

tRz323-CTE

tRz323-CTE besteht aus dem retroviralen Vektor pLHPM mit dem tRNA^{Val}-Promoter (ca.60000Kopien/Zelle), dem gegen die HCV-IRES gerichteten Ribozym 323 und der CTE-Sequenz (Constitutive Transport Element)

tRz9523

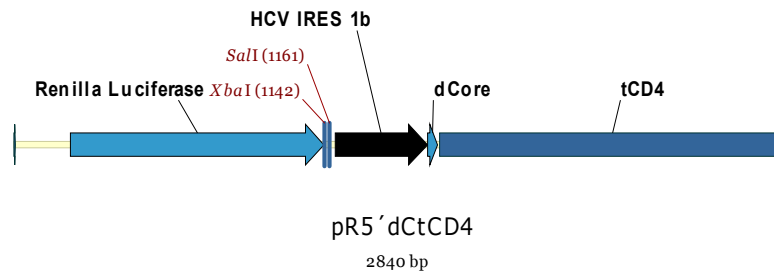
tRz9523 besteht aus dem retroviralen Vektor pLHPM und dem gegen die 3' Region des HCV gerichteten Ribozym 9523 unter der Kontrolle des tRNA^{Val}-Promoter

tRz9543-CTE

tRz9543-CTE besteht aus dem retroviralen Vektor pLHPM mit dem tRNA^{Val}-Promoter (ca.60000Kopien/Zelle), dem gegen die nichtkodierende 3' Region des HCV gerichteten Ribozym 9543 und der CTE-Sequenz (Constitutive Transport Element)

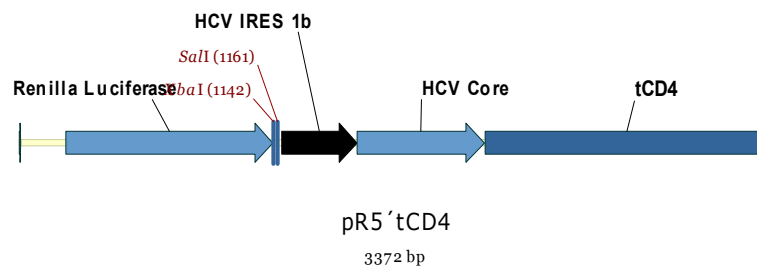
4.1.4 tCD4-Plasmide

pR5 Δ 'c-tCD4



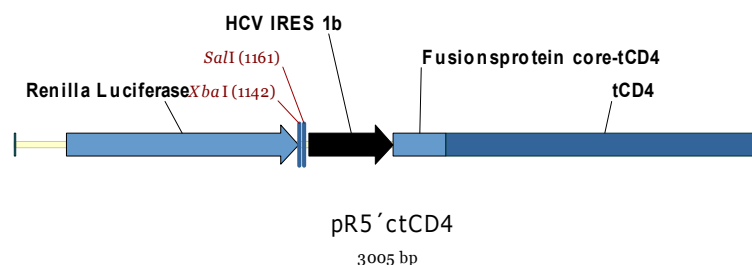
Ein aus pGL3 generiertes zirkuläres Plasmid mit einer cap-abhängigen Renilla-Translation sowie einer HCV-IRES abhängigen Translation eines Konstruktes bestehend aus 30 Basen des HCV Core-Strukturproteins und eines trunktierten CD4 Oberflächenrezeptors (die Abbildung zeigt nur den ORF).

pR5'core-tCD4



Ein aus pGL3 generiertes Plasmid mit einer cap-abhängigen Translation der Renilla-Luciferase sowie einer HCV-IRES abhängigen Translation eines Konstruktes bestehend aus dem gesamten HCV Core-Strukturprotein und eines trunktierten CD4 Oberflächenrezeptors (gezeigt ist der ORF)

pR5'c-tCD4



Ein aus pGL3 generiertes Plasmid mit einer cap-abhängigen Translation der Renilla-Luciferase sowie einer HCV-IRES abhängigen Translation eines Konstruktes bestehend aus einem Fusionsprotein des HCV Core-Strukturproteins und des trunktierten CD4 Oberflächenrezeptors (Abbildung zeigt den ORF).

4.2 Geräte

Aufsatzkamera Progressive 3CCD	Sony, Köln
Bakterieninkubator BE600	Memmert
Bakterienschüttler	Bühler, Tübingen
BAS 1000 PhosphoImager	Fujifilm
BAS 40 cassette	Fujifilm
Beckmann-Rotoren (JA-10, JA-20, JA-25.15)	Beckmann, München
CCD-Kamera DCX 9100P	Sony, Köln
Dewargefäß	Nalgene
Dispenser, manuell	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer, horizontal	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer, vertikal	Biometra, Göttingen
Elektrophoresesystem Minigel-Twin G42	Biometra, Göttingen
Eppendorf-Mehrkanalpipette Research (30-300µl)	Eppendorf, Hamburg
FACSCalibur	Becton Dickinson
Feinwaage Sartorius	Sartorius, Göttingen
Flachbettscanner Scanmaster	Microtek
Gel-Doc 1000	BioRad, München
Genepulser	BioRad, München
Hypercassette 18 x 24 cm	Amersham, Freiburg
Kühlzentrifuge 2 K 15	Sigma, Deisenhofen
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge GS-6G	Beckman, München
Lumat LB9501	Berthold, Bad Wildbad
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladb.
Magnetrührgerät	Jürgens-Omnilab, Hannover
Mikroskop BX60	Olympus, Hamburg
Mikroskop IMT2	Olympus, Hamburg
MiniMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladb.
Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, München
Model J2-21 Zentrifuge	Beckmann, München
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim/Main
OctoMACS Acrylic Tube Rack	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladb.

Phasenkontrastmikroskop	Hund, Wetzlar
pH-Meter MP220	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
PH-Meter	LAT, Garbsen
Photometer Lambda Scan 200e	MWG Biotech,
Photometerplatten zur DNA-Bestimmung	Coming Costar, Bodenheim
Pipette Reference(10 µl, 100 µl, 200µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pippettus-akku	Hirschmann Laborgeräte
Plastikküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Potter-Homogenisator	Braun, Melsungen
Power Pac 300	Life Technologies, Karlsruhe
Röntgenfilmentwickler Optimax	Protec Medizintechnik
Schwenkgerät (Red Rocker)	Amersham, Freiburg
Schwenkgerät PR-50	Pharmacia Biotech
Semi-Dry-Blotter Fastblot B33/B44	Biometra, Göttingen
Spektralphotometer UVIKON 810	Kontron Instruments
β-Counter Radicont	Herfurth
Standard Power Pac P25	Biometra, Göttingen
Sterilarbeitsbank HERA safe	Heraeus, Hanau
Sub-Cell GT	BioRad, München
Thermocycler	Landgraf
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer Comfort 5355	Eppendorf, Hamburg
Thermoprinter P91	Mitsubishi
Timer Modell T-440	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tischzentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417 CR	Eppendorf, Hamburg
UV-Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagene, Heidelberg
Vortex Mixer	Jürgens-Omnilab, Hannover
Waage Sartorius MC1	Sartorius, Göttingen
Wasserbad UC5	Julabo, Seelbach
Wasserstrahlpumpe Plastibrand PP	Jürgens-Omnilab, Hannover
Zellkulturbrutschrank SI	Hera Cell, Heraeus, Hanau
Zellkulturbrutschrank SII	BB5060, Heraeus, Hanau
Zentrifuge CS6R	Beckmann, München

4.3 Verbrauchsmaterialien

Cell Scraper	Sarstedt, Nümbrecht
Cryotubes (1 ml, 2 ml)	Nunc, Wiesbaden
Deckgläser (24 x 50 mm)	Omnilab, Hannover
Einmalpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (steril)	Greiner, Nürtingen
Filterpapier 3MM	Whatman, Göttingen
Filterpapier	Whatman
Hybond-N+	Amersham, Freiburg
Objektträger	Menzel
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen (Reagiergefäß, 15 ml, 50 ml)	Greiner, Nürtingen
PVDF-Membran (Immobilon-P)	Millipore, Eschborn
Reaktionsgefäß (0,5ml; 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme (HyperfilmMP™)	Amersham, Freiburg
Rundboden Röhrchen (5 ml)	Becton Dickinson
Sephadex Quick Spin Columns	Roche, Grenzach
Spritze (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Braun, Melsungen
Zellkulturflaschen 5 ml, 10ml mit Filter	Nunc Life Technologies, Karlsruhe
Zellkulturflaschen, -platten und -schalen	Greiner, Nürtingen

4.4 Chemikalien

Aceton	J.T.Baker, Holland
Acylamid/ Bisacrylamid (30%/ 0,8%)	Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma, Steinheim
Agarose (Electrophoresis grade)	Gibco, Schottland
Ammoniumacetat	Applichem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, Steinheim
Bacto-Tryptone	Gibco, Schottland
Bovine Serum Albumine (BSA)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg

Butanol-2	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbenicillin	Serva, Heidelberg
DEPC	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
DiNatriumcarbonat	J.T.Baker, Holland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Steinheim
dNTPs	Applichem, Darmstadt
Essigsäure	J.T.Baker Holland
Ethanol	J. T. Baker Holland
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
G418	CalbioChem
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Glycylglycin	Sigma, Steinheim
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure)	ICN
Hygromycin	CalbioChem
Isopropanol	J.T.Baker Holland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Luciferin-Natriumsalz	Applichem, Darmstadt
Magermilchpulver	Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Sigma, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
Methanol	J.T.Baker Holland
Mineralöl	Sigma, Steinheim
N,N,N,N- Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Steinheim
Natriumacetat	Applichem; Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

Natriumcitrat Dihydrat	J.T. Baker Holland
Natriumdodecylsulfat	Sigma, Steinheim
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
3-N-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Sigma, Steinheim
o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG)	Sigma, Steinheim
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Polybrene	Sigma, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma, Steinheim
Roti-Blue	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	J.T. Baker Holland
Schwefelsäure	J.T. Baker Holland
Sonicated Salmon Sperm	Stratagene, La Jolla, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, Steinheim
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Trypsin	Seromed
Tween 20	Serva Heidelberg

4.5 Puffer, Lösungen und Enzyme

4.5.1 Puffer und Lösungen

20% SDS	wässrig; Dodecylsulfat-Natriumsalz
2M Glucose-Lösung	54g D-(+)-Glucose (Sigma) in 100ml dest. H ₂ O gelöst und steril filtriert.
Mg ²⁺ -Lösung:	50% 2 M Magnesiumchlorid- Lösung (20,3 g MgCl ₂ x 6H ₂ O, Applichem) in 50 ml dest. H ₂ O gelöst wurden mit 50% 2 M Magnesiumsulfat-Lösung (24,7 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O (Merck) in 50 ml dest. H ₂ O gelöst) gemischt und steril filtriert.
PBS	10 mM Natriumphosphat pH7,4; 150 mM NaCl
PBE	10 mM Natriumphosphat pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5% BSA

Phenol/Chloroph/Isoamyl.	25/24/1 (v/v); 200 ml Phenol, 182 ml Chloroform, 8 ml Isoamylalkohol (Roth)
Quicky-Puffer	40% [v/v] Glycerin mit 0,25% [w/v] Bromphenolblau
TAE-Puffer	40 mM Tris, 2mM EDTA, 5 mM NaCl; pH 8,0, Einstellung
TE-Puffer	10 mM Tris, 1mM EDTA; pH 8,0 mit konzentrierter HCl eingestellt
Tris-Puffer	Tris (hydroxymethylaminomethan) wurde als 1 M wässriger Puffer angesetzt. Dabei wurde entweder ein pH-Wert von 7,2; 7,5 oder 8,0 mit konzentrierter HCl eingestellt.

4.5.2 Kits

CalPhos Mammalian Transfection Kit	BDBiosciences, CA-USA
Dual Luciferase Reporter Test System	Promega, Madison-USA
High Prime DNA Labeling Kit	Roche Diagn., Mannheim
PCR Master	Roche Diagn., Mannheim
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Rneasy Kit	Qiagen, Hilden
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Western Breeze Chem. Immunodetection System	Invitrogen, USA

4.5.3 Restriktionsendonukleasen

AccI	ApaI	AvaI	AvaII	BamHI	BsrGI	EcoRI	
EcoRV	HincII	HindIII	MluI	NdeI	NheI	NruI	
Sall	ScaI	SpeI	StuI	XbaI	XhoI	PmeI	

Alle Restriktionsendonukleasen wurden von der Fa. New England Biolabs, USA bezogen.

4.5.4 Enzyme

Calf intestinal alkaline Phosphatase (CIAP)	NEB, Beverly- USA
Mungbohnen-Nuklease	NEB, Beverly- USA
DnaseI, Rnase-free	Qiagen, Hilden
Klenow Polymerase	NEB, Beverly, USA
Lysozym	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNase A	Sigma, Steinheim
RNaseOUT	Invitrogen, Carlsbad, USA
SuperScript II RNaseH	Invitrogen, USA
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Carlsbad-USA
T7 RNA Polymerase	Promega, USA
Taq-Polymerase	Invitrogen, USA

4.5.5 Enzymreaktionspuffer

Restriktionspuffer 1, 2, 3, 4, U, EcoRI	NEB, Beverly- USA
T4 Ligase Puffer	Invitrogen, USA
PolPuffer	NEB, Beverly- USA

4.5.6 Molekulargewichtsstandard

1 kb DNA-Leiter	Invitrogen, Carlsbad, USA
100 bp DNA-Leiter	Invitrogen, Carlsbad, USA
SDS PAGE Low Range Standard	Bio-Rad, München

4.6 Organismen

4.6.1 Bakterien

4.6.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Stammbezeichnung	Genotyp
E.coli DH5 α	F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZY-A-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) supE44, λ ⁻ thi-1 gyrA relA1 (Invitrogen)
E.coli TOP10F ⁻	F ⁻ {lacI ^q TN10(Tet ^R)} mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcr-BC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

4.6.1.2 Verwendete Kulturmedien

Die verwendeten Medien wurden alle mit Aqua dest. angesetzt und anschließend autoklaviert.

Medium	Zusammensetzung
Luria Bertani-Medium	10 g Bacto-Trypton; 5,0 g Hefeextrakt; 10 g NaCl ad 1000 ml dH ₂ O
SOB-Medium	20 g Select Peptone 140, 5 g Hefeextrakt , 0,6 g NaCl und 0,19 g KCl wurden in 1 Liter dest. H ₂ O gelöst und pH 7,5 eingestellt
SOC-Medium	10 ml SOB-Medium wurden mit 100 μ l MG ²⁺ -Lösung und 100 μ l 2 M Glucose-Lösung supplementiert

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde 1 L LB-Medium mit 15 g Agar versetzt und autoklaviert. Nach Abkühlung auf unter 60°C wurden Antibiotika (Ampicillin – 100 mg/ml) für die Selektion von Klonen, die mit Expressionsplasmiden transformiert wurden, zugegeben. Das Medium wurde in Petrischalen ausgegossen und die Platten bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

4.6.2 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Kulturbedingungen
HuH-7	Humane Hepatomzelllinie mit einer mittleren Chromosomenzahl zwischen 50 und 59 (Nakabayashi et al., 1982)	DMEM mit Glutamax-I (Invitrogen) mit 10% FCS (v/v), 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 0,1 mg/ml Penicillin und Streptomycin. Kultivierung bei 37°C – 5%CO ₂
HuH-7/Mono	Humane Hepatomzelllinie HuH-7 mit einem stabil exprimierenden subgenomischen monocistronischen Hepatitis C Virus Replikon. Das Replikon besteht aus den viralen Nichtstruktur-Proteinen NS3-NS5B und repliziert unter der Kontrolle der HCV – Internal Ribosomal Entry Site (Bartenschlager, UNI Heidelberg)	DMEM mit Glutamax-I (Invitrogen) mit 10% FCS (v/v), 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 0,1 mg/ml Penicillin und Streptomycin. Zugabe von 25 µg/ml Hygromycin. Kultivierung bei 37°C – 5%CO ₂
293T	Humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC CRL 1573), transformiert durch stabile Integration der adenoviralen E1 Region, hypo-triploid	MEM mit Glutamax-I (Invitrogen) mit 10% FCS (v/v), 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 0,1 mg/ml Penicillin und Streptomycin. Kultivierung bei 37°C – 5%CO ₂
BB7	Humane Hepatomzelllinie HuH-7 mit einem stabil exprimierenden subgenomischen Hepatitis C Virus Replikon unter der Kontrolle der EMCV-Internal Ribosomal Entry Site.	DMEM mit Glutamax-I (Invitrogen) mit 10% FCS (v/v), 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 0,1 mg/ml Penicillin und Streptomycin. Zugabe von 350 µg/ml G418. Kultivierung bei 37°C – 5%CO ₂
CF2	Canine Thymusdrüsenzellen, epithel-ähnlich	DMEM mit Glutamax-I (Invitrogen) mit 10% FCS (v/v), 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 0,1 mg/ml Penicillin und Streptomycin. Kultivierung bei 37°C – 5%CO ₂
HT1080	Humane Fibrosarcoma-Zelllinie, Epithel-ähnliche Zellen, die als Monolayer wachsen (Rasheed et al., 1972)	DMEM mit Glutamax-I (Invitrogen) mit 10% FCS (v/v), 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 0,1 mg/ml Penicillin und Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat. Kultivierung bei 37°C – 5%CO ₂

4.7 Molekularbiologische Methoden

4.7.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Sequenzen aus einer Vielfalt von Nukleinsäuren nutzt man die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR ist ein in-vitro-Verfahren, bei dem mit Hilfe zweier synthetischer Oligonukleotid-Primer, die die terminalen Bereiche der zu amplifizierenden Sequenz komplementär flankieren, und der thermostabilen *Taq*-Polymerase (*Thermus aquaticus*) eine exponentielle selektive Amplifikation erreicht wird.

Das Prinzip der PCR besteht aus einer sich mehrfach wiederholenden Reaktion aus drei verschiedenen Schritten: **I.** Hitze-Denaturierung der doppelsträngigen DNA **II.** Annealing der Oligonukleotid-Primer und **III.** Extension der Amplifikate durch die *Taq*-Polymerase.

Reaktionsansatz für 100µl:

10µl	10x PCR-Puffer	(1 x im Ansatz)
10µl	10µM Primer 1	(Konzentration im Ansatz: 1µM)
10µl	10µM Primer 2	(Konzentration im Ansatz: 1µM)
10µl	dNTP-Mix (je 2mM)	(Konzentration im Ansatz: je 200µM)
3µl	50mM MgCl ₂	(Konzentration im Ansatz: 1,5mM)
0,5µl	Taq-DNA-Polymerase (5U/µl)	(2,5U im Ansatz)
	(50-100ng DNA-Matrize)	
	Aqua dest. ad 100µl	

Es erfolgte zum Schutz vor Verdampfung des Wassers aus dem Reaktionsgemisch während der PCR eine Überschichtung mit Mineralöl (Sigma). Um Kontaminationen auszuschließen wurde für jeden Ansatz eine Negativkontrolle ohne DNA-Matrize mitgeführt.

Die Berechnung der Schmelztemperatur von Primern ≤ 20 bp erfolgte nach der Formel

$$TM = 2^{\circ}C \times n(AT) + 4^{\circ}C \times n(GC).$$

Primer ≥ 20 bp wurden nach der Formel $TM = 59,8^{\circ}C + 0,41(\%GC) - 675/n$ berechnet.

(n = Anzahl der Basenpaare)

Reaktionsbedingungen im Thermocycler (Landgraf):

Zyklus	Temp	Zeit	Vorgang
Vorzyklus	94°C	10sec	Denaturierung
(1 x)	94°C	300sec	
Hauptzyklus	T_a	60sec	Annealing
(30-40 x)	72°C	45-120sec	Extension
	94°C	90sec	Denaturierung
Endzyklus	T_a	90sec	Annealing
(1 x)	72°C	300sec	Extension

4.7.2 Fusions-PCR

Mittels einer Fusions-PCR kann man neben der Amplifikation von DNA auch die Verschmelzung zweier sich über einen kurzen Bereich überlappender Sequenzen erreichen. Voraussetzung dafür ist die Generierung zweier überlappender PCR-Fragmente in einer ersten PCR mittels geeigneter Primer. In einer zweiten PCR – der eigentlichen Fusions-PCR – werden die beiden Fragmente verschmolzen, wobei sie im ersten Schritt gegenseitig als Primer für die Zweitstrangsynthese fungieren. Durch die zugegebenen Endprimer wird in den weiteren Zyklen das Fusionsprodukt amplifiziert.

Der Reaktionsansatz für die Fusion entsprach prinzipiell dem einer Standard-PCR, jedoch mit dem Unterschied, dass statt der Matrizen-DNA je ein μL des PCR-Ansatzes der Einzelfragment-PCRs eingesetzt wurde.

4.7.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Produkte aus PCR-Reaktionen und DNA-Fragmente aus enzymatischen Reaktionen in der Grösse von 100 bp – 10 kb wurden mit dem QIAquick PCR Purification von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen befreit. So konnten bis zu 10 μg DNA in hoher Reinheit aufgereinigt werden. Mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit Protocol wurden

einzel- oder doppelsträngige DNA-Fragmente (≥ 17 Nukleotide) von Oligonucleotiden (≤ 10 Basen), Enzymen, Salzen und einzelnen Nucleotiden befreit.

Zu 1 Volumen Reaktionsansatz wurden 5 Volumen PB (PCR-Purification), bzw. Puffer PN (Nucleotide Removal) hinzugefügt, gemischt und auf eine QIAquick-Säule gegeben. Nach Zentrifugation von 30 Sekunden bei $10.000 \times g$ wurde der Durchlauf verworfen und die Säule durch Zugabe von $750 \mu\text{l}$ Puffer PE und anschließenden Zentrifugationen gewaschen. Die DNA-Fragmente wurden abschließend in $2 \times 30 \mu\text{l}$ H_2O dest. eluiert.

4.7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für analytische und präparative Zwecke wurden DNA-Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Agarosekonzentration der Gele wurde in Abhängigkeit von den zu erwartenden Fragmentlängen zwischen 0,6 und 2,0% [w/v] gewählt. Die entsprechende Agarosemenge wurde in $1 \times \text{TAE}$ aufgekocht, auf ca. 60°C abgekühlt, 0,001% Ethidiumbromid (10mg/ml) dazugegeben und in den horizontalen Gelträger gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde es mit dem Laufpuffer $1 \times \text{TAE}$ überschichtet und die mit Bromphenolblau versehenen Proben nebst Längenstandard (1Kb DNA Ladder und 100bp DNA Ladder, Invitrogen) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 180V. Zur Visualisierung wurde das Gel anschließend unter UV-Bestrahlung und Verwendung des Geldokumentationssystems von Bio-Rad (Gel Doc1000; Molecular Analyst, Version 2.1.2) dokumentiert.

4.7.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung und Aufreinigung elektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des Gel Extraktions Kits (Qiagen). Bei dieser Methode wurden die DNA-Banden im Agarosegel unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und in Eppendorf „Safe lock tubes“ (1.5ml) überführt. Die weitere Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die aufgereinigte DNA wurde in $2 \times 30 \mu\text{l}$ dH_2O eluiert.

4.7.6 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Entfernung von störenden Proteinen aus Lösungen von Nucleinsäuren. Bei dieser Methode wurde der Reaktionsansatz mit dem einfachen Volumen Phenol/ Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, Roth) versetzt, vermischt und zur Phasentrennung 1 min bei 15000 x g zentrifugiert. Die Proteine werden dabei denaturiert und reichern sich in der Phenolphase, insbesondere an der Grenze zwischen Phenolphase und wässriger Phase an. Die wässrige, nucleinsäurehaltige Phase wurde abgenommen, zur Entfernung von Phenolresten mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, Roth) extrahiert und erneut zentrifugiert. Der nucleinsäurehaltige Überstand wurde DNA vorsichtig abgehoben und einer Ethanol-fällung unterzogen.

4.7.7 Ethanol-fällung von Nucleinsäuren

Die Ethanol-fällung ist ein Verfahren zur Aufreinigung von Nucleinsäuren. Durch diese Methode werden störende Salze aus Ligationsansätzen, die eine folgende Enzymreaktion nachhaltig beeinträchtigen, entfernt. Diese Aufreinigung wurde ebenso für die Konzentrierung von DNA eingesetzt. Die Fällung der Nucleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 1/10 des Ausgangsvolumens einer 2,5 M Na-Acetat-Lösung und dem 2,5 fachen Ausgangsvolumen an 96%igem eiskaltem Ethanol für ungefähr 1 Std bei -80°C . Nach 20 bis 30minütiger Zentrifugation bei 4°C und 15000xg (Zentrifuge 5417R, Eppendorf) wurde der Überstand dekantiert und verworfen. Das nucleinsäurehaltige Sediment wurde mit 500 μl 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen, erneut für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Sediment getrocknet. Die gefällte DNA wurde schließlich in Aqua dest. gelöst.

4.7.8 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonucleasen

Die Restriktionsspaltung wurde einerseits zu analytischen Zwecken eingesetzt, um beispielsweise auf das Vorhandensein eines bestimmten Inserts zu prüfen. Andererseits wurden durch Restriktionsspaltungen doppelsträngige DNA-Moleküle, wie Vektoren und PCR-Produkte, für die Klonierung präpariert. Die Spaltungen wurden unter den Puffer- und Temperaturbedingungen durchgeführt, die die Hersteller (New England Biolabs, MBI

Fermentas) für die Enzyme vorgaben. Es wurden 10U Restriktionsendonuklease pro μg DNA eingesetzt. In der Regel wurde ein Reaktionsvolumen von 10 bis $30\mu\text{l}$ gewählt und drei Stunden oder über Nacht inkubiert. Durch Zugabe des 10x Ladepuffers oder 20minütiges Erhitzen auf 65°C wurden die Enzyme inaktiviert.

4.7.9 Dephosphorylierung

Wenn ein Expressionsplasmid, in das ein Insert eingesetzt werden sollte, nur mit einem Restriktionsenzym im Restriktionsverdau geschnitten wurde, oder im Falle von unvollständig schneidenden Enzymen, mussten die 5'-Enden der Vektor-DNA dephosphoryliert werden, um Re-Ligationen des geschnittenen Vektors zu vermeiden. Da die Dephosphorylierung in den NEB-Puffern 2, 3 oder 4 erfolgte, konnte der Restriktionsansatz entweder direkt nach der Deaktivierung der Endonukleasen durch Erhitzen oder aus dem Gel aufgereinigte DNA verwendet werden. Die zu dephosphorylierende DNA wurde mit 0,1U alkalischer Kälberdarm-Phosphatase (CIAP, NEB) und 10% [v/v] CIAP-Additiv versetzt. Und etwa 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend musste der Ansatz vor der weiteren Verwendung in Ligationen entweder durch eine Gelaufreinigung oder durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion von der CIAP gereinigt werden.

4.7.10 Generierung glatter Enden

Einzelne Klonierungen verlangten DNA-Spaltungen, die nicht kompatible DNA-Überhängen zwischen Vektor-DNA und Insert erzeugten. Bei den folgenden Ligationen war es dann nötig, die zuvor durch Restriktionsspaltung entstandenen überhängenden DNA-Enden in glatte DNA-Enden umzuwandeln.

4.7.10.1 Abbau überhängender 5'-Enden

Für den Abbau überhängender 5'-Enden wurde der Restriktionsansatz gefällt, in einem speziellen Mungbohnen-Nuklease-Puffer aufgenommen und mit 5U Mungbohnen-Nuklease etwa 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach Aufreinigung konnte der Ansatz dann in weiteren Restriktions- oder Ligationsansätzen eingesetzt werden.

4.7.10.2 Auffüllung überhängender 5'-Enden

Zum Auffüllen überhängender 5'-Enden wurde der Restriktionsansatz mit 1µl 2mM dNTP (0,5mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 1U DNA-PolymeraseI (Klenow-Fragment) und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Gelaufreinigung wurde die DNA in weiteren Restriktions- und Ligationsansätzen eingesetzt.

4.7.11 Ligation

Ligationen erfolgten in einem Volumen von 10 bis 20µl unter Verwendung von 1U T4-DNA-Ligase (Invitrogen, 1U/µl) und 1 x Ligasepuffer bei 16°C über Nacht. Die Insert-DNA wurde im 10- bis 20-fachem molaren Überschuß gegenüber der Vektor-DNA eingesetzt. Vor der Transformation in *E. coli* wurden die Ligationsansätze gefällt, um störende Salze zu entfernen.

4.7.12 Plasmid-DNA-Präparationen

Es wurden verschiedene Plasmid-DNA-Präparationsmethoden durchgeführt, wobei sich die Wahl der Methode nach der gewünschten Reinheit und Menge der Plasmid-DNA richtete.

4.7.12.1 Quick-DNA-Check-Methode

Die „Quick-DNA-Check“-Methode wurde zur Überprüfung von Plasmiden und nach erfolgten Ligationen und Transformationen eingesetzt. Dabei wurden 150µl einer Bakterienkultur mit 50µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 10µl „Quick“-Puffer versetzt und 20 Sekunden vermischt. Nach Zentrifugation für 3min bei 15000xg (Centrifuge5417R, Eppendorf) wurden 25µl des Überstandes gegen ein Kontrollplasmid auf einem 0,6% Agarosegel aufgetrennt. Durch Färbung mit Ethidiumbromid zeigten sich die Plasmide als schwache Banden zwischen der oberen Bande, der bakteriellen genomischen DNA, und den unteren Banden der bakteriellen rRNA und tRNA. Erfolgreiche Klonierungen konnte man aufgrund der unterschiedlichen Plasmidgrößen vermuten und selektiv einzelne Klone für weitere Untersuchungen weiter kultivieren.

4.7.12.2 Plasmid-Mini-Präparation

Diese Methode der alkalischen Lyse diente der Isolierung von einigen µg DNA aus kleineren Bakterienkulturen und wurde genutzt, um einzelne zuvor transformierte Bakterienklone mittels Restriktionsverdau auf korrekte Länge und/oder richtige Schnittstellenverteilung des Plasmids/Inserts zu überprüfen. Allerdings verfügt die DNA dieser Aufreinigungsmethode über einen nur geringen Reinheitsgrad.

Für Plasmid-Minipräparationen wurden 5ml LB-Medium + Ampicillin (100µg/ml) mit den gewünschten plasmid-exprimierenden Bakterien (i.d.R. DH5α, E.coli) angeimpft und über Nacht bei 37°C/225rpm kultiviert. 1,5ml der Übernachtskultur wurden 1 Minute bei 20.000g sedimentiert, der Überstand abgenommen und verworfen und das Bakterienpellet in 300µl Suspensionspuffer P1 (Qiagen) aufgenommen. 300µl Lysispuffer P2 (Qiagen) wurden dazugegeben und durch invertieren vermischt. Nach maximal 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lysisreaktion durch Zugabe von 300µl Neutralisationspuffer P3 (Qiagen) abgestoppt und 15 Minuten auf Eis stehen gelassen, wobei hauptsächlich die Plasmid-DNA renaturiert. Zur Abtrennung von Protein-SDS-Komplexen, aggregierter chromosomaler DNA und hochmolekularer RNA wurde 10 min bei 4°C und 15000xg zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf) und der Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und gut mit 630µl Isopropanol vermischt. Nach einer Zentrifugation von 30 Minuten bei 20.000g und 4°C wurde der Überstand verworfen, mit 500µl 70% Ethanol gewaschen, nochmals 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet getrocknet und in 50µl H₂O resuspendiert. Für Sequenzierungen, die einen höheren Reinheitsgrad verlangen, wurde DNA auch mittels kommerziellem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) über die Säulen aufgereinigt.

4.7.12.3 Plasmid-Maxi-Präparation

Plasmid Maxipräparationen wurden mit dem kommerziellen Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen) zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA mit einem hohen Reinheitsgrad für präparative Zwecke (Klonierung, Transformation, Transfektion, Sequenzierung,) durchgeführt. Dabei wurden 350ml („Maxi“) *E. coli*-Übernachtskultur laut Herstellerprotokoll alkalisch lysiert und über spezielle vom Hersteller mitgelieferte Silicagel-Anionenaustauschersäulen aufgereinigt. Die Plasmid-DNA wurde mit Isopropanol gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und das Sediment in 400 µl Aqua dest. aufgenommen.

4.7.13 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration der durch Mini-, Midi- und Maxi-Präparationen aufgereinigten Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm in 96-well-Platten (UV 96 well Flat Bottom, Fa Costar) bestimmt. Unter Einbeziehung des entsprechenden Extinktionskoeffizienten konnte die DNA/RNA Konzentration errechnet werden. Über die Bestimmung der Extinktion bei 280 nm und anschließender Quotientenbildung aus E_{260}/E_{280} konnte eine Aussage über die Reinheit der gemessenen Nukleinsäure getroffen werden. Der Quotient sollte, um eine ausreichende Reinheit zu gewährleisten, im Bereich zwischen 1,8 – 2,0 liegen.

4.7.14 DNA-Sequenzierung

Während der PCR kann es zum Auftreten von Mutationen in den amplifizierten DNA-Sequenzen kommen. Deshalb wurden alle Bereiche der generierten Plasmide, die durch Amplifikation entstanden sind, durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierungen erfolgten bei einem kommerziellen Sequenzierunternehmen (Fa. MWG, München)

4.7.15 Herstellung kompetenter Zellen

4.7.15.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen E.coli (RbCl)

Der Escherichia coli Stamm DH5 α wurde von einer frisch ausgestrichenen Platte oder einem Stock in eine 5ml Flüssigkultur (LB-Medium) überimpft und über Nacht bei 37°C bei 225rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde dann ein 250ml Erlenmeyerkolben mit 350ml LB-Medium mit dieser Übernachtskultur beimpft, so dass ein OD₅₇₈-Wert von 0,05 zu Beginn der Kultur eingestellt war. Die Kultur wurde dann bei 37°C/225 rpm inkubiert, bis eine OD₅₇₈ von 0,3 erreicht wurde. Bei Erreichen der OD₅₇₈ von 0,3 wurde die Bakterienlösung in Falcontubes gefüllt und 15min auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation von 15min bei 3500rpm und 4°C wurden die Zellen vorsichtig in 1/3Volumen Puffer Rb1 (17ml, eiskalt) resuspendiert und wieder 15min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach erneut zentrifugiert und DNA vorsichtig in 1/12,5 Volumen Puffer Rb2 (4 ml, eiskalt) resuspendiert und nochmals 15min auf Eis gestellt. Aliquots von 200 μ l wurden in vorgekühlte Eppendorfhüttchen gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Rb1	12g/l RbCl; 9,9g/l MnCl ₂ ; 1,5g/l CaCl ₂ *H ₂ O; 2,9g/l K-Acetat; 150g/l Glycerin(99%); pH 5,8
Rb2	2,1g/l MOPS; 1,2g/l RbCl; 11g/l CaCl ₂ *H ₂ O; 150g/l Glycerin(99%); pH 6,8

4.7.15.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

5ml LB-Medium wurden mit frisch aufgetauten *E.coli*-Bakterien (DH5 α) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. 1ml dieser Übernachtskultur wurde anschließend in 500ml LB-Medium überführt, der Gesamtansatz dann auf 4 Erlenmeyerkolben verteilt und die optische Dichte bei $\lambda=550\text{nm}$ zu Beginn der Inkubation ($t=0$) gemessen. Die Zellsuspension wurde dann bei 37°C bis zu einer Dichte von $\text{OD}_{550}=0,8$ bei 225rpm inkubiert und anschließend in Zentrifugationsröhrchen überführt und 1Std auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann für 10 Minuten bei 4°C und 2.600xg zentrifugiert. Das Pellet wurde durch Resuspension in eiskaltem WA-Puffer (10% Glycerol in bidest. H₂O) gewaschen und bei 4°C und 2.600xg für 30 Minuten inkubiert. Nach einem zweiten Waschgang sowie der zweiten Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 2,5ml WA-Puffer aufgenommen. Nach Aliquotierung der resuspendierten Bakterien in 40 μl -Aliquots wurden die elektrokompetenten Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.7.16 Transformation kompetenter Zellen

4.7.16.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Kommerziell erworbene Zellen (DH5 α) oder chemisch-kompetent hergestellte Zellen nach der RbCl-Methode (DH5 α^*) wurden auf Eis aufgetaut. Bis 20 μl DNA-Lösung wurden dann zu den aufgetauten Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellen mit der DNA wurden dann 30 Minuten auf Eis inkubiert und danach der gesamte Transformationsansatz im Thermomixer 30 Sekunden bei 37°C (DH5 α), bzw. 90 Sekunden bei 42°C (DH5 α^*) erhitzt und sofort danach zum Abkühlen auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 800 μl SOC-Medium wurden die Zellen zur Ausprägung der Resistenz mindestens 1Std bei 37°C/225 rpm schütteln

gelassen. Bis max 200µl Zellen wurden auf LB/Ampicillin-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.7.16.2 Transformation elektrokompenter Bakterien durch Elektroporation

Große Plasmide (z.B pSuppressorRetro [8.2kb]) zeigten bei chemisch-kompetenten Bakterien eine deutlich verringerte Transformationseffizienz im Vergleich zu kleinen Plasmiden. Durch das Verfahren der Elektroporation mit elektrokompenten Bakterien konnte die Anzahl an transformierten Bakterien wesentlich gesteigert werden. Um den die Elektroporationsküvette durchfließenden Strom möglichst klein zu halten, muss die DNA für dieses Transformationsverfahren in H₂O gelöst sein. Ligationsansätze wurden deshalb vor der Elektroporation einer Ethanol-fällung unterzogen, mehrmals mit 70 % Ethanol gewaschen und in geringem Volumen H₂O dest. aufgenommen.

50 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen wurden mit der vorbereiteten DNA vermischt und in die vorgekühlte Elektroporationsküvette (Invitrogen, d=2mm) überführt. Im Genepulser (Biorad) wurde bei 2.500 V, einer Kapazität von 25 µF und einem Paralellwiderstand von 400 Ω elektroporiert. Direkt nach dem auslösenden Spannungsschoss wurde der Elektroporationsansatz in 1ml SOC-Medium überführt und 1 Stunde bei 37°C im Bakterien-schüttler inkubiert. Verschiedene Mengen des Ansatzes wurden anschließend auf LB/Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.8 Zellbiologische Methoden

4.8.1 Einfrieren von Zellen

Etwa 1×10^6 Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin überschichtet und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden nach Ablösung von den Zellkulturflaschen in 5ml Medium aufgenommen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 100xg sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 1ml Einfriermedium (60% FCS, 30% DMEM und 10% DMSO) aufgenommen, sofort in Cryotubes überführt und bei -80°C weggefroren. Nach etwa 24 Stunden wurden die Zellen für langfristige Lagerungen in flüssigem Stickstoff überführt.

4.8.2 Auftauen von Zellen

Tiefgefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C rasch aufgetaut und in 10ml Medium überführt. Zum Entfernen des toxischen DMSO wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 100xg sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10ml Kulturmedium ohne Antibiotikum aufgenommen, in Zellkulturflaschen überführt und bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium nochmals erneuert oder durch Medium mit Antibiotikum ersetzt.

4.8.3 Zellzählung

Um bei der Transfektion von Zellen vergleichbare Resultate zu erhalten, ist es von Bedeutung, möglichst konstante Versuchsbedingungen zu schaffen und deshalb die Zellzahl und damit die Konfluenz am Tag der Transfektion (80-90% Konfluenz) durch kontrolliertes Aussäen gleich zu halten. Einen Tag vor der Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA wurden diese mit PBS gewaschen, trypsiniert und in definierter Menge Medium aufgenommen. 10µl dieser Zellsuspension wurden in 40µl Trophanblau 1:5 verdünnt und die Zellzahl pro ml in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die für das Ausplattieren erforderliche Zellmenge wurde dann mit Medium auf das erforderliche Volumen verdünnt und in die entsprechenden Zellkulturflaschen bzw. Zellkulturschalen ausgesät

4.8.4 Transiente Transfektion

Für die Untersuchung von Gen- und Proteinexpression in Zellen wurden die verwendeten Zelllinien (HuH-7; HuH-7/Mono; HuH-7/BB7; CF2, 293T, HT1080) entweder nach der Calcium-Phosphat-Methode oder mit Lipofectamine 2000 mit Plasmid-DNA transfiziert. Die Zellen wurden dann nach 2–5 Tagen für experimentelle Zwecke extrahiert.

4.8.4.1 Calciumphosphat-Präzipitation

Diese Methode zur Einschleusung von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen beruht auf der Bildung von DNA-Calciumphosphat-Präzipitaten, die unter Schockbedingungen endocytotisch von der Zelle aufgenommen werden.

Einen Tag vor der Transfektion wurden $2-3 \times 10^4$ HuH-7 Zellen/cm² in verschiedenen Zellkulturflaschen oder 6-well-Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurde 2-3 Std vor dem

Transfektionsbeginn das Medium erneuert. Unter Belüftung mit einer Pasteurpipette wurden dann 12,4µl CaCl₂ zu insgesamt 3µg Plasmid-DNA dazugegeben und mit dH₂O auf 100µl aufgefüllt (Ansatz A, bezogen auf 9,5cm²). Dieser Ansatz wurde dann wiederum unter Belüftung durch eine Pasteurpipette in 100µl 2x HBS (Ansatz B) überführt. Nach 20minütiger Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz auf die zuvor mit 1ml DMEM überschichteten Zellen gegeben. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Zellen 7 Stunden später erst mit PBS gewaschen und anschließend mit neuem Medium überschichtet. 72 Stunden nach der transienten Transfektion mit Calciumphosphat wurden die Zellen in verschiedenen Studien eingesetzt.

4.8.4.2 Lipofectamine 2000

Lipofectamine ist eine Liposomen-Formation die aus kationischen und neutralen Lipiden (3:1; w/w) besteht. Durch den amphiphilen Charakter interagieren die kationischen Lipide des Lipofectamines spontan mit DNA und bilden Lipid-DNA-Komplexe. Durch die Fusion der Zellmembran mit dem Lipid-DNA-Komplex wird die DNA direkt ins Zytoplasma freigesetzt und nicht über Endocytose wie bei Calciumphosphat oder DEAE-Dextran.

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und in Medium aufgenommen 10µl der Zellen wurden in 40µl Trophanblau 1:5 verdünnt und durch Auszählung in der Neubauer-Zählkammer auf 2-3 x 10⁴ Zellen/cm² eingestellt und in T25/T75 Zellkulturflaschen ausgesät. Am Tag der Transfektion (80-90% Konfluenz) wurde das Medium der Zellen entfernt, mit Opti-MEM gewaschen und die Zellen mit neuem Medium (Opti-MEM) überschichtet. Dann wurde zum einen pro Ansatz 2,7µl Lipofectamine2000 in 50µl Opti-MEM (Ansatz A) und zum anderen insgesamt 5µg DNA in ebenfalls 50µl Opti-MEM (Ansatz B) verdünnt (bezogen auf 9,5 cm²). Beide Ansätze wurden nach 5 Minuten Inkubation miteinander vermischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen geträufelt. Nach 5 Stunden Inkubationszeit bei 37°C/ 5% CO₂ wurde das Transfektionsmedium abgenommen, mit PBS gewaschen und neues Medium ohne Antibiotikum dazugegeben.

4.8.5 Stabile Transfektion

Neben der transienten Transfektion können eukaryotische Zellen auch stabil mit eukaryotischen Expressionsplasmiden transfiziert werden und stehen damit dauerhaft für Untersuchungen zur Verfügung. Dabei wird das Plasmid dauerhaft in das Genom der Zelle

integriert und nicht rekombinante Zellen werden durch die anschließende Antibiotika-Gabe eliminiert.

Am Vortag der Transfektion wurden HuH-7 oder HuH-7/Mono Zellen auf $2-3 \times 10^4$ Zellen/cm² eingestellt, in T25 Zellkulturflaschen ausgesät und die Transfektion, wie mit der Calcium-Phosphat-Technik beschrieben, durchgeführt. Um den Zellen eine Regenerationsphase von der unter zelltoxischen Bedingungen durchgeführten Transfektion zu ermöglichen, wurden sie erst 48 Stunden danach mit entweder 350µg/ml Hygromycin für die Selektion von pcDNA3.1/Hygro-Konstrukten oder mit 350µg/ml G418 für die Selektion von siRNA-exprimierenden Plasmiden mit Neomycin-Resistenz versehen. Um stabile Zelllinien aus Einzelklonen zu erhalten wurden dann die selektionierten und hochgewachsenen Zellen trypsiniert, in 10 ml Medium verdünnt, in 96-well-Platten ausgesät und Wells mit Einzelklonen wieder selektioniert und weiter kultiviert. Das Vorhandensein der integrierten DNA wurde mittels PCR analysiert.

4.8.6 Immunofluoreszenz-Färbung

Zur Untersuchung der tCD4-Rezeptor-Expression verschiedener erstellter Konstrukte wurden Analysen mittels CD4-FITC-Antikörper im fluorescence-activated cell sorter FACScalibur durchgeführt. Der FITC-konjugierte Anti-Maus Antikörper CD4 (Miltenyi Biotec) wurde als Detektionsantikörper verwendet.

Trypsin verdaut Oberflächenrezeptoren und deshalb wurden die Zellen mittels PBE abgelöst, in 10ml PBS aufgenommen und 5 Minuten bei 100xg und 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge RF) abzentrifugiert. Nach Aufnahme des Zellpellets in PBS zu 5×10^6 Zellen/ml wurden die Zellen mit 10µl CD4-FITC für 30 min lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zentrifugiert, in 2ml PBS aufgenommen und bis zur Messung im FACScalibur oder zur Sichtung im Mikroskop lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

4.8.7 Magnetische Zellseparation

Bei der Transfektion von Zellen kann die Transfektionseffizienz erheblich variieren und Ergebnisse in Untersuchungen verfälschen. Die magnetische Zellselektion ist eine Methode, um transient transfizierte Zellen mittels Zelloberflächenrezeptors von nicht transfizierten Zellen zu trennen und selektiv für weitere Untersuchungen zu ernten. Deshalb wird das Plasmid, dass die zu untersuchende Gensequenz enthält, zusätzlich mit dem Vektor

pMACS4.1, der einen verkürzten CD4-Oberflächenrezeptor („truncated CD4“) exprimiert, in die Zielzellen co-transfiziert. Das Fehlen der intrazellulären Domäne des tCD4 verhindert die ursprünglich vorhandene Signaltransduktion des CD4-Rezeptors. Durch die vorhandene extrazelluläre CD4-Domäne können co-transfizierte Zellen durch magnetische MicroBeads, die mit einem monoklonalen CD4-Antikörper konjugiert sind, gebunden und über eine magnetische Säule isoliert werden.

Transfizierte Zellen wurden 3-5 Tage nach der Transfektion mit PBS gewaschen und mit PBE vom Kulturflaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 100xg zentrifugiert und das Pellet in 800µl PBS aufgenommen. Nach Zugabe von 90µl CD4-MicroBeads wurde die Zellen 15 Minuten bei 20°C und 400 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert. Währenddessen wurden die Säulen im MACS-Separator mit 500µl entgastem PBS equilibriert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit zusätzlichen entgastem 1200µl PBS verdünnt und in 500µl Aliquots zur Bindung der CD4-positiven Zellen auf die magnetische Säule gegeben und durchlaufen gelassen. Die Säulen wurden mit 6 x 500µl entgastem PBS gewaschen und die an die Säulen gebundenen transfizierten Zellen dann mit 1000µl PBS eluiert. Die eluierten Zellen wurden in zwei Eppendorfhüttchen aufgeteilt, zentrifugiert und die Pellets in 100µl 1xWesternblot-Puffer und 600µl β-Mercapto/RLT-Puffer aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C weggefroren.

4.8.8 Propidiumiodid-Färbung

Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngigen Nukleinsäuren interkaliert und mit dem der DNA-Gehalt von Zellen in der Durchflusszytometrie gemessen werden kann. Um kein verfälschtes Ergebnis zu erhalten, müssen die Zellen jedoch zuvor zusätzlich mit RNase A behandelt werden, um doppelsträngige RNA (rRNA, tRNA) zu eliminieren. Propidiumiodid wird durch Laserlicht mit einer Wellenlänge von 488nm angeregt und emittiert rotes Licht mit Wellenlängen um 600nm.

Die zu untersuchenden Zellen (6×10^5) wurden mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in 5ml PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation von 5 Minuten bei Raumtemperatur und 100xg wurde das Zellpellet in 200µl Kernfärbelösung aufgenommen und für 15 Minuten bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden 200µl RNase-A-Lösung dazugegeben und nochmals für 15 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 400µl FACS-Messpuffer wurden die

Zellen bis zur Messung im FACScalibur in Aluminiumfolie lichtgeschützt verpackt und bei 4°C aufbewahrt.

Kernfärbelösung	150 µg/ml Propidiumiodid-Lösung (1mg/ml), 4mM Natriumcitrat, 1%BSA, 1% Triton X-100
RNase-A-Lösung	Rnase A (10 mg/ml), 10mM Tris (pH7,5), 15mM NaCl
FACS-Messpuffer	10mM Tris (pH7,5), 10mM NaCl

4.8.9 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Die Messung der fluoreszierenden Oberflächenrezeptoren (tCD4-AK-Staining) sowie die Bestimmung des DNA-Gehalts (Propidiumiodid-Färbung) erfolgte in einem Becton-Dickinson FACScalibur bei einer Anregungswellenlänge von 488nm, im grünen Spektralbereich bei 520nm, und wurden zum Leuchten angeregt. Gemessen wurden zum einen die Beschaffenheit der einzelnen Zellen durch FSC (Zellgrösse) und SSC (Granularität) in einem ersten Histogramm und zum anderen die Zellzahl bei verschiedenen Propidiumiodid-Intensitäten (FL-2) in einem zweiten Histogramm. Die Auswertung wurde mit Hilfe der WinMDI-Software Version 2.6 durchgeführt.

Bei der Propidiumiodid-Färbung konnte in Zellpopulationen durch die Intensität der Propidiumiodid-Fluoreszenz auf die prozentuellen Anteile der sich in der G1- (einfacher Chromosomensatz 2n), S- (Synthesephase >2n) und G2/M- (doppelter Chromosomensatz 4n) Phase befindlichen Zellen geschlossen werden. Durch diese Daten konnten Rückschlüsse auf den Ablauf des Zellzyklus unterschiedlicher Zellpopulationen gezogen werden.

4.8.10 Präparation nukleärer Extrakte

Bei HuH-7 Zellen, die transient oder stabil mit siRNAs, Antisense-Oligonukleotiden und Ribozymen transfiziert wurden, sollten nukleäre Extrakte zur Untersuchung von Proteinen im Nukleus präpariert werden.

Dabei wurden die Zellen nach der entsprechenden Inkubationszeit der Untersuchung durch magnetische Zellseparation geerntet und in 500µl PBS aufgenommen. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 1000xg wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet

vorsichtig in 200µl NPBT-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nach 10 Min. Inkubation auf Eis in einem Eppendorfgefäß auf 200µl eines 50 %igen Succrosekissens (50 % Succrose in NPB) geladen und für 10 Min. bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand und das Succrosekissen wurden vorsichtig abgesaugt und das Kernpellet in einem Volumen von 100µl Dignam C resuspendiert und 30 Min. bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Durch einen erneuten Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14.000 rpm wurden die Membranen erneut pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Proteingehalt mittels Bradford-Protein Test ermittelt.

NPB	10mM Tris/HCL (pH 7,4), 2mM MgCl ₂ , 140mM NaCl
Inhibitoren (Tabl.)	1mM Na ₃ VO ₄ , 2mg/ml Aprotinin, 0,5mM PMSF/ 0,5mM DTT
NPBT	NPB, 0,5% TritonX-100, 1 Tabl. Inhibitoren ad 10ml
NPB/ Succrose	NPB, 50% Succrose, 1Tabl. Inhibitoren ad 10ml
Dignam C	20mM Hapes (pH 7,9), 25% Glycerol, 0,42M NaCl, 0,2mM EDTA, 1Tabl. Inhibitoren ad 10ml

4.8.11 β-Galactosidase-Test

Die Expression des β-Galactosidase-Gens wird in dem Plasmid pCMVβ von einem sehr starken CMV Promoter gesteuert und dient allgemein zur Überprüfung der Transfektionseffizienz. Darüber hinaus werden die in dem Luciferase-Test erhaltenen Messungen der Luciferaseaktivitäten mit den β-Galactosidase-Werten aus derselben Transfektion für die Darstellung der Versuchsergebnisse abgeglichen. Die in Zellextrakten vorhandene Aktivität der β-Galactosidase kann dabei durch die Umsetzung von ONPG in einer Farbreaktion spektrophotometrisch nachgewiesen und quantifiziert werden.

Von dem für die Luciferase-Messung geernteten Zell-Lysat (350µl) wurden 10µl des Zell-Lysats in dreifachem Ansatz in 96-well-Platten vorpipettiert und dann 100µl β-Gal-Test-Puffer dazugegeben. Der Ansatz wurde dann bei 37°C etwa 30 Minuten im Dunkeln inkubiert

und bei einer leichten Gelbfärbung die Reaktion mit 50µl Na₂CO₃ abgestoppt. Im Anschluss wurden die Reaktionsansätze bei einer Wellenlänge von 405nm im Photometer (Lambda Scan 200e) gegen einen Leerwert gemessen. Um die β-Galactosidase-Werte als Korrekturgröße zu nutzen, sollten sich alle Werte im linearen Bereich befinden, der sich bei der OD₄₀₅ zwischen 0,2 und 0,8 befindet.

β-Gal-Test-Puffer 60mM Na₂HPO₄, 39mM NaH₂HPO₄, 10mM KCl, 1mM MgSO₄, 2 mM DTT, 1mg/ml ONPG

4.8.12 Luciferase-Test

Diese Methode zur Quantifizierung von Promoteraktivitäten basiert auf der durch Firefly Luciferase katalysierten Oxidation von Luciferin und der dadurch hervorgerufenen Photonenemission.

Bei den transienten Transfektionen wurden zu 4µg Plasmid-DNA 500ng β-Galactosidase-DNA und 500ng Firefly-Luciferase-Plasmid dazugegeben und die Zellen je nach Versuchsbedingungen nach 3-5 Tagen mit PBS gewaschen und 350µl Extraktionspuffer auf die Zellen gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die sich ablösenden Zellen aufgenommen, 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfhüttchen überführt und bis zur Aktivitätsmessung bei -20°C eingefroren. Zur Messung der Luciferaseaktivität wurden 300µl Luciferase-Messpuffer in Sarstedt Röhrchen mit 50µl Zell-Lysat vermischt und die Lumineszenz im Luminometer „Lumat“ (Fa. Berthold) gemessen (Injektion von 100µl Luciferinlösung je Probe).

Für die Interpretation von Versuchsergebnissen wurde dann die ermittelte Luciferaseaktivität mit den im anschließenden β-Galactosidase-Test ermittelten Werte abgeglichen. Dabei wird der Quotient aus Luciferase- und β-Galactosidase-Werte dargestellt.

5 x Extraktionspuffer 125mM Tris/ H₃PO₄ pH 7,8, 10mM EDTA pH 8,0, 50% Glycerol [v/v], 5 % Triton-X100 [v/v], 2mM DTT (frisch dazugeben)

Luciferase-Messpuffer	25mM Glycylglycin, 15mM MgSO ₄ , 5mM ATP (frisch dazugeben)
Luciferin-Lösung	250µM Luciferin

4.9 RNA Methoden

4.9.1 RNA-Extraktion und Aufreinigung

Die Extraktion und Aufreinigung von Gesamt-RNA, erfolgte mittels RNeasy Mini Kit von QIAGEN. Dabei werden nur RNA Moleküle aufgereinigt, die länger als 200 Nukleotide sind. Kleine RNAs, wie 5.8S RNA (160 Nukleotide), 5S RNA (120 Nukleotide), und tRNAs (70-90 Nukleotide) werden von den „silica-gel membrane“-Säulen nicht gebunden. Gewebestücke aus bei -80°C gefrorenen Leberbiopsien wurden in 600µl β-Mercapto-/RLT-Puffer überführt und in einem Ultraturrax homogenisiert. Nach Zentrifugation des Homogenisats für 5 Minuten bei 300xg und 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu den 600µl der homogenisierten Lysate der Leberbiopsien sowie den in 600µl β-Mercapto/RLT-Puffer aufgenommenen transient transfizierten und anschließend selektierten HuH-7 Zellen wurde 1 Volumen 70% Ethanol zugeführt, gemischt und auf die RNeasy Mini Spin Säule gegeben. Da eine Verunreinigung mit DNA nicht ausgeschlossen werden kann, wird nach den 15 Sekunden Zentrifugation bei 8.000xg RNase-freie DNase- (10µl DNaseI + 70µl RDD) zum Verdauen der eventuell übrig gebliebenen DNA auf die Säule gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit Puffer RW1/RPE wird die RNA in 2x 30µl H₂O dest. eluiert. Die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der RNA wurde spektrophotometrisch ermittelt und die RNA dann bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

4.9.2 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Für die Herstellung einer Gen-Library, für die Polymerase Kettenreaktion oder für Untersuchungen der RNA im Lightcycler muss die aus dem Gewebe extrahierte Ribonukleinsäure erst durch die reverse Transkriptase SuperScriptII RNaseH in Desoxyribonukleinsäure umgeschrieben werden.

Dabei werden 9µl RNA (2µg) bei 70°C für 4 Minuten mit 1µl 10µM Randomprimer inkubiert (Annealing) und anschließend auf Eis abgekühlt. Dieser Ansatz wurde danach mit 4µl 5xFirst strand buffer, 2µl 0,1M DTT, 2µl 10mM dNTP, 1µl RNaseOUT und 1µl SuperScript II auf insgesamt 20µl aufgefüllt und 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach 60-minütiger Inkubation bei 42°C wurde die Reaktion durch Enzyminaktivierung bei 75°C für 15 Minuten gestoppt.

4.9.3 RNA-Agarosegelelektrophorese

RNA-Proben wurden in einem Agarosegel (1,2%) in MOPS-Puffer bei einer elektrischen Feldstärke von 3-4V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Der Mops-Puffer wurde zusätzlich mit 0,22M Formaldehyd versetzt, welches an der Denaturierung der RNA beteiligt ist, indem es kovalent an Aminogruppen der Basen bindet und dadurch Basenpaarbildungen verhindert. Die Ansätze enthielten 10–20µg RNA in einem definierten Volumen, dem 0,2 Volumen RNA-Ladepuffer zugesetzt wurde. Um unerwünschte Sekundärstrukturen zu denaturieren, die ideale Laufbedingungen beeinträchtigen würden, wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und danach bis zum Auftrag der Proben auf Eis gestellt. Nach Beendigung des Gellaufes wurden die RNA-Proben im Gel-Doc unter UV-Licht dahin gehend überprüft, ob die RNA erfolgreich aufgetrennt und auch nicht degradiert wurde. Zur Vorbereitung des Northern Blot Verfahrens wurde das Gel dann für 1 Stunde in 20xSSC schwenken gelassen.

20xMOPS	400mM MOPS, 100mM Natriumacetat, 20mM EDTA; pH 7,0 mit 1N NaOH eingestellt
20xSSC-Puffer	3M NaCl, 0,3M Na ₂ -Citrat(2H ₂ O), pH 7,0
5xRNA-Ladepuffer	0,5% Bromphenolblau, 25mM EDTA, pH 8,0, 1% Ethidiumbromid (10mg/ml), 1,1M Formaldehyd, 20% Glycerol, 30% Formamid, 20% 20xMOPS, ad H ₂ O bidest.

4.9.4 Northern Blot

Beim Northern Blot Verfahren wurde die zu analysierende RNA zuerst unter stark denaturierenden Bedingungen in einem MOPS-Agarose-Gel mit Zusatz von Formaldehyd entsprechend ihrer Molekulargröße elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die RNA durch Kapillarkräfte aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylon-Membran transferiert. Hierzu wurde eine Hybond N⁺-Nylonmembran kurz mit bidestilliertem H₂O benetzt und danach 10 Minuten in 20xSSC geschwenkt. Eine Schale wurde mit 20xSSC gefüllt und der Gelträger umgedreht hineingelegt. Ein zurechtgeschnittenes Whatman-paper wurde über diesen Gelträger gelegt und ragte auf beiden Seiten tief in die Salzlösung hinein. Auf dieses Filterpapier wurde das Gel mit den Geltaschenöffnungen nach unten gelegt und luftblasenfrei mit der Hybond-N⁺-Nylonmembran bedeckt. Darauf wurden 3 Lagen Whatman-Filterpapier gelegt, dann ein ganzer Stapel saugfähiger Zellstoff, eine Glasplatte und abschließend ein Gewicht von etwa 500g zur Beschwerung. Der Transfer der RNA auf die Membran durch die Kapillarwirkung fand über Nacht statt. Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut, das Gel markiert, getrocknet und die RNA anschließend im Stratalinker bei 1200 Watt auf der Membran kreuzvernetzt (Crosslinking). Bis zur Weiterverwendung wurde die Membran in Folie eingeschweißt und aufbewahrt.

4.9.5 Radioaktive „random-primed“ DNA-Markierung

Die Methode der „random-primed“ DNA-Markierung wurde mittels High Prime DNA Labeling Kit (Fa. Roche) durchgeführt und basiert auf der Hybridisierung von Oligonukleotiden aller möglichen Sequenzkombinationen an die zuvor hergestellten etwa 100-200bp langen zu markierenden DNA-Sonden. Der zur DNA-Sonde komplementäre DNA-Strang wird von der Klenow-Polymerase unter Verwendung der 3'OH-Enden der „random“-Oligonukleotide als Primer synthetisiert. Dabei wird radioaktiv markiertes ³²P-α dCTP in den Komplementärstrang mit eingebaut.

Pro Ansatz wurden 25ng DNA-Substrat mit bidestilliertem Wasser auf 8μl aufgefüllt, 10 Minuten bei 95°C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt. Dann wurden 4μl High Prime Kit, 3μl High Prime Mix sowie 5μl [³²P]dCTP dazu pipettiert. Durch 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurden radioaktive Sonden mit hoher spezifischer Aktivität (2x10⁹dpm/μg) erhalten und die Reaktion durch Zugabe von 0,2M EDTA (pH 8,0)

abgestoppt. Nicht eingebaute Desoxyribonukleosid-Triphosphate wurden durch Zentrifugation über Sephadex Säulen aus dem Reaktionsgemisch entfernt.

High Prime Kit	12-mer Random-Primer Mischung, 1U/μl Klenow-Polymerase, 5x stabilisierter Reaktionspuffer in 50% Glycerin (v/v)
High Prime Mix	0,5mM 2'-Desoxyadenosin-5'Triphosphat, 0,5mM 2'-Desoxyguanosin-5'Triphosphat, 0,5mM 2'-Desoxy-Thymin-5'Triphosphat, in Tris-Puffer

4.9.6 Hybridisierung der RNA mit radioaktiven DNA-Sonden

Die zu markierende Northern Blot Membran wurde luftblasenfrei an die innere Wand einer mit bidest. Wasser gefüllten Hybridisierungsflasche gelegt, das Wasser wieder entfernt und 10ml QuickHyb-Lösung dazugegeben. Nach einer Prähybridisierung von mindestens 1 Stunde bei 60°C wurde die radioaktive DNA-Sonde nach Zugabe von Salmon Sperm und Erhitzen auf 95°C auf die prähybridisierte Membran gegeben und über Nacht bei 60°C im Hybridisierungsöfen inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung verworfen und ungebundene DNA-Sonden auf der Membran durch Waschgänge mit 2xSSC bei Raumtemperatur und 1xSSC bei 40°C entfernt. Die Membran wurde anschließend in Kunststoffolie eingeschweißt und über Nacht in einer Expositionscassette belassen. Am Tag darauf wurden die radioaktiven Signale auf der Expositionsmembran im PhosphoImager mit dem Programm pcBAS2.1 gemessen. Einige Membranen sollten mit einer anderen radioaktiven Sonde hybridisiert werden und so musste die vorherige Sonde durch Erhitzen und Schwenken der Membran in 0,1% SSC bei 95°C für 1 Stunde entfernt werden. Die erneute Hybridisierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

2xSSC	50ml 20xSSC, 5ml 10% SDS, ad 500ml
1xSSC	25ml 20xSSC, 5ml 10% SDS, ad 500ml
0,1xSSC	2,5ml 20xSSC, 5ml 10% SDS, ad 500ml

4.10 Biochemische Methoden

4.10.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Untersuchung von Zellextrakten auf Proteinebene musste die Gesamtkonzentration an Proteinen ermittelt werden. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford basiert auf einer Veränderung eines Farbstoffes (Bradford et al., 1976). Dabei bindet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine und verändert das Absorptionsmaximum der Farbe von 465nm ohne Protein auf 595nm mit Protein. Die Intensität der Färbung bei 595nm kann dann im Spektralphotometer gegen einen Leerwert gemessen werden und die exakte Proteinkonzentration über eine BSA-Eichreihe (1-20µg) berechnet werden. Für die Charakterisierung von Proteinen im Western blot Verfahren ist die relative Konzentration der einzelnen Proben zueinander wichtiger als die tatsächliche Menge und kann ohne BSA-Eichreihe durch die Formel $(OD_{595} * 18,526) - 0,53 = x \text{ µg/µl Protein}$ relativ gut an die tatsächliche Gesamtkonzentration angenähert werden.

Die im 1xWB-Puffer aufgenommenen Zellextrakte wurden zuerst 5 Minuten bei 95°C für die Auflösung von Tertiärstrukturen erhitzt und langsam abgekühlt. In einer Küvette wurden dann 799µl H₂O mit 200µl Biorad-Dye-Reagent-Concentrate (Fa. Biorad) vermischt (1:5 Verdünnung) und 1µl des Extrakts dazugegeben und nach 10 Minuten Inkubation im Spektralphotometer bei 595nm gemessen.

4.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinwechselwirkungen werden im WB-Puffer durch die Reduktion von Disulfidbindungen durch β-Mercaptoethanol unterbunden und die Proteine letztlich durch SDS denaturiert. Proteine können dann aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte in SDS-Gelen aufgetrennt und anschließend durch Coomassie-Färbung oder Western blot Verfahren als Proteinbanden dargestellt werden.

Es wurden je Ansatz 10µg Protein mit 1xWB-Puffer auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt und bei 95°C 5 Minuten aufgekocht. Nach Abkühlung wurden die Ansätze und 10µl eines Molekulargewichtstandards (Fa. Biorad) auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 30mA und wurde gestoppt, sobald die Lauffront des Bromphenolblaus aus dem Gel ausgetreten war.

Trenngel (12%)	6ml Acrylamid [30%]/ Bisacrylamid [0,8%], 3,75ml WB-Lösung A, 5,25ml H ₂ O, 30µl TEMED, 37,5µl Ammonium Peroxid Sulfat [10%]
Sammelgel (3,5%)	1,1ml Acrylamid [30%]/ Bisacrylamid [0,8%], 2,5ml WB-Lösung B, 6,5ml H ₂ O, 20µl TEMED, 40µl Ammonium Peroxid Sulfat [10%]
WB-Lösung A	1,5M Tris, 0,4% SDS, ad 1000ml H ₂ O
WB-Lösung B	0,5M Tris, 0,4% SDS, ad 1000ml H ₂ O
1xWB-Puffer	50mM Tris-HCL pH 6,8, 10% Glycerol (v/v), 2% SDS (w/v), 0,05% Bromphenolblau (w/v), 2,5% β-Mercaptoethanol (v/v), ad 10ml H ₂ O, Aliquots bei -20 °C
10xSDS-Laufpuffer	250mM Tris, 1,92M Glycine, 1% SDS, ad 1000ml H ₂ O

4.10.3 Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung von SDS-Gelen

Die im Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue dargestellt werden. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei 0,1-2µg pro Proteinbande. Die geladenen Proteinmengen lassen sich auf diese Weise optisch abschätzen, so dass Coomassie-gefärbte Gele als Beladungskontrolle für nachfolgende spezifische Nachweisverfahren wie z.B. Western blot dienen. Es wurde eine fertige kolloidale Coomassie-Suspension der Fa. Roth gemäß der Vorschrift des Herstellers verwendet.

4.10.4 Western blot

Mit Hilfe des Western blot Verfahrens können Proteine, die vorher in der SDS-PAGE anhand der Molekulargewichte aufgetrennt wurden, spezifisch nachgewiesen werden. Dabei werden bei Anlegen einer Spannung in einem Semi-Dry-Blotter die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran transferiert. Nach Absättigung der

Proteinbindungsstellen der Membran durch geeignete Blocking-Lösungen wird diese durch spezifische Primär-Antikörper markiert, an die dann sekundäre mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Antikörper binden. Die alkalische Phosphatase kann dann ein chemilumineszierendes Substrat umsetzen und dieses folglich durch Lichtemissionen von 461–466nm sichtbar gemacht werden.

Die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden in einer Semidry-Blot-Apparatur auf eine mit Methanol angefeuchtete Nylonmembran transferiert. Der Proteintransfer wurde mit Transferpuffer bei Raumtemperatur bei 30V/300mA in 40 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in Blocking Lösung (Fa. Invitrogen) abgesättigt, um unspezifische Proteinbindungen durch Antikörper zu verringern. Nach kurzem Waschen wurde die Membran dann mit dem 1. spezifischen Antikörper für 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde anschließend zweimal in Antikörper-Wasch-Lösung (Fa. Invitrogen) gewaschen und dann wieder für 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem spezifischen Kontroll-Antikörper (β -Actin-Antikörper) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde die Membran letztendlich mit dem alkalischen Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem doppeltem Waschvorgang wurde der Blot mit dem Substratansatz gemäß den Angaben des Herstellers (Western Breeze Kit, Fa. Invitrogen) entwickelt. Die durch die alkalische Phosphatase emittierte Chemilumineszenz durch Substratumsetzung wurde in einem Filmentwickler (Optimax, Fa. Protec Medizintechnik) auf einem Röntgenfilm fixiert.

Transferpuffer	39mM Glycine, 48mM Tris-HCL, 0,037% SDS, 20% Methanol, pH 8,3
Blocking Solution	20% Blocker/ Diluent Part A [v/v], 30% Blocker/ Diluent Part B [v/v], ad H ₂ O
Blocker/ Diluent Part A	Konzentrierte Detergenz enthaltende Salzlösung
Blocker/ Diluent Part B	Konzentrierte Hammesten Casein Lösung

4.11 Retrovirale Arbeitsmethoden

4.11.1 Produktion von Retroviren

Für die Produktion von Retroviren muss eine Verpackungszelllinie mit dem retroviralen siRNA-Plasmid pSuppressorRetro sowie mit den für die Virushülle kodierenden Plasmiden env- und vsv-g co-transfiziert werden. Die dann entstehenden Viren können mit dem Mediumüberstand entnommen und bis zur Weiterverwendung bei -80°C weggefroren werden. Da die adhärenente Verpackungszelllinie 293T sehr empfindlich ist und sich schnell vom Boden der Zellkulturflaschen ablösen, mussten 10cm Zellkulturschalen für die verbesserte adhärenente Haftung der Zellen am Vortag des Ausplattierens mit 0,01% Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet werden. Die Lösung wurde 5 Minuten auf den 10cm Schalen inkubiert, die Lösung wieder abgenommen, dann die Platten für 2 Stunden trocknen gelassen und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Am Tag der transienten Transfektion sollte die Konfluenz der Zellen etwa 80% betragen. Die Transfektion wurde entsprechend der bereits beschriebenen Calciumphosphat-Präzipitation durchgeführt. Am Tag 2, 3 und 4 wurde jeweils der Virus-enthaltende Medium-Überstand abgenommen. Der Überstand wird dann für 10 Minuten bei 2000rpm und 4°C zentrifugiert, um Zellreste zu pelletieren. Der Überstand wird dann durch einen $0,45\mu\text{m}$ Millipore Millex HV-Filter in ein 15ml Falcon filtriert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung weggefroren.

4.11.2 Virus-Titer-Test

Um den Virustiter für die Transduktion der Retroviren zu bestimmen, wurden am Vortag der Transduktion HT1080-Zellen in einer Dichte von 2×10^4 Zellen/ cm^2 in 6-well-Platten ausplattiert. Am Tag der Transduktion wird 2ml DMEM mit $16\mu\text{g}$ Polybrene, das unspezifische Oberflächenrezeptoren blockiert, in den 6-wells vorgelegt. Die Virussuspension wird bei im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, $100\mu\text{l}$ Suspension entnommen und 1:10 und 1:100 Verdünnungen in DMEM hergestellt. Es wurden jeweils $20\mu\text{l}$ Virussuspension der 1:1-, 1:10- und 1:100-Ansätze in Doppelansätze auf die HT1080-Zellen pipettiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Virus als Negativkontrolle und Virus eines bekannten Titers als Positivkontrolle mit angesetzt. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch neues Medium mit G418 ersetzt und bis zum Tag 12 immer wieder erneuert. Am Tag 12 wurde der Virustiter durch eine Coomassie Blue Färbung bestimmt. Dabei wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 1ml/well Coomassie Blue auf die Zellen gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und 1 Stunde trocken gelassen. Die positiv transduzierten Zellen konnten dann durch Ihre Blaufärbung am Mikroskop ausgezählt werden und nach der Formel $CFU \text{ (Colonie forming unit)/ml} = (\text{Kolonien} \times \text{Verdünnung} \times 1000) / \text{transduziertes Volumen}$ ausgewertet werden.

4.11.3 Transduktion von HuH-7 mit Retroviren

Am Vortag der Transduktion wurden HuH-7 Zellen in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen/cm² ausplattiert, so dass sie eine Konfluenz von etwa 70 % erreichen. 3,5ml der Virussuspension wurden nach dem Auftauen mit 8µg/ml Polybrene versetzt, auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Transduktion noch einmal wiederholt und am Tag 3 dann neues Medium inklusive G418 dazugegeben. Eine Negativkontrolle, die nicht transduziert wurde, galt bei Absterben durch das Selektionsmedium als Anhalt für die erfolgreiche Selektion angewachsener HuH-7 Zellen.

5. Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der Bedeutung zellulärer Proteine für die subgenomische HCV Replikation und Translation

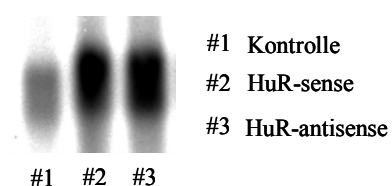
Für einen optimalen Replikationszyklus ist das Hepatitis C Virus neben den eigenen viralen Proteinen auch auf die Nutzung von zellulären Transkriptions- und Translationsfaktoren der Wirtszelle angewiesen. So sollte die Expression verschiedener zellulärer Proteine, die als HCV Kofaktoren in Frage kommen, in den Hepatocyten durch Antisense-RNA gehemmt oder durch Sense-RNA erhöht werden. Eine Überprüfung der Auswirkung auf die Replikation und Translation des Hepatitis C Virus sollte dann auf Protein und RNA Ebene in der humanen Hepatocytzelllinie HuH-7, die in einer zusätzlichen modifizierten Version ein monocistronisches subgenomisches HCV Replikon exprimiert, durchgeführt werden.

5.1.1 Klonierung von Sense- und Antisense-Plasmiden

Potentielle HCV Kofaktoren (HuR; PSMA1; PSMA7; PTB; hnRNP C) sollten mittels spezifischer 5' und 3'-Primer aus einer cDNA- Bibliothek amplifiziert werden. Diese Primer beinhalteten Restriktionsschnittstellen, mit denen die Amplifikate sowohl in Sense- als auch in Antisense-Richtung in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+)_{hygro} kloniert werden konnten. Nach Amplifikation der Gene wurden die Fragmente aufgereinigt, in pcDNA3.1_{hygro} kloniert und mittels Restriktionsverdau auf Richtigkeit des Produkts überprüft. Abschließend wurden die klonierten Sense- und Antisense-Plasmide kommerziell durch MWG Biotech sequenziert.

5.1.2 Überexpression der Gene in monocistronischen HCV Replikonzellen

Nach transients Transfektion der verschiedenen Expressionsplasmide in HuH-7 Zellen sollte zuerst die intrazelluläre Expression der genspezifischen mRNA im Northern Blot-Verfahren überprüft werden. Dadurch kann die Funktionalität des Expressionssystems nachgewiesen und mögliche Fehlfunktionen ausgeschlossen werden. So wurde



die mRNA der Gene quantitativ mit PCR-synthetisierten ^{32}P -radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert und mit pcBAS nachgewiesen. Es zeigte sich, dass in allen Fällen die Transfektion der Sense-Konstrukte in HuH-7 Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (pcDNA3.1(+)-hygrotransfizierter Leervektor) zu einer deutlichen Überexpression der genspezifischen mRNA führte. Da die durch PCR hergestellte radioaktive Sonde mit beiden Strängen hybridisiert, konnte auch die Überexpression der Antisense-mRNA des jeweiligen Gens gezeigt werden.

Dabei konnte beobachtet werden, dass die plasmid-basierte Überexpression der verschiedenen Gene auf RNA-Ebene trotz der Nutzung des gleichen Expressionssystems sowie des Einsetzens äquivalenter Mengen an Plasmid-DNA während der Transfektion zu unterschiedlichen hohen Expressionsniveaus führte.

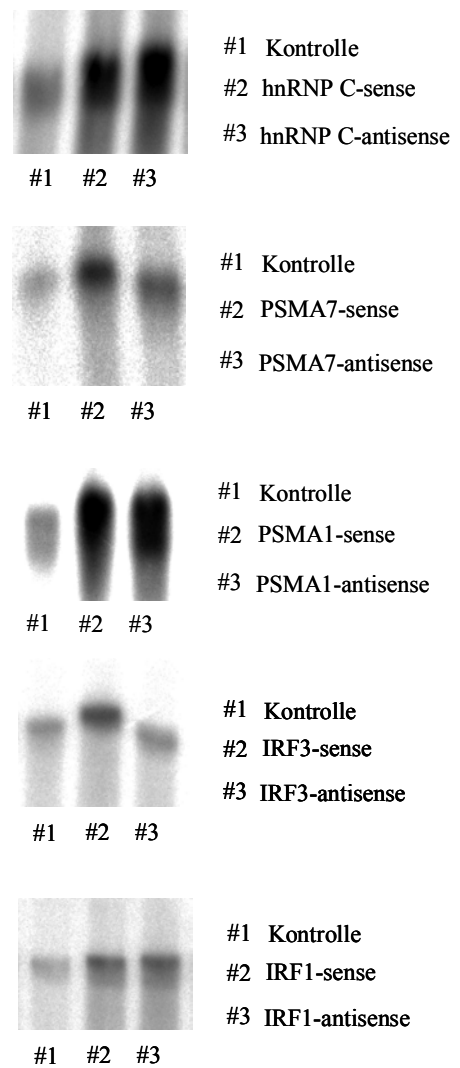


Abb.5.1: mRNA-Genexpression (Northern Blot) klonierter Sense- und Antisense-Konstrukte im Vergleich zur Leervektor-transfizierten Kontrolle

So stellte sich anschließend die Frage, ob die Erhöhung des mRNA-Levels der Gene ebenfalls mit einer Erhöhung des entsprechenden Proteinniveaus korreliert. Es konnte im Western Blot-Verfahren durch spezifische monoklonale Antikörper gegen die zellulären Proteine *Human Antigen R* (HuR), *Proteasome Subunit Alpha 7* (PSMA7) und *Polypyrimidine Tract Binding Protein* (PTB) gezeigt werden, dass eine Überexprimierung durch Sense-Konstrukte auch zu einer Überexprimierung auf Ebene der Proteine führt, während die Transfektion mit Antisense-Konstrukten zu einer spezifischen Verminderung des betreffenden Proteins führt.

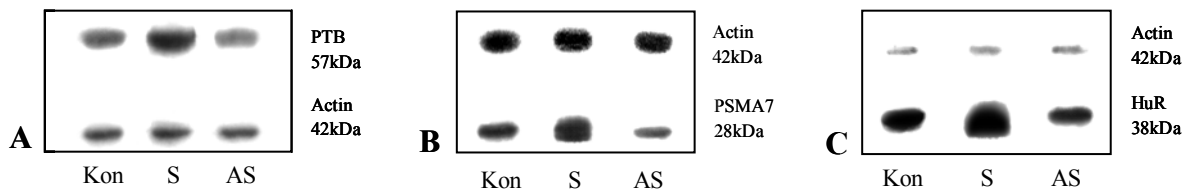


Abb.5.2: Western Blot Analyse. Proteinexpression nach Transfektion von HuH-7 Zellen mit Sense (S) und Antisense (AS)-Konstrukten im Vergleich mit Leervektor-transfizierten Zellen: A.PTB B.PSMA7 C.HuR

5.1.3 Einfluss zellulärer Proteine auf die subgenomische HCV Replikation und Translation

Nachdem gezeigt wurde, dass die Expression der Gene durch Sense-, bzw. Antisense-Konstrukte zu einer Veränderung des spezifischen Proteinniveau führt, sollte dann überprüft werden, inwiefern dadurch auch die subgenomische Replikation und IRES-vermittelte Translation des Hepatitis C Virus beeinflusst wird. Wenn eines der zellulären Proteine eine wesentliche Rolle in dem Replikationszyklus des Hepatitis C Virus zuteil werden sollte, dann müsste auf RNA Ebene oder Protein Ebene eine Beeinträchtigung oder Verstärkung des HCV Niveaus zu detektieren sein.

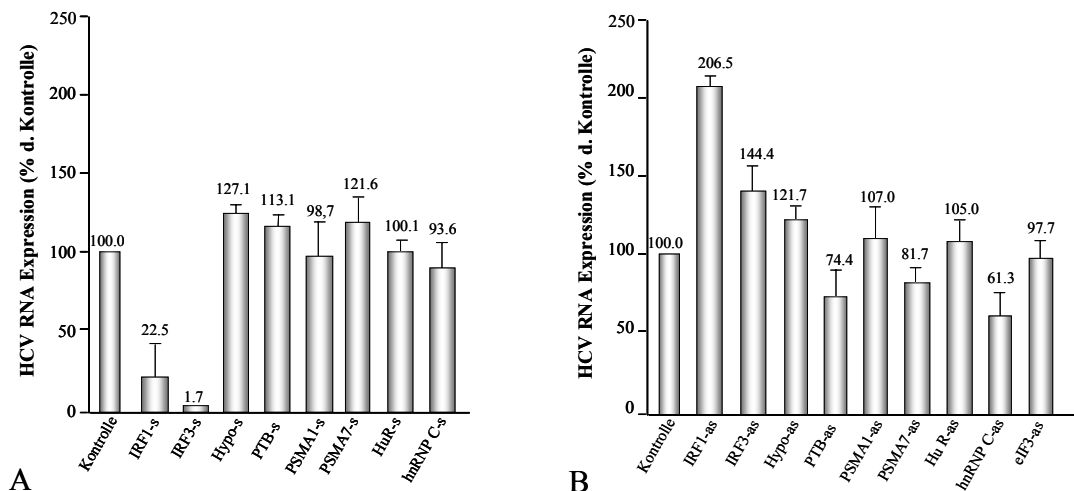


Abb.5.3: HCV RNA Expression in HuH-7 Zellen, die ein subgenomisches HCV Replikon exprimieren, nach transienter Transfektion von Genen in Sense-Orientierung (A) und Antisense-Orientierung (B)

HuH-7 Zellen, die stabil ein monocistronisches subgenomisches HCV Replikon exprimieren, wurden mit Sense- und Antisense-Konstrukten transient transfiziert und nach drei Tagen über einen kotransfizierten CD4-Oberflächenrezeptor nach Magnetisierung durch

Anti-CD4 markierte Mikrobeads von nichttransfizierten Zellen mittels magnetischer Säulen getrennt und im Northern Blot untersucht.

Danach vermögen die *Interferon regulatorischen Faktoren 1* und *3* (*IRF1/IRF3*) die HCV Replikation durch Expression der beiden Gene in Sense-Orientierung effektiv zu unterbinden, wohingegen die Blockierung dieser Faktoren durch Antisense-Plasmide die Replikation des subgenomischen HCV Replikons bis um 100% steigert. Eine moderate Steigerung der HCV Replikation konnte durch die Sense-Expression von Hypo, PTB und PSMA7 gezeigt werden, während die Überexpression der Gene des *humanen Antigens R* (*HuR*), des *heterogenen nukleären Ribonukleoproteins C* (*hnRNP C*) und der *Proteasom Untereinheit alpha 1* (*PSMA1*) keine Veränderung des HCV RNA Niveaus zeigten.

Zu einer offensichtlichen mittelbaren Verminderung der HCV RNA führte die Transfektion der Antisense-Konstrukte von PTB, PSMA7 und hnRNP C in den monocistronischen Replikonzellen, was auf eine Verminderung des Proteinlevels der Gene rückschließen lässt.

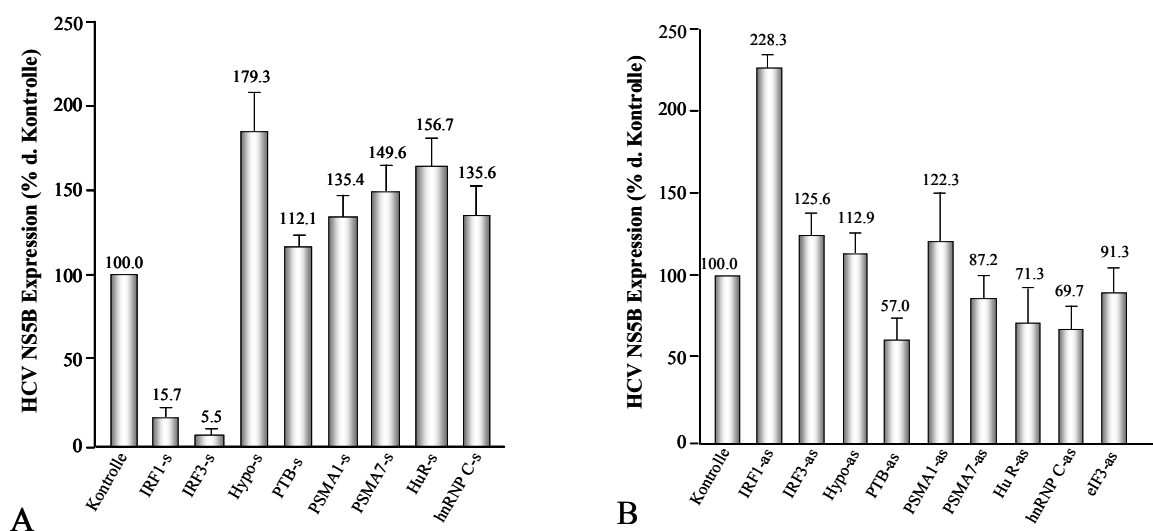


Abb.5.4: Northern Blot. HCV NS5B Expression in HuH-7 Zellen, die ein subgenomisches HCVReplikon exprimieren, nach transienter Transfektion von Genen in Sense-Orientierung (A) und Antisense-Orientierung (B)-Werte mit GAPDH-Signale abgeglichen

Die Expression von *IRF1/3*-Sense-Plasmiden im monocistronischen HCV Replikonsystem führt neben der Reduktion des HCV RNA Levels auch zu einer effizienten Verminderung der HCV NS5B Protein Translation. Dem gegenüber steht eine bis zu 150%ige Steigerung der HCV Translation durch Expression von *IRF1/3*-Antisense-RNA, was auf eine

direkte Steuerung der HCV Replikation und Translation durch die beiden Interferon regulatorischen Faktoren schließen lässt.

Die Ergebnisse der durch Sense-Konstrukte beeinflussten HCV NS5b Expression zeigen, dass die zellulären Proteine Hypo, PSMA1, PSMA7, HuR und hnRNP C in Sense-Orientierung einen größeren Anteil an der Modulation der HCV IRES-vermittelten Translation als der subgenomischen Replikation tragen. Im Gegensatz dazu konnte die Expression von PTB in Sense-Orientierung keine wesentliche Verstärkung der HCV Expression zeigen, jedoch wurde durch PTB in Antisense-Orientierung eine signifikante Reduktion der HCV Translation erzeugt. Auch durch Expression von HuR, hnRNP C und PSMA7 in Antisense-Orientierung wurde eine Reduktion des HCV NS5B Niveaus beobachtet.

5.1.4 Bedeutung zellulärer Proteine für die HCV IRES-abhängige Translation im Luciferase-Reportersystem

Da die bisherigen Untersuchungen gezeigt haben, dass durch Sense- und Antisense-Plasmide die Expression von Genen verändert werden kann, die wiederum Einfluss auf den Replikationszyklus von HCV nehmen, sollte dann überprüft werden, ob diese Beobachtungen speziell auf Interaktionen zwischen der HCV *Internal Ribosomal Entry Site* (IRES) und den zellulären Proteinen zurückzuführen ist.

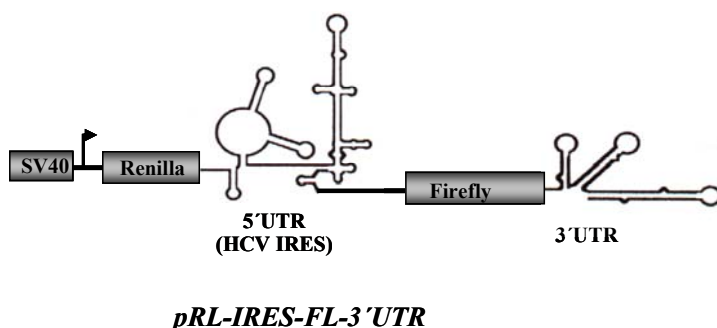


Abb.5.5.: Bicistronisches Reporterkonstrukt. Translation der Renilla Luciferase unter der Kontrolle des SV40-Promoters, die Translation der Firefly Luciferase ist HCV IRES-abhängig

Für diese Untersuchung eignet sich ein bicistronisches Luciferase Reportersystem, in dem die Firefly Luciferase HCV IRES-abhängig translatiert wird und die 3' untranslatierte Region (UTR) des HCV angehängt ist. Die Renilla Luciferase wird davon unabhängig unter der Kontrolle des SV40-Promoters exprimiert und kann zur Normalisierung genutzt werden.

So wurde das bicistronische Luciferase Reporterkonstrukt pRL-IRES-FL-3'UTR zusammen mit den Sense-, bzw. Antisense-Konstrukten in HuH-7 Zellen co-transfiziert und nach 60 Stunden im Luciferase-Test untersucht.

Beobachtungen zeigten, dass die Überexpression der *Interferon regulatorischen Faktoren 1* und *3*, die in den monocistronischen HCV Replikonzellen noch zu erheblichen Veränderungen des HCV Replikationszyklus führten, weder in Sense- noch in Antisense-Orientierung einen ähnlichen Einfluss auf die Expression der Luciferase hatte.

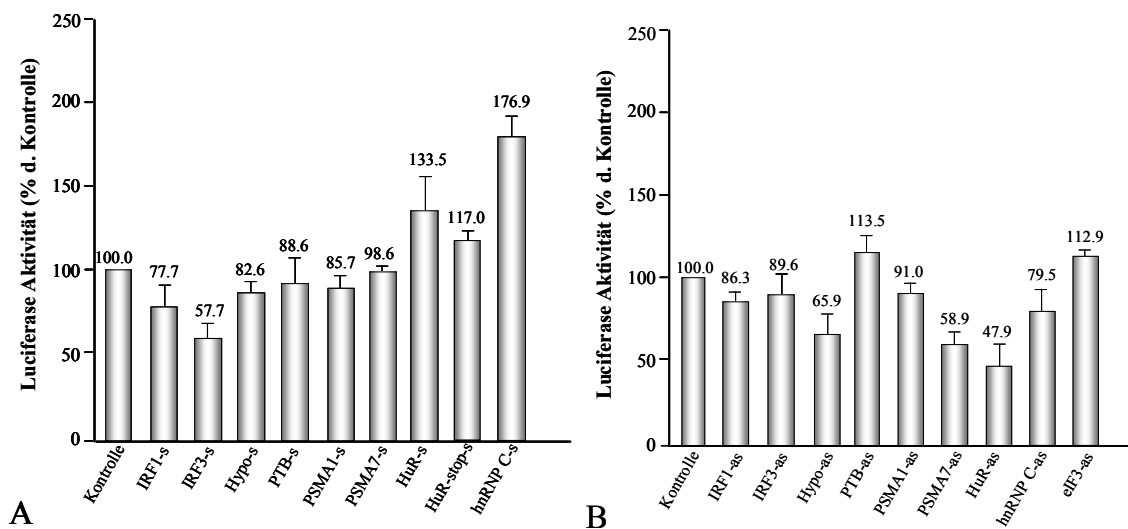


Abb.5.6: Gemessene Luciferase Aktivität nach 60 Stunden. Co-Transfektion des bicistronischen Reporterkonstrukts pRL-IRES-FL-3'UTR (RenillaLuciferase-HCV IRES-FireflyLuciferase-3' nicht translatierte Region) mit A. Sense-Plasmiden und B. Antisense-Plasmiden. Luciferase-Abgleich durch β -Galaktosidase.

Die in den Replikonzellen gezeigten Ergebnisse durch das zelluläre Protein HuR konnten im Luciferase-System bestätigt werden, durch Expression des Antisense-Plasmids wurde eine Reduktion der Genexpression um 50% und durch Überexpression des Sense-Plasmids eine Steigerung der Protein Translation bis zu 30% beobachtet. Das zusätzlich erstellte HuR-Stop-s-Konstrukt, das durch eine Verschiebung des Aminosäureleserahmens im hinteren Bereich ein vorzeitiges Stop-codon beinhaltet, wurde als Kontrolle für HuR zusätzlich transfiziert. So konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Erhöhung der Luciferase Aktivität auf der Expression des vollständigen Proteins *HuR* beruht.

Weiter zeigte sich, dass auch die Expression von PSMA7 und hnRNP C in Antisense-Orientierung im Luciferase Reportersystem zu einer Reduktion des Protein Niveaus von 40%, beziehungsweise 20% führt, was auch schon in den HuH-7 Zellen mit dem stabil exprimierten monocistronischen HCV Replikon gezeigt werden konnte.

5.2 Inhibition der Replikation und Translation des Hepatitis C Virus durch RNA Interferenz

Die Hepatitis C Virus Replikation und Translation sollte zuerst direkt durch Spaltung der HCV RNA inhibiert werden. Deshalb sollten das HCV Plusstrang-RNA Genom sowie der intermediäre Negativstrang direkt durch RNA Interferenz inhibiert werden. RNA Interferenz ist ein in Pflanzen und Würmern entdeckter konservierter Mechanismus, der durch doppelsträngige RNA-Moleküle von einer Länge von 21-23 Basenpaaren ausgelöst wird und zu einer Spaltung der Ziel-mRNA durch den sogenannten *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC) führt [75, 76]. Dieser Prozess kann durch Transfektion von synthetischen und plasmid-exprimierten siRNAs in Zellen ausgelöst werden und der Charakterisierung von Genen dienen.

5.2.1 Auswahl des Expressionssystems und der Zielsequenzen

Der Kostenfaktor bei synthetisch hergestellten *small interfering RNAs* (siRNA) limitiert den Einsatz, so dass für ein breit gestreutes Screening die Nutzung von plasmid-basierten *small hairpin RNAs* (shRNA) vorteilhaft ist.

So wurde der retrovirale Expressionsvektor pSuppressorRetro (pSR) für die Klonierung von shRNAs kommerziell erworben. Die shRNAs werden dabei unter der Kontrolle eines U6-Promoters exprimiert. Für die Auswahl der Zielsequenz sollten Richtlinien zum Design von siRNAs beachtet werden, die für eine wirksame RNA Interferenz vermutlich unabdingbar sind.

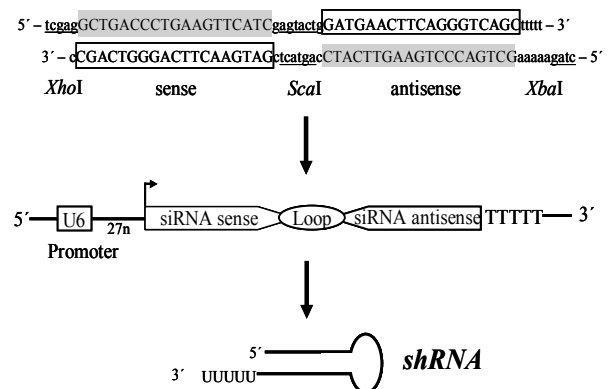


Abb.5.7: Bildung von shRNAs. Annealing erstellter Oligonukleotide mit Sense- und Antisense-Sequenzen und Einfügung in pSR über die das Fragment flankierenden Schnittstellen XhoI/XbaI

So sollten zuerst Sequenzen von 19 bis 23 Basenpaare in der Ziel-mRNA ausgewählt werden, die von jeweils zwei Adenosin und Thymidin-Basen eingeschlossen sind [(AA) $N_{19/23}$ (TT)]. Darüberhinaus sollte unbedingt ein hoher G/C-Gehalt, der zu Akkumulationen führen würde, ebenso vermieden werden wie mehr als drei Guanosin-Basen

in einer Reihe. Der 5' Bereich sollte durch einen höheren G/C-Gehalt stabiler sein als die 3' Region, die A/T-reicher sein sollte.

siRNA	Position in der RNA (nt)	Zielsequenz (5' to 3')	Länge (nt)	G	A	T	C	GC (%)
siEGFP-126	126	GCUGACCCUGAAGUUCAUC	19	4	4	5	6	52
siCD4-665	665	UAGACAUCGUGGUGCUAGC	19	6	4	5	4	52
siHCV-74	74	AGCGUCUAGCCAUGGCGUUAG	21	7	4	5	5	63
siHCV-156	156	CCGGUGAGUACACCGGAAUUG	21	7	5	4	5	63
siHCV-207	207	CCCGCUCAAUGCCUGGAGA	19	5	4	3	7	63
siHCV-3'X(+)	9542	GGUCCGUGAGCCGCUUGAC	19	7	2	4	6	68
siHCV-3'X(-)	10	GCAGAGAGGCCAGUAUCAG	19	7	6	2	4	58

Tab.5.1: Zielsequenzen von siRNAs im HCV 5'UTR und im HCV 3'UTR, sowie Kontroll-siRNAs, die gegen EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und gegen tCD4 gerichtet sind

Innerhalb des Hepatitis C Virus sollten ausschließlich Sequenzen in den 5' und 3' Regionen gewählt werden, da diese über sämtliche HCV Genotypen hochkonserviert sind. So wurden je zwei Oligonukleotide erstellt, die aus einer durch einen Loop verbundenen Sense- und Antisense-Sequenz bestehen, die von der Sequenz zweier Restriktionsschnittstellen flankiert wird. Die kommerziell erworbenen Oligonukleotide wurden dann angelagert und für Untersuchungen in den retroviralen Vektor pSR eingefügt (s.Abb.5.7)

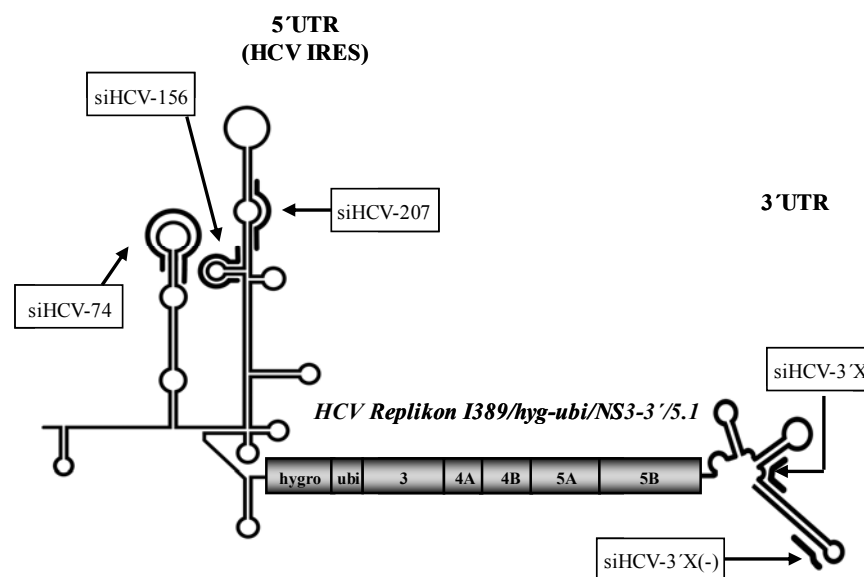
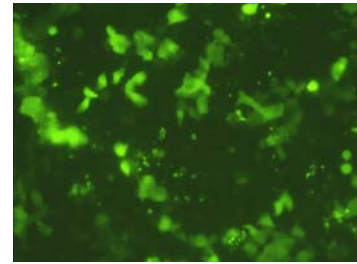


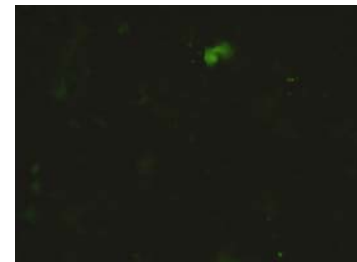
Abb.5.8: Zielsequenzen für shRNAs in den hoch konservierten 5' und 3' Regionen eines subgenomischen HCV Replikons in HuH-7 Zellen.

5.2.2 Nachweis der intrazellulären Aktivität der shRNAs

Nachdem die retroviralen Plasmide erstellt worden waren, sollte dann zuerst überprüft werden, ob die shRNAs im Zytoplasma der Zelle lokalisiert und intrazellulär aktiv sowie wirksam sind. So wurden HuH-7 Zellen mit dem fluoreszierenden Protein EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) transfiziert und zusätzlich entweder mit einem Kontroll-shRNA Plasmid als auch andererseits mit einem gegen EGFP gerichteten Plasmid (siEGFP126) co-transfiziert. Nach 24 Stunden konnte die Wirksamkeit der shRNA im Fluoreszenz-Mikroskop eindeutig nachgewiesen werden, da die siEGFP126-transfizierten HuH-7 Zellen die EGFP-Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle deutlich inhibierten.



A. pHygEGFP + Kontroll-siRNA



B. pHygEGFP + siEGFP-126

Abb.5.9: Fluoreszenz von EGFP in HuH-7 Zellen nach Transfektion mit einer A. Negativ Kontrolle und B. siEGFP126

5.2.3 RNA Interferenz im bicistronischen Luciferase Reportersystem

Die Wirksamkeit der gegen die nichttranslatierten 5' und 3' Regionen des Hepatitis C Virus gerichteten shRNAs sollten zuerst im Luciferase Reportersystem untersucht werden. Die Firefly Luciferase wird in diesem System HCV IRES-abhängig translatiert und müsste durch effiziente shRNAs in ihrer Aktivität inhibiert werden. HuH-7 Zellen wurden mit dem bicistronischen Reporterkonstrukt pRL-IRES-FL-3'UTR und einem HCV gerichteten shRNA-Plasmid co-transfiziert und nach 60 Stunden die Luciferase Aktivität gemessen. Dabei zeigte sich wie erwartet keine Wirksamkeit der in erster Linie gegen den Negativstrang des HCV gerichteten siHCV3'X(-). SiHCV74 und siHCV3'X stellten sich in dem Luciferase System als äußerst wirksam heraus, während siHCV156 eine vergleichsweise geringe Aktivität zeigte.

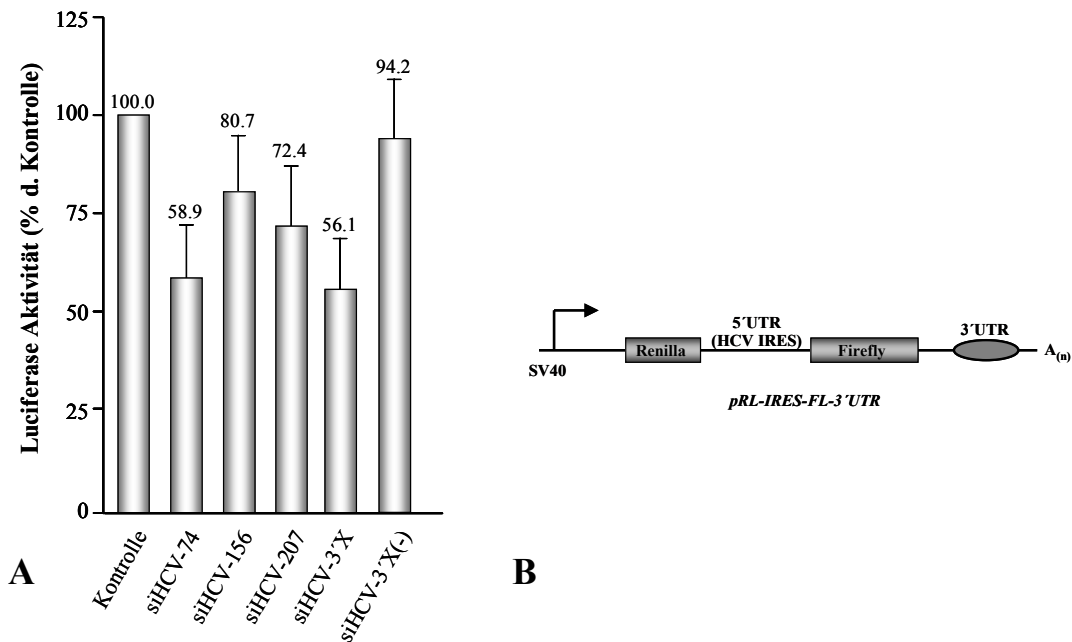


Abb.5.10: A. Luciferase Aktivität der HuH-7 Zellen nach transienter Transfektion mit pRL-IRES-FL-3'UTR und diversen gegen das HCV 5' und 3'UTR gerichteten shRNAs B. Bicistronisches Luciferase Reporterkonstrukt

5.2.4 Inhibition der subgenomischen Replikation und Translation eines monocistronischen HCV Replikons in HuH-7 Zellen durch RNAi

Nach dem Einsatz der shRNAs im Luciferase System sollten dann alle shRNAs in den monocistronischen HCV Replikonzellen näher untersucht werden. HuH-7 Replikonzellen wurden mit plasmid-basierten shRNAs und pMACS4.1 transient co-transfiziert. pMACS4.1 kodiert für einen tCD4 Oberflächenrezeptor, der durch Entfernung der cytoplasmatischen Domäne keine Signal-transduktion mehr auszulösen vermag. Durch Bindung von magnetischen Antikörpern an tCD4 können so transfizierte Zellen in magnetischen Säulen von nichttransfizierten getrennt werden. So wurden ausschließlich transfizierte Zellen im Northern Blot auf Expression der RNA überprüft.

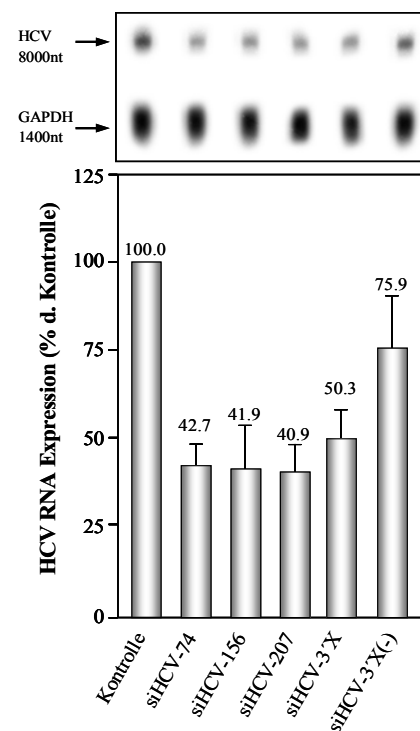


Abb.5.11: HCV RNA Expression nach transienter Transfektion von shRNAs in monocistronische Replikonzellen

Im Vergleich zum Luciferase Test zeigten fast alle shRNAs in den Replikonzellen eine signifikante Reduktion der RNA Expression um 50 - 70 % ($p \leq 0.004$). Auch die im Luciferase Test ineffektive siHCV3'X(-) konnte die HCV RNA Expression um zumindest 25% reduzieren, auch wenn insgesamt gesehen siHCV3'X(-) im Vergleich zu den anderen shRNAs als nicht besonders effizient eingestuft werden muß.

Im Falle der vier sehr effizienten shRNAs (siHCV74; siHCV156, siHCV207; siHCV3'X) sollte sich die Verminderung der HCV RNA Expression auch im Protein Niveau widerspiegeln. So wurde die Protein Expression im Western Blot getestet und durch den spezifischen NS5B-Antikörper nachgewiesen und das Ergebnis mittels der Expression des sogenannten *housekeeping gene* β -actin abgeglichen. Im Falle von siHCV3'X(-) war die für siRNAs eher geringe Reduktion der HCV RNA um etwa 25 % nicht ausreichend, um auch eine Auswirkung auf das Niveau der HCV Protein Expression zu zeigen. Die Ergebnisse der gegen das HCV 5'UTR gerichteten shRNAs sowie der gegen den HCV 3'UTR Plusstrang gerichteten siHCV3'X korrelierten mit den im Northern Blot gewonnenen Resultaten. So zeigten die shRNAs eine Reduktion des HCV NS5B Protein Niveaus um 60 – 80 %.

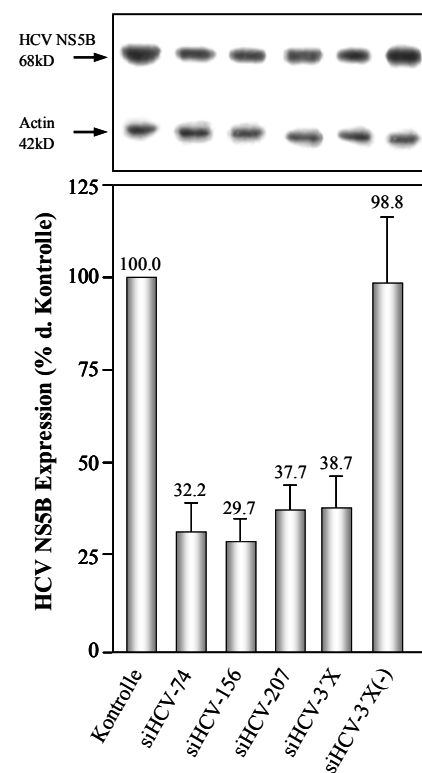


Abb.5.12: HCV NS5B Expression nach transienter Transfektion von shRNAs in monoclonale Replikonzellen

5.3 RNA Interferenz gegen zelluläre HCV Kofaktoren

Nachdem gezeigt wurde, dass small hairpin RNAs, die direkt gegen den Plus- und Minusstrang des HCV Genoms gerichtet sind, den HCV RNA und NS5B Protein Expressions-Level des subgenomischen monocistronischen HCV Replikons reduzieren, sollten jetzt zusätzlich potentielle zelluläre Proteine mittels shRNAs inhibiert werden. Dabei sollten Proteine gewählt werden, denen eine Beteiligung an der HCV Replikation und Translation zugeordnet wird und die zusätzlich in den schon beschriebenen Untersuchungen mit Sense- und Antisense-Konstrukten ebenfalls darauf hindeuteten. Das Ziel dabei ist, durch RNA Interferenz gegen diese zellulären Proteine eine indirekte Beeinflussung der HCV Replikation und Translation zu detektieren.

5.3.1 Auswahl von Zielsequenzen für HCV Kofaktor-gerichtete shRNAs

PTB (*Polypyrimidine tract binding protein*), PSMA7 (*Proteasome alpha-subunit 7*) und HuR (*Human antigen R*), bei denen eine Veränderung ihrer Genexpression durch Sense- und Antisense-RNA indirekt eine Beeinflussung des HCV Replikationszyklus zufolge hatte, wurden als Ziele für HCV Kofaktor-gerichtete RNA Interferenz gewählt. So wurden die Sequenzen der genspezifischen mRNAs nach oben beschriebenen Kriterien nach sinnvollen Sequenzen für effiziente siRNAs durchsucht. Vier siRNA-Sequenzen wurden pro Zielsequenz ausgewählt, als Oligonukleotide bestellt und über XhoI/XbaI-Restriktionsschnittstellen in den retroviralen Vektor pSuppressorRetro eingefügt.

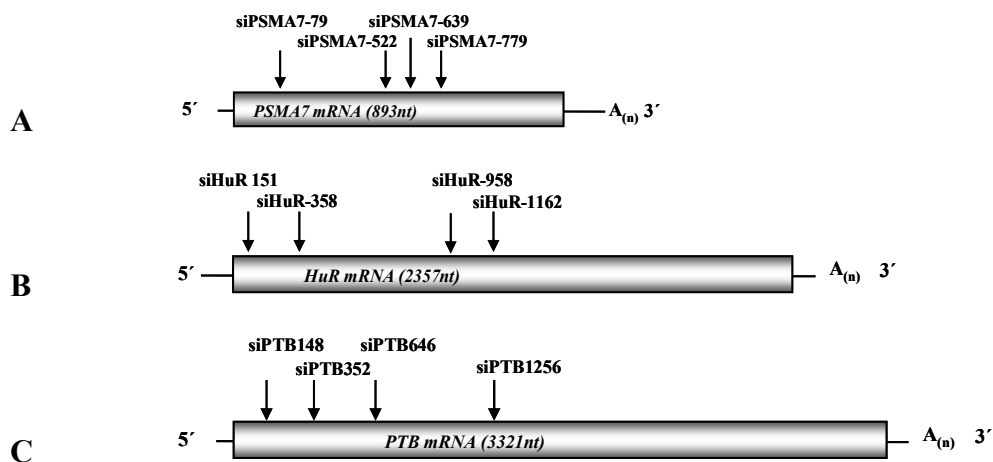


Abb.5.13: Schematische Darstellung der mRNA verschiedener HCV Kofaktoren und Angriffspunkte (Stelle der Spaltung) gewählter siRNAs. A. PSMA7 B. Human Antigen R C. PTB

5.3.2 Genexpression auf RNA-Ebene durch RNAi

Nachdem die Sequenzen für die siRNAs gegen zellulären Proteine ausgewählt und in eukaryotische Expressionsplasmide kloniert worden sind, sollte jetzt zuerst überprüft werden, ob nach transienter Transfektion der plasmid-basierten shRNAs in monocistronische Replikonzellen die genspezifische Expression auf RNA und Protein Ebene inhibiert wird. So wurden die Genexpression 4 Tage nach Transfektion der HuH-7 Zellen im Northern Blot mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert und mit pcBAS nachgewiesen.

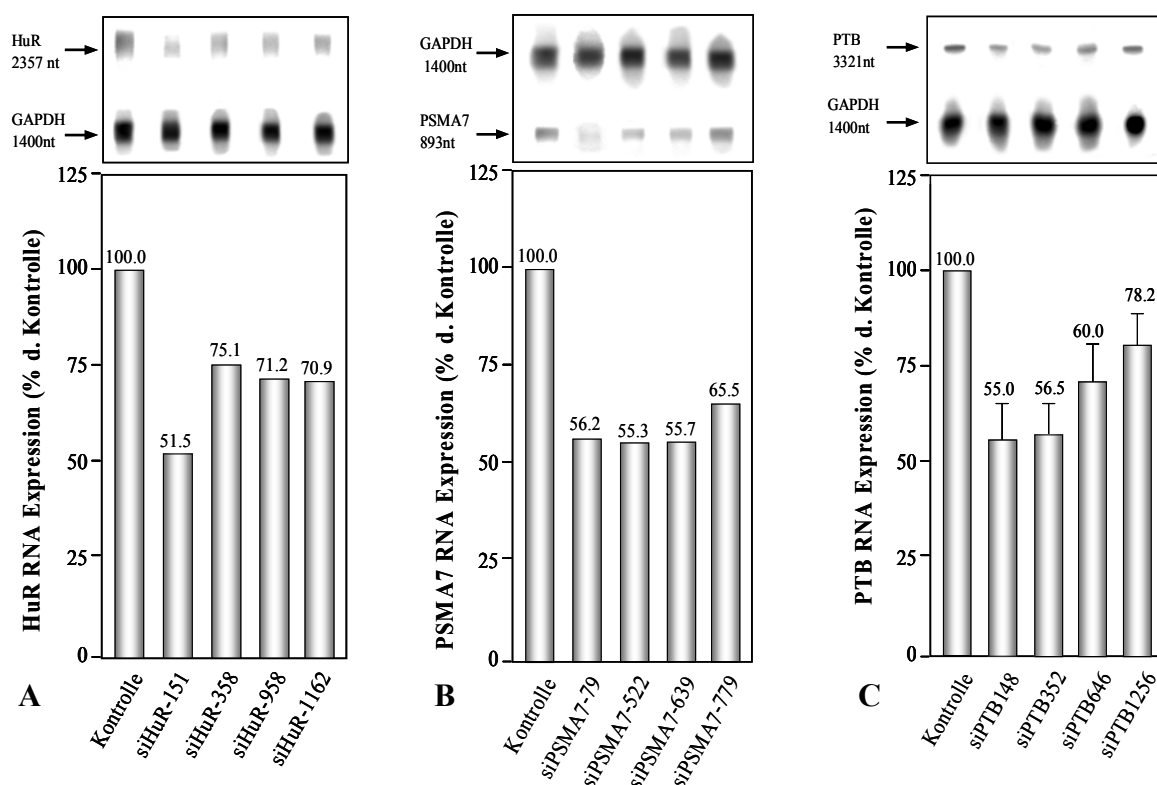


Abb.5.14: HCV RNA Expression 4 Tage nach transienter Transfektion der plasmid-basierten HCV Kofaktor-shRNAs in HuH-7 Zellen, die das monocistronische subgenomische HCV Replikon I389/hyg-ubi/NS3-3'/5.1 stabil exprimieren. A. Human antigen R B. Proteasome alpha subunit 7 C. Polypyrimidine tract binding protein

Alle siRNAs gegen PSMA7 reduzierten den PSMA7 RNA-Level bis zu 50%, während das bei HuR nur bei einer (siHuR-151), bzw bei PTB zwei shRNAs (siPTB148; siPTB352) der Fall war. Die small hairpin RNAs siHuR-358, siHuR-958 und siHuR1162 und siPTB1256 zeigten nur eine genspezifische Verminderung auf RNA Ebene um 25 - 30%.

5.3.3 Inhibition der genspezifischen Translation durch RNAi

Ob die Reduktion der im Northern Blot ermittelten RNA Expression durch RNA Interferenz eine Auswirkung auf die Protein Expression hatte, sollte dann mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die jeweiligen Gene im Western Blot getestet werden.

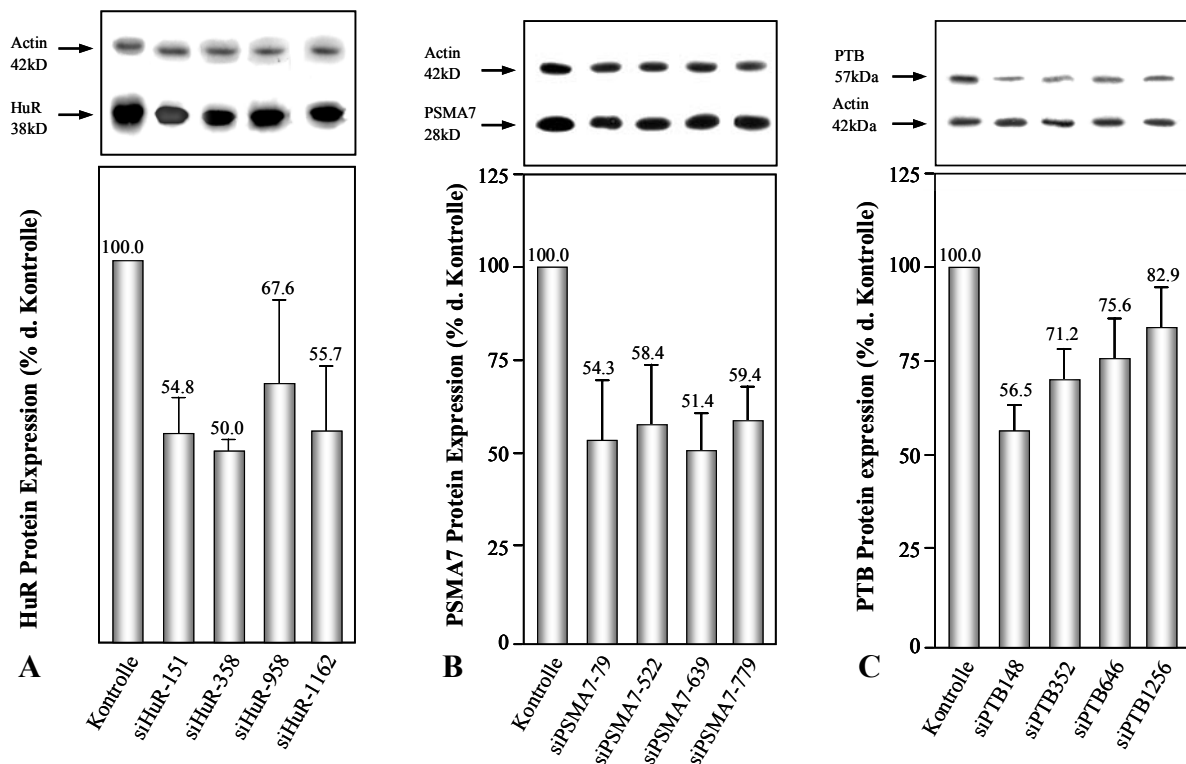


Abb.5.15: HCV NSSB Protein Expression 4 Tage nach transients Transfektion der plasmid-basierten HCV Kofaktor-shRNAs in HuH-7 Zellen, die das monocistronische subgenomische HCV Replikon I389/hyg-ubi/NS3-3'/5.1 stabil exprimieren. A. Human Antigen R B. Proteasome Alpha Subunit 7 C. Polypyrimidine Tract Binding Protein

So zeigte sich, dass die durch shRNA verursachte Reduktion der PSMA7 RNA-Expression um 50% mit der verminderten Protein Expression korrelierte. Die Expression von HuR konnte durch drei shRNAs ebenfalls um etwa 50% inhibiert werden, während siHuR-958 nur einen um 30% verminderten Protein Level zeigte. Bei PTB erwies sich siPTB148 als die effektivste shRNA und zeigte eine Reduktion der Protein Expression um 50%, während siPTB1256 die PTB Expression nur um etwa 20% vermindern konnte.

5.3.4 RNAi gegen HCV Kofaktoren im Luciferase Reportersystem

Da PTB, PSMA7 und HuR an die nicht translatierten 5' und 3' Regionen der HCV RNA binden, sollte jetzt überprüft werden, ob die Inhibition der genspezifischen Expression eine Auswirkung auf die HCV IRES-abhängige Translation der Firefly-Luciferase hat. So wurden die gegen die HCV Kofaktoren gerichteten shRNA-Plasmide zusammen mit dem bicistronischen Reporterkonstrukt pRL-IRES-FL-3'UTR transient in HuH-7 Zellen co-transfiziert und nach 60 Stunden auf Aktivität der Luciferase überprüft.

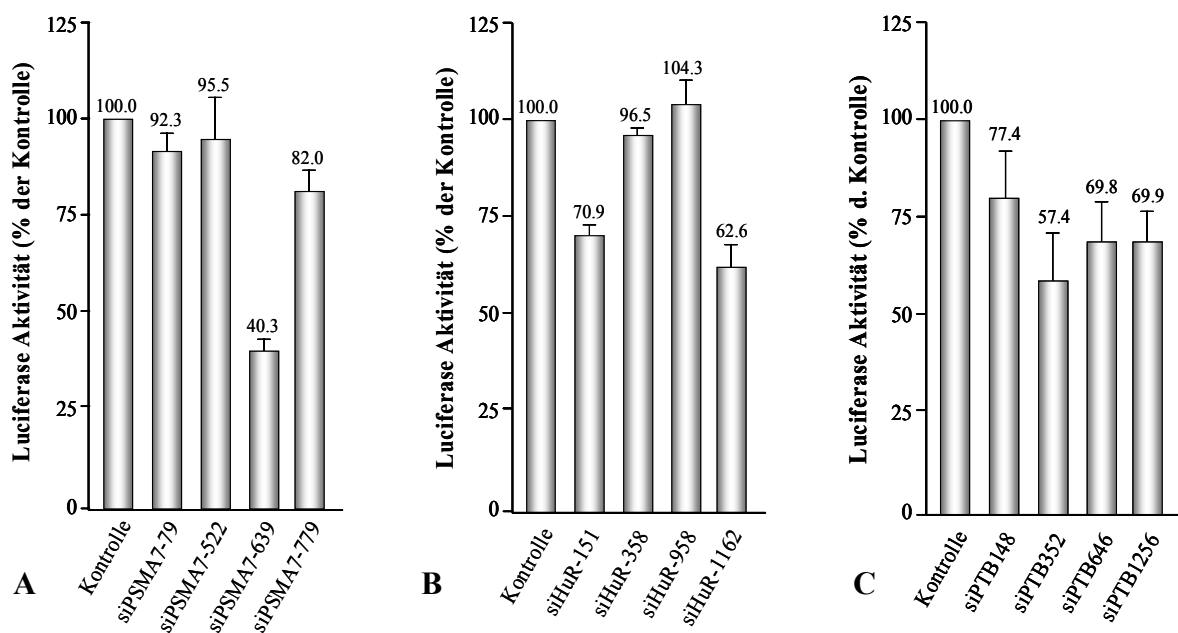


Abb.5.16: Luciferase Aktivität der HCV IRES-abhängigen Firefly-Luciferase nach transienter Transfektion von shRNAs gegen HCV Kofaktoren: A. PSMA7 B. HuR C. PTB

In dem Luciferase Reportersystem zeigte sich, dass in HuH-7 Zellen durch PTB-gerichtete siRNAs die Luciferase Aktivität definitiv inhibiert wird. Dabei konnte eine Reduktion um 20 - 50 % gezeigt werden, wobei siPTB352 hier die größte Wirkung auf die Expression der Luciferase hatte. Im Luciferase Reportersystem wurde bei PSMA7-gerichteten shRNAs mit Ausnahme von siPSMA7-639 keine Auswirkung auf die HCV IRES-vermittelte Aktivität der Luciferase beobachtet. Bei der Inhibition des RNA-bindenden Proteins HuR durch RNA Interferenz wurden zwei shRNAs ohne Auswirkung auf die HCV IRES-vermittelte Luciferase Aktivität beobachtet und zwei shRNAs, die die Luciferase Expression um 30% inhibierten.

5.3.5 Indirekte Wirkung von HCV Kofaktor-gerichteter RNAi auf die subgenomische HCV Replikation und Translation

Nachdem gezeigt wurde, dass die plasmid-basierten small hairpin RNAs die genspezifische Expression von PSMA7, PTB und HuR auf RNA- und Protein-Ebene reduzierten, sollte jetzt überprüft werden, inwiefern dadurch die HCV Replikation und Translation inhibiert, bzw. beeinflusst wird. HuH-7 Zellen, die das monocistronische HCV Replikon stabil exprimieren, wurden mit HCV Kofaktor-gerichteten shRNAs transient transfiziert und nach vier Tagen zum einen im Northern Blot die HCV RNA Expression und zum anderen im Western Blot die HCV NS5B Protein Expression untersucht.

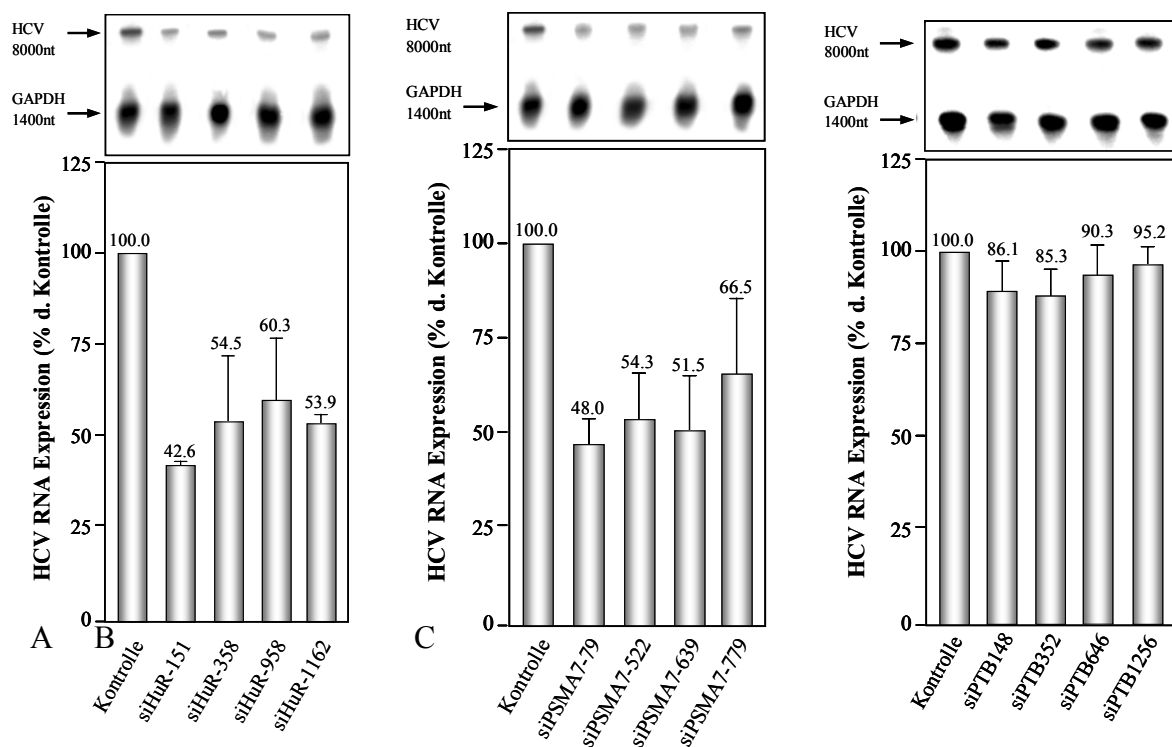


Abb.5.17: HCV RNA Expression nach transienter Transfektion von HCV Kofaktor-gerichteter plasmid-basierter shRNA in monocistronische HCV Replikonzellen. A. HuR B. PSMA7 C. PTB

Die Untersuchungen zeigten, dass die durch RNA Interferenz verminderte PTB Protein Expression nicht zu einer signifikanten Reduktion der HCV RNA Expression führte, was auf eine geringere Bedeutung von PTB für die HCV Replikation schließen lässt. Anders zeigen sich die Beobachtungen in Bezug auf die RNA bindenden Proteine HuR und PSMA7. Monocistronische HCV Replikonzellen, die in ihrer HuR Protein Expression um etwa 50% vermindert wurden, zeigten sich in einer Abnahme des HCV RNA Expressions-Levels um 40-60%, so dass man HuR eine wichtige Rolle für die HCV Replikation zuschreiben kann. Auch

PSMA7-gerichtete RNA Interferenz äusserte sich in einer Abnahme der HCV RNA Expression bis zu 50%.

Danach sollte untersucht werden, inwieweit die Inhibition der zellulären Proteine zu einer Veränderung des HCV Protein Levels führt, also PTB, HuR und PSMA7 eine Rolle bei der Translation des Hepatitis C Virus spielen. Eine wichtige Funktion bei der HCV Translation scheint PTB zu besitzen, da die PTB-gerichtete RNA Interferenz die HCV NS5B Protein Expression um 60% inhibierte, wobei diese Effizienz nur bei siPTB148 und siPTB352 beobachtet werden konnte. Plasmid-basierte RNA Interferenz gegen PSMA7 und HuR führte schließlich ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung der HCV NS5B Protein Expression um 40%. Dabei korrelierte der ermittelte RNA Level einzelner shRNAs im Wesentlichen mit dem Protein Level.

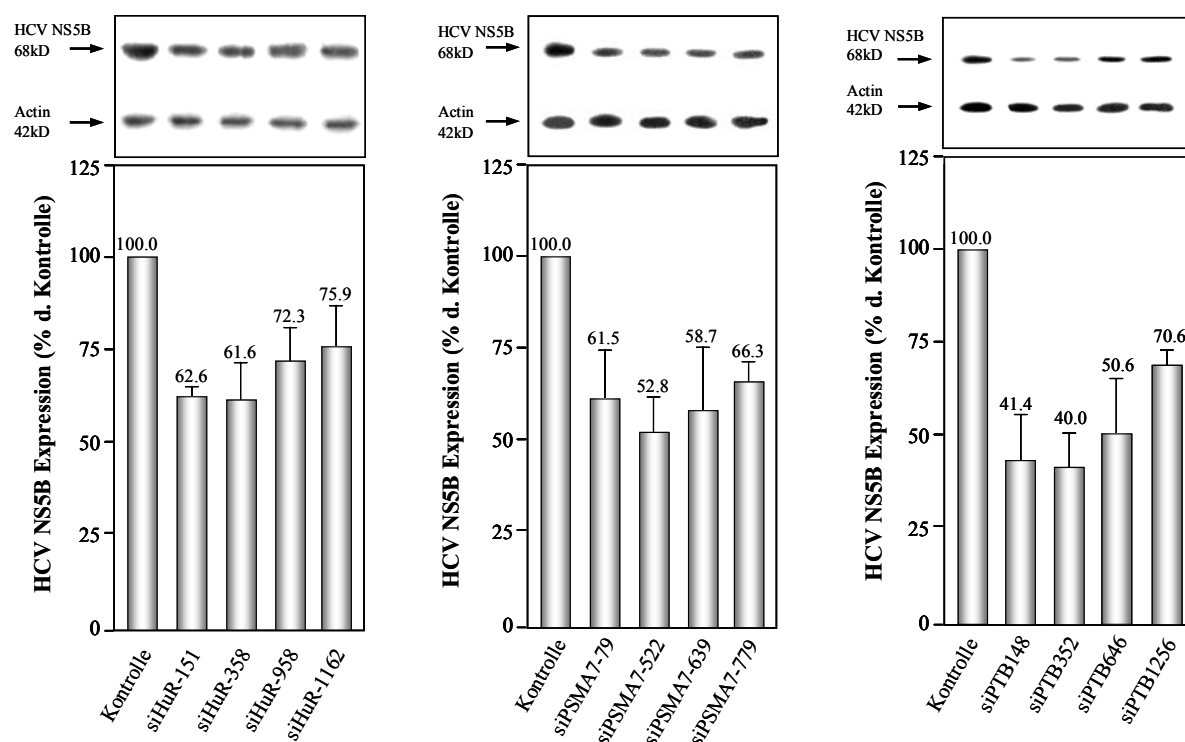


Abb.5.18: HCV NS5B Protein Expression nach transienter Transfektion von HCV Kofaktor-gerichteter plasmid-basierter shRNA in monocistronische HCV Replikonzellen. A. HuR B. PSMA7 C. PTB

5.4 Synergistische und protektive Effekte bei RNA-gerichteten Strategien

Nachdem gezeigt wurde, dass HCV 5' und 3' UTR gerichtete shRNAs und Ribozyme als auch HCV Kofaktor-gerichtete shRNAs die Replikation und Translation des monocistronischen HCV Replikons effektiv inhibieren, sollte untersucht werden, ob Kombinationen von shRNAs oder Kombinationen von shRNAs mit Ribozymen synergistische Wirkung zeigen. In diesem Fall könnte RNA Interferenz gegen HCV Kofaktoren kombiniert mit direkt gegen das HCV Plusstranggenom gerichteter RNAi zu einer noch effektiveren Inhibition der HCV Replikation und Translation führen. Ähnliche Erwartungen gehen von der Kombination der small hairpin RNA-bedingten RNA Interferenz und Ribozym-vermittelten Spaltung aus. Da in diesem Fall nicht zwei verschiedene Ziele, wie HCV Genom und HCV Kofaktoren, anvisiert werden, sondern zwei unterschiedliche Systeme genutzt werden, könnte so auch in diesem Fall eine Steigerung der Inhibition der HCV Replikation und Translation erreicht werden. Weiter sollten Zelllinien etabliert werden, die die shRNAs stabil exprimieren und mit denen nach transients Transfektion des Luciferase Reporters der protektive Wirkungsmechanismus der RNA Interferenz untersucht werden kann.

5.4.1 Synergistische Wirkung von siHCV3'X und siHuR151 im Luciferase Reporter System

Die synergistische Wirkung sollte zuerst im Luciferase Reportersystem getestet werden. So wurde die Kombination aus der gegen das HCV 3' UTR gerichtete siHCV3'X und der gegen den HCV Kofaktor gerichteten siHuR151 gewählt, da sich diese beiden shRNAs allein schon als effektiv erwiesen haben. Dabei wurde die Luciferase Aktivität über mehrere Tage hin untersucht, um auch die Halbwertszeit des zellulären Proteins HuR mit in die Untersuchung einzubeziehen.

Die Untersuchung brachte als wichtigste Erkenntnis, dass die Kombination aus shRNAs gegen unterschiedliche Ziele die Luciferase Aktivität nach fünf Tagen signifikant besser inhibierte, als die einzelnen shRNAs. Dabei konnte die direkt gegen das HCV 3' UTR gerichtete siHCV3'X die Luciferase Aktivität nach kürzerer Zeit (zwei Tage) effektiv inhibieren als die gegen HuR-gerichtete siHuR151, die nur indirekt über HuR auf die HCV 3' UTR wirkt und bei der die Halbwertszeit des Proteins berücksichtigt werden muss. Jedoch

wurde spätestens am Tag 4 die effizientere Inhibition der HCV IRES-vermittelten Luciferase Aktivität durch Kombination von siHCV3'X und siHuR151 detektiert.

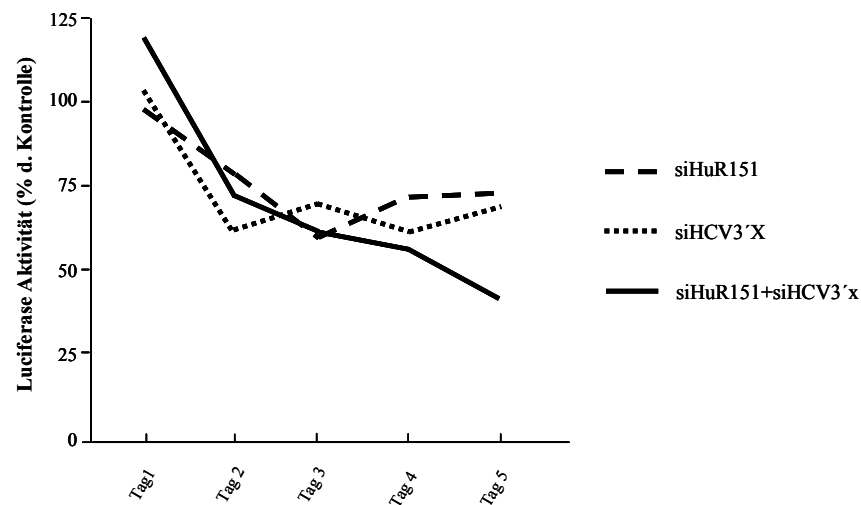
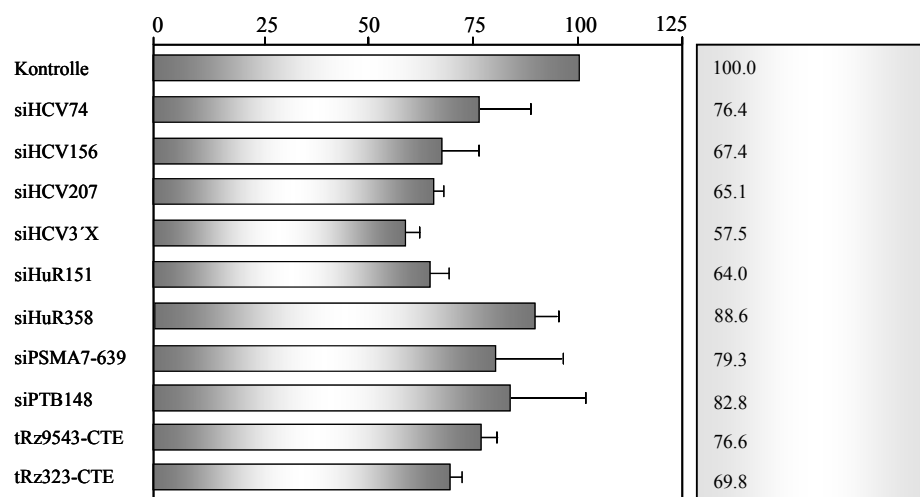


Abb.5.19: Verlauf der zeitbedingten und zielbedingten Inhibition der HCV IRES-vermittelten Luciferase Aktivität durch siHCV3'X, siHuR151 und siHCV3'X/ siHuR151

5.4.2 Identifizierung verschiedener synergistischer Kombinationen im Luciferase Reportersystem

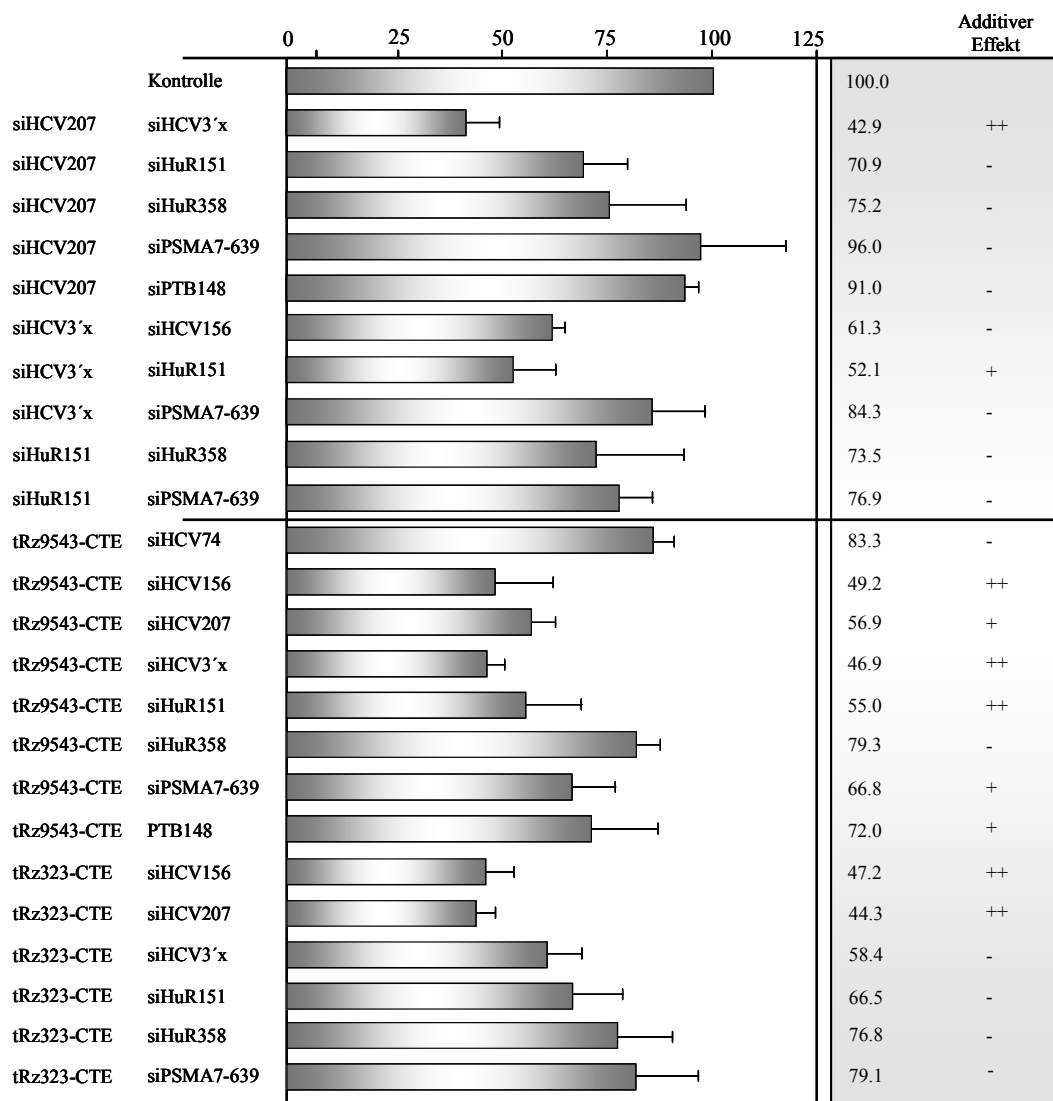
Für siHCV3'X und siHuR151 konnte eine synergistische Wirkung im Luciferase Reportersystem gezeigt werden, so dass jetzt mehrere unterschiedliche Kombinationen von shRNAs als auch von shRNAs mit Ribozymen untersucht werden sollte. Nach transienter Co-Transfektion von shRNAs, Ribozymen und dem Luciferase Reporter pRL-IRES-FL-3'UTR wurde die Aktivität nach drei Tagen gemessen. Alle Transfektionen wurden dabei mit einheitlichen DNA-Mengen transfiziert und die Resultate der verschiedenen transfizierten Kombinationen wurden mit entsprechend angesetzten Kontrollen verglichen. So wurde z.B. für die Auswertung der Kombination siHCV207 und tRz9543-CTE die Kontrolle siEGFP/ tRzHBV-CTE mit transfiziert.

Im Luciferase Reportersystem wurde eine wesentliche Verbesserung des inhibitorischen Effektes auf die HCV IRES-vermittelten Luciferase Aktivität durch Kombination von shRNAs, im Vergleich zu den Einzelwerten, nur bei siHCV207/ siHCV3'X und siHCV3'X/ siHuR151 detektiert. Andere shRNA-Kombinationen konnten in dem Luciferase Reportersystem keine oder nur äußerst geringe synergistische Effekte zeigen, wobei die Halbwertszeit der zellulären Proteine die Detektierung von synergistischen Effekten zumindest bei HCV Kofaktor-gerichteten shRNAs schwierig macht.



A

Luciferase Aktivität (% d. Kontrolle)



B

Luciferase Aktivität (% d. Kontrolle)

Abb.5.20: Luciferase Aktivität nach transienter Transfektion des Luciferase Reporters pRL-IRES-FL-3'UTR in HuH-7-Zellen. A. shRNAs und Ribozyme einzeln B. Kombinationen verschiedener shRNAs und Ribozyme. Verglichen mit Einzelwerten: - kein additiver Effekt + additiver Effekt ++ sehr grosser additiver Effekt

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei shRNA-Kombinationen konnten sehr deutliche synergistische Effekte bei dem Einsatz von HCV gerichteten shRNAs in Kombination mit HCV 5' und 3'UTR gerichteten Haarnadel-Ribozymen gezeigt werden. Das gegen die HCV IRES-gerichtete Ribozym tRz323-CTE zeigte in Kombination mit siHCV207 und siHCV156 eine um 20% effizientere Inhibition der Luciferase Aktivität als jedes einzelne Konstrukt bei sonst identischen Versuchsbedingungen. Das gegen die HCV 3'UTR-gerichtete Ribozym tRz9543-CTE zeigte sich besonders effizient in Kombination mit der ebenfalls gegen die HCV 3'UTR-gerichteten small hairpin RNA siHCV3'X und der gegen HuR-gerichteten siHuR151. Zusammenfassend sind synergistische Effekte in dem Luciferase Reportersystem vor allem durch Kombination von direkt HCV-gerichteten shRNAs mit Ribozymen identifiziert worden.

5.4.3 Synergismus von HCV-gerichteten und HCV Kofaktor-gerichteten shRNAs in monocistronischen HCV Replikonzellen

Synergistische Effekte der shRNA-Kombinationen sollten dann in den monocistronischen subgenomischen HCV Replikonzellen auf RNA und Protein Ebene überprüft werden. Dafür wurden die shRNA-exprimierenden Plasmide einzeln und in Kombinationen transient in HuH-7 Zellen transfiziert und nach fünf Tagen untersucht.

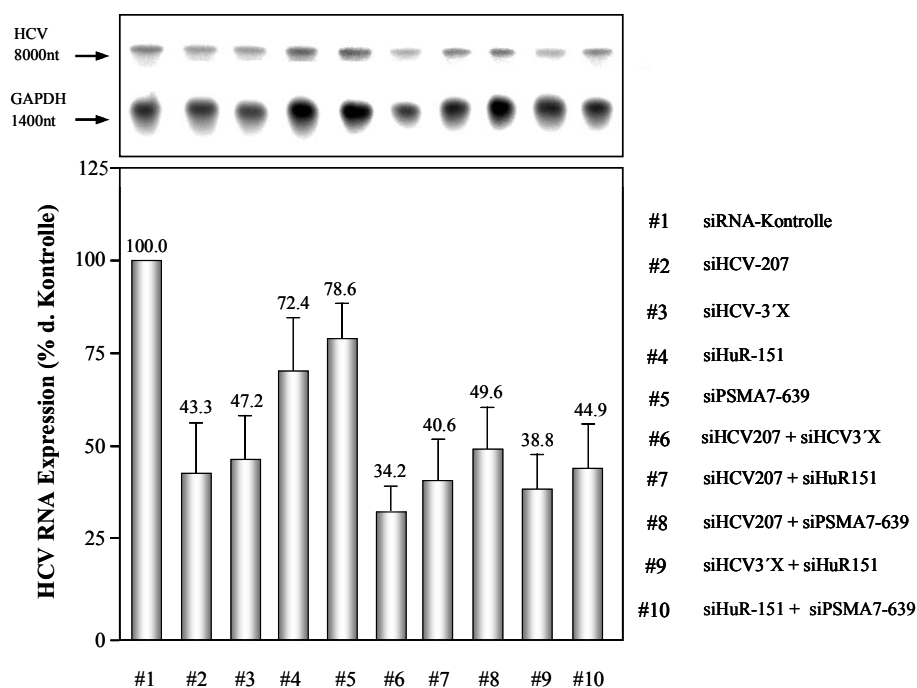


Abb.5.21: Northern Blot. Transfektion von HuH-7 Replikon-Zellen mit shRNAs und shRNA-Kombinationen

Die HCV-gerichteten shRNAs siHCV207 und siHCV3'X zeigten einzeln im Northern Blot eine Inhibition der HCV RNA um 50-60%, HCV Kofaktor-gerichtete shRNAs siHuR151 und siPSMA7-639 eine HCV RNA Verminderung um etwa 20-30%. Diese vier shRNAs mit unterschiedlichen Angriffszielen wurden dann kombiniert und die Kombination bei siHCV207/siHCV3'X und bei siHCV3'X/siHuR151 führte immerhin zu einer weiteren Verminderung der HCV RNA bis zu 10%. Besonders auffallend war die zusätzliche Verminderung der HCV RNA durch die Kombination aus PSMA7 und HuR-gerichteten shRNAs, bei der eine Steigerung des inhibitorischen Effektes um zusätzliche 30% erreicht wurde.

Die Northern Blot-Ergebnisse korrelierten mit denen im Western Blot. Die Translation von HCV NS5B wurde, verglichen mit den Einzelwerten, bei siHCV207/siHCV3'X und bei siHCV3'X/siHuR151 um etwa weitere 10% inhibiert. Auch hier konnte durch die Inhibition zweier HCV Kofaktoren (PSMA7/ HuR) durch RNA Interferenz der inhibitorische Effekt um etwa 30% gesteigert werden.

Die Kombination von siHCV207 mit den Kofaktor-gerichteten siPSMA7-639 und siHuR151 konnte keine, beziehungsweise eine nur unwesentliche Steigerung des inhibitorischen Effektes zeigen.

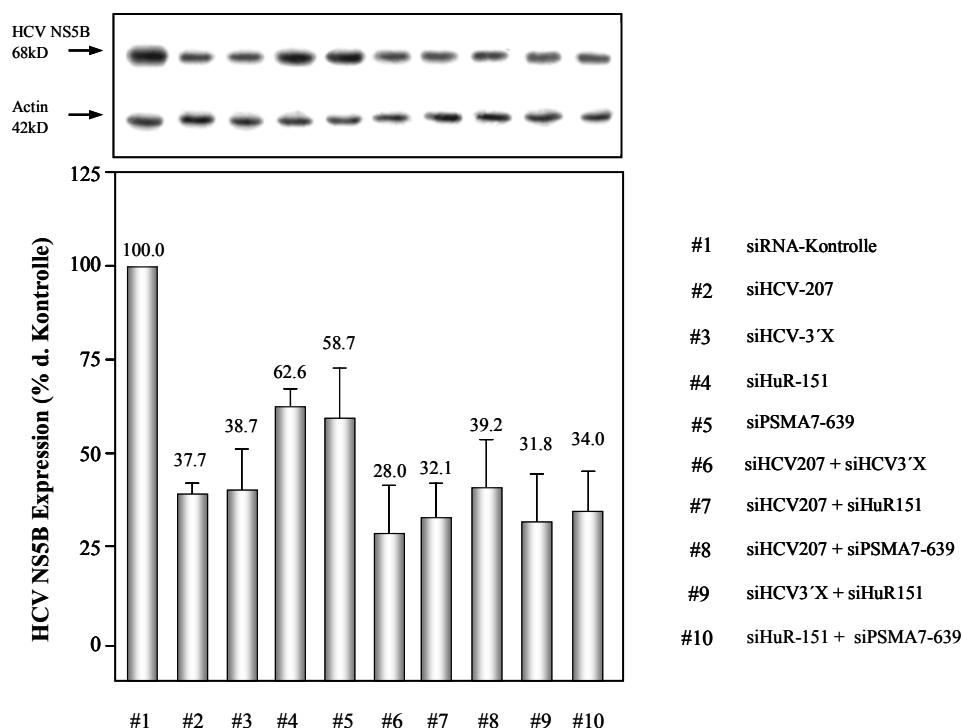


Abb.5.22: HCV NS5B Western Blot nach Transfektion von HuH-7 Replikon-Zellen mit shRNAs und shRNA-Kombinationen

Da auch durch RNA Interferenz gegen das *Polypyrimidine Tract Binding Protein* (PTB) eine signifikante Reduktion der HCV Translation gezeigt werden konnte, sollten auch PTB-gerichtete shRNAs in Kombination mit diversen shRNAs getestet werden. Protein und RNA Expression wurden dann im Western und Northern Blot überprüft. Die HCV RNA Expression bestätigte die vorher gezeigten Ergebnisse, dass PTB-gerichtete shRNAs, außer siPTB352, die HCV Replikation nur geringfügig beeinträchtigen. Der Grad der HCV RNA Inhibition durch die shRNA-Kombinationen entspricht dabei den nicht gegen PTB-gerichteten shRNAs (siPSMA7-639, siHuR151, siHCV3'X) und führte zu einem nur geringfügig verstärkten inhibitorischen Effekt.

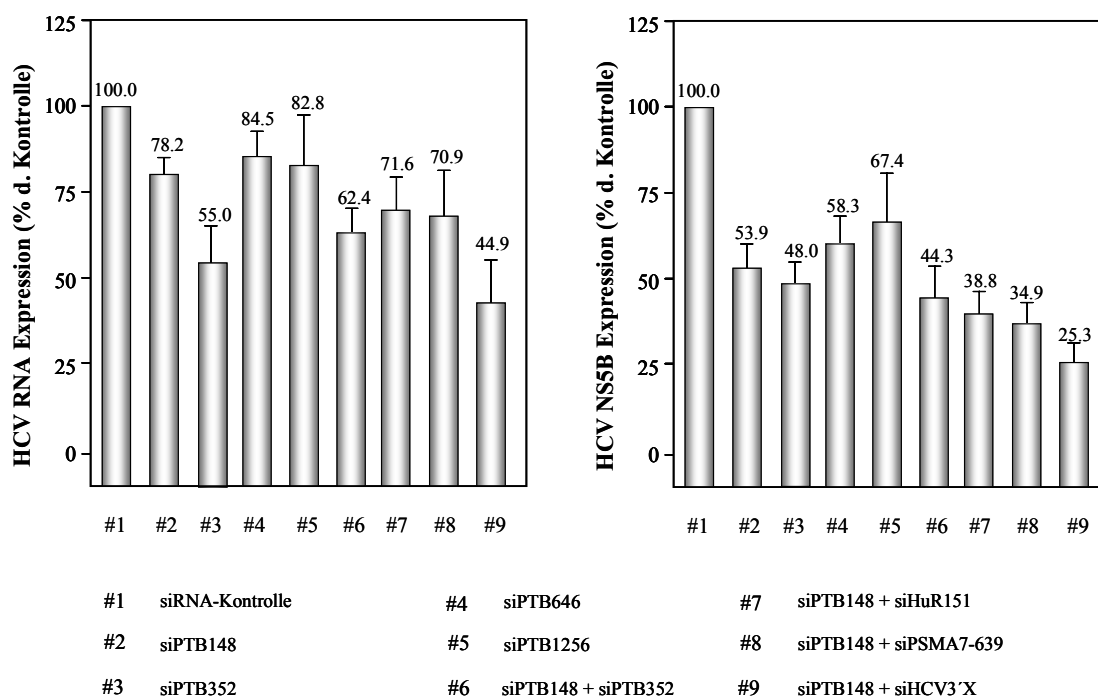


Abb.5.23: HCV NS5B und RNA Expression nach transienter Transfektion von PTB-gerichteter shRNAs und shRNA-Kombinationen in HuH-7 Replikon-Zellen.

Im Gegensatz zur HCV Replikon Replikation wird die subgenomische HCV IRES-vermittelte Translation durch die Blockierung der PTB Genexpression durch small hairpin RNAs sehr stark beeinflusst. Durch Transfektion von anderen HCV Kofaktor gerichteten shRNAs (siHuR151, siPSMA7) mit siPTB148 konnte die Translation von HCV im Vergleich mit den Einzelwerten signifikant verstärkt werden.

5.4.4 Kombination von shRNAs und Ribozymen

Nachdem gezeigt wurde, dass die inhibitorische Wirkung von HCV- und HCV Kofaktor-gerichteten shRNAs durch unterschiedliche shRNA-Kombinationen noch gesteigert werden kann, sollten weitere Möglichkeiten zur effizienten Inhibition der HCV RNA und Protein Expression untersucht werden.

Im Rahmen der Dissertation von D. Jarczyk wurden verschiedene gegen konservierte HCV Regionen gerichtete Haarnadel Ribozyme mit und ohne CTE unter der Kontrolle von U6- und $tRNA^{Val}$ -Promoter in monocistronische subgenomische HCV Replikonzellen transfiziert und auf Ebene der RNA sowie Protein Expression untersucht. Dabei konnten die $tRNA^{Val}$ -getriebenen Ribozyme tRz323-CTE (HCV 5'UTR-gerichtet) und tRz9543-CTE (HCV 3'UTR-gerichtet) die subgenomische HCV Replikation und Translation um 30% vermindern.

Bisher bezog sich die Verstärkung des inhibitorischen Effektes durch Kombination von shRNAs ausschließlich auf die Wahl des Gens sowie der Zielsequenz. Durch die Co-Transfektion von small hairpin RNAs und Haarnadel Ribozymen in monocistronische subgenomische HCV Replikonzellen sollten so auch komplett verschiedene Wirkungsmechanismen in den HCV Replikonzellen kombiniert werden.

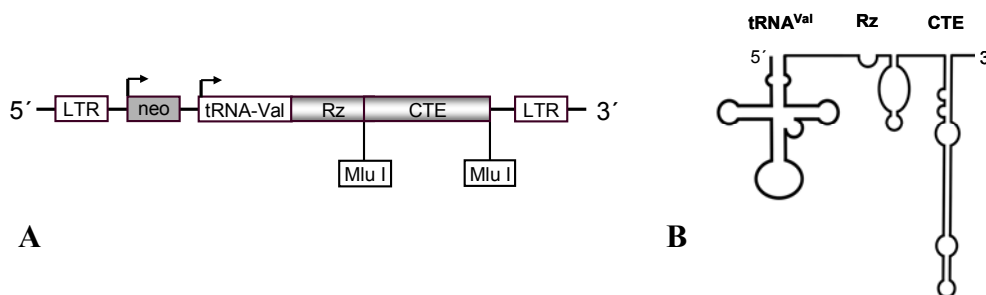


Abb.5.24: Schematische Darstellung. A. der tRNA-Ribozym-CTE-Expressions-cassette im retroviralen Vektor pLHPM B. des $tRNA^{Val}$ Promoter – Haarnadel Ribozym - Constitutive Transport Element -Konstruktes

Die $tRNA^{Val}$ -getriebenen Ribozyme tRz323-CTE und tRz9543-CTE sollten mit den U6-Promoter-getriebenen shRNAs siHCV156, siHCV207, siHCV3'X kombiniert werden. Nach transienter Transfektion der shRNA/Ribozym-Kombinationen in monocistronische subgenomische HCV Replikonzellen wurde die HCV RNA und HCV NS5B Protein Expression im Northern und Western Blot untersucht.

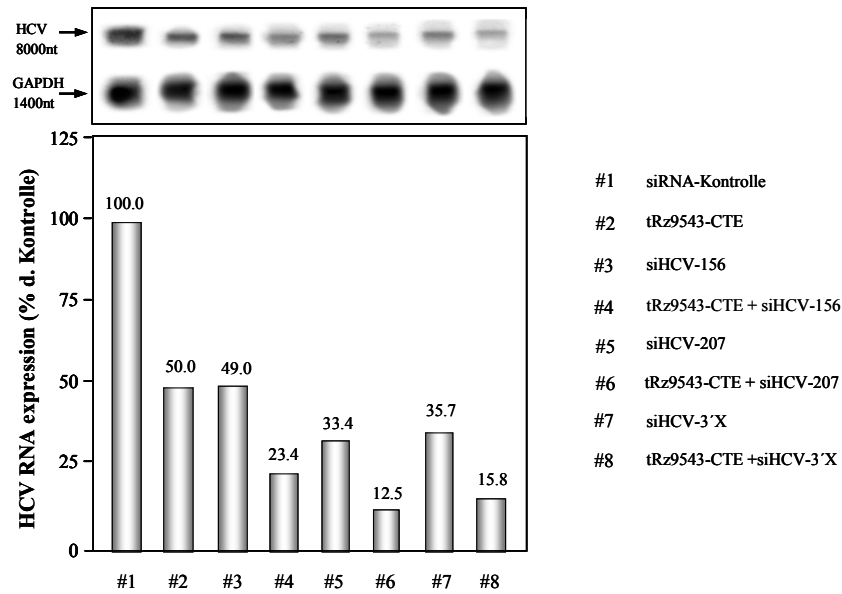


Abb.5.25: Northern Blot. HCV RNA Expression nach transienter Transfektion von Ribozym und shRNA-Kombinationen in HuH-7-Replikon-Zellen.

Eine signifikante Verstärkung des inhibitorischen Effektes ($p \leq 0.004$) konnte durch shRNA/Ribozym-Kombinationen im Vergleich zu den Resultaten einzelner shRNAs und Ribozyme gezeigt werden. Das Zusammenspiel des Ribozyms tRz9543-CTE mit den drei gegen die hoch konservierten nicht translatierten 5' und 3' Regionen gerichteten shRNAs verstärkte den inhibitorischen Effekt auf die HCV RNA und Protein Expression zusätzlich um weitere 25%.

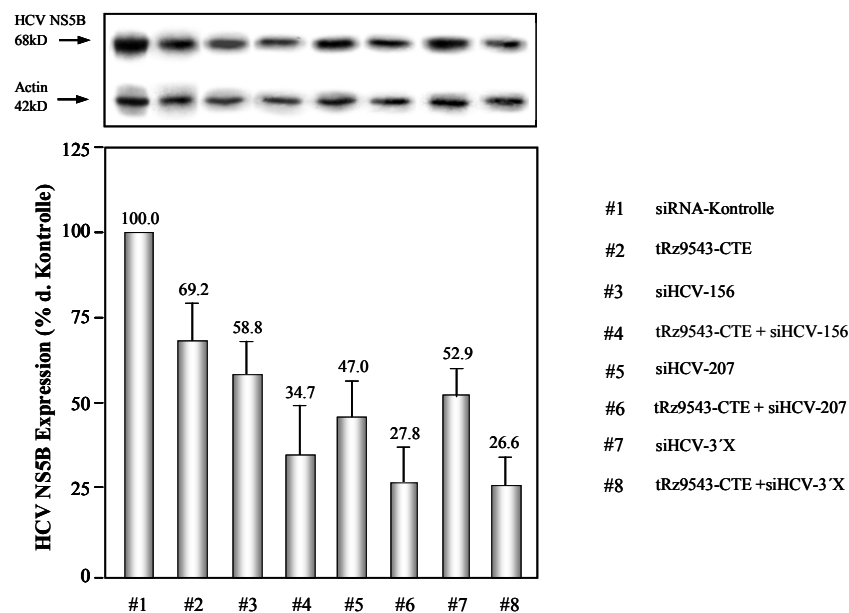


Abb.5.26: Western Blot. HCV NS5B Expression nach transienter Transfektion von Ribozym und shRNA-Kombinationen in HuH-7 Replikon-Zellen.

Um Aufschluss darüber zu erlangen, ob die Kombination von shRNA und Ribozym allein aufgrund des Spaltungsmechanismus oder auch aufgrund der verschiedenen Expressionssysteme (U6-/ tRNA^{Val}-Promoter) zu der effizienten Inhibition der HCV Replikon Replikation und Translation führt, wurden Kombinationen von Ribozymen in beiden Systemen getestet. So wurden die Ribozyme 9543-CTE und 323-CTE **I.** zugleich von U6 Promotoren **II.** zugleich von tRNA^{Val} Promotoren **III.** 9543-CTE vom tRNA^{Val} und 323-CTE vom U6 Promoter gesteuert (Abb.5.27). Als Kontrolle wurden dabei die entsprechend geeigneten HBV-gerichteten Ribozyme transfiziert. Nach transients Transfektion in HuH-7 Replikonzellen zeigte sich im Western Blot eine Inhibition der HCV Protein Expression um etwa 40% bei Ribozym-Kombinationen, die von gleichen Promotoren exprimiert werden. Die Expression der Ribozyme durch tRNA^{Val} als auch U6 Promoter dagegen führte zu einer weiteren Inhibition von ungefähr 20%.

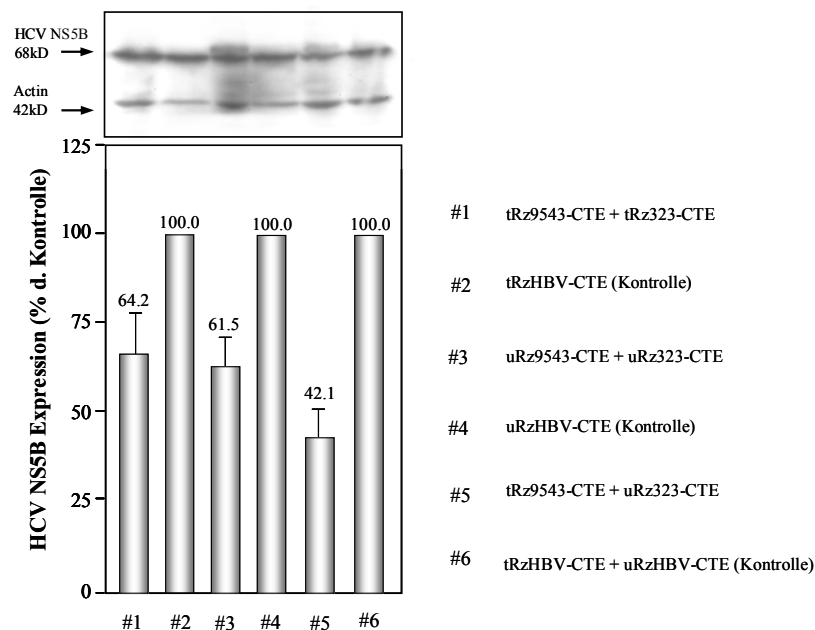


Abb.5.27: Western Blot. HCV NS5B Expression nach transients Transfektion von Ribozym und shRNA-Kombinationen in HuH-7 Replikon-Zellen.

5.4.5 Nachweis der cytoplasmatischen Lokalisation von Ribozymen

Nachdem bei den in die HCV Replikonzellen transfizierten katalytisch aktiven Ribozymen eine inhibitorische Wirkung auf die HCV RNA und HCV NS5B Protein Expression detektiert werden konnte, musste dann ausgeschlossen werden, dass diese Beobachtung möglicherweise nicht auf die sequenzspezifische Spaltung der Ribozyme sondern auf andere Ursachen, wie z.B. Interferon, beruht. Zuerst wurde überprüft, ob die

Ribozyme, sowohl ohne als auch mit Constitutive Transport Element (CTE), intrazellulär im Cytoplasma der Zelle exprimiert werden. HuH-7 Zellen wurden mit Ribozym-exprimierenden Plasmiden transfiziert und nach fünf Tagen für Lokalisationsuntersuchungen geerntet. Die Zellkerne wurden zuerst vom Cytoplasma getrennt, die RNA aufgereinigt, anschließend mit DNase verdaut und mittels einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die Expression der Ribozyme durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primern überprüft.

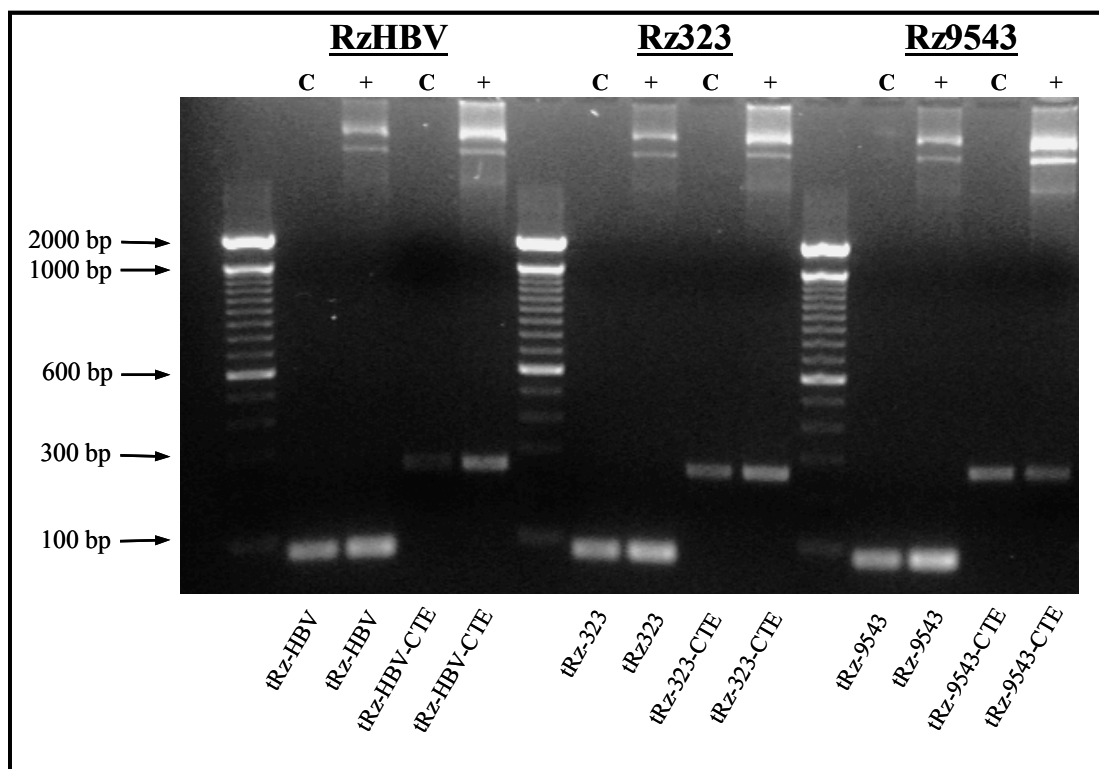


Abb.5.28: Nachweis der cytoplasmatischen Lokalisation der Ribozyme durch PCR von tRzHBV (Kontrolle), tRz323 und tRz9543 jeweils mit und ohne Constitutive Transport Element (CTE). PCR mit spezifischen Oligonukleotiden nach RT-PCR der cytoplasmatischen Fraktion [C] nach Trennung von der Nukleusfraktion und PCR vom Plasmid als Positiv-Kontrolle [+].

Die PCR auf die Ribozyme erbrachte den Nachweis der cytoplasmatischen Expression der Ribozyme ohne (54bp) als auch mit CTE (310bp) (Abb.5.28) für das gegen Hepatitis B Virus-gerichtete Ribozym RzHBV, dem gegen das HCV 5'UTR-gerichtete Ribozym Rz323 sowie dem gegen das HCV 3'UTR-gerichtete Ribozym 9543. Als Positiv-Kontrolle wurde eine PCR mit den spezifischen Primern und dem Ribozym-Plasmid als Matrize durchgeführt. Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich bei der von den Zellkernen isolierten Fraktion tatsächlich um die cytoplasmatische Fraktion handelt und zusätzlich keine Verunreinigungen mit Zellkernen vorhanden sind, wurden beide Fraktionen mit einer PCR auf Expression der

U6-small nuclear RNA (snRNA) (120bp) überprüft. Die U6-snRNA ist ein Bestandteil einer 40S multi-komponenten Struktur, des spliceosomal small nuclear Ribonucleoprotein Partikels, und ist als Spleissapparat ausschließlich im Nukleus vorhanden und kann so als Kontrolle für Kern- und Cytosolfractionen dienen. Die PCR erbrachte den Nachweis der U6-snRNA in den Zellkernen, wohingegen im Cytoplasma keine U6-snRNA detektiert werden konnte (Abb5.29).

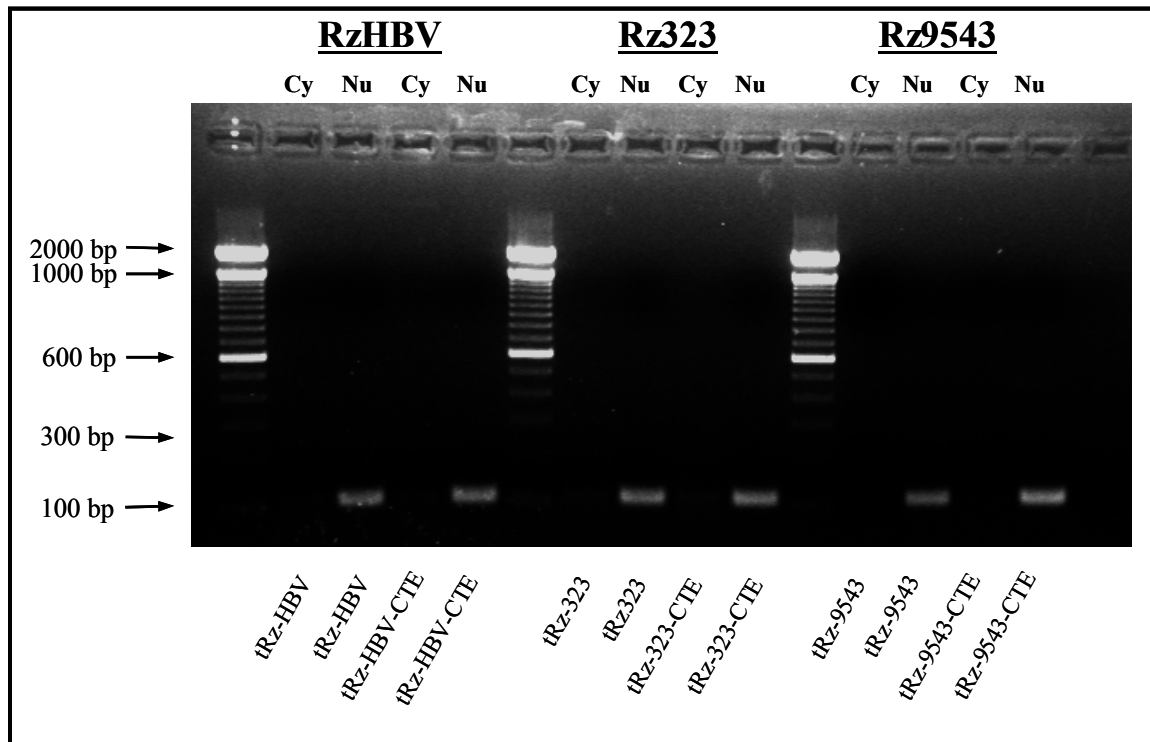


Abb.5.29 Spezifische PCR auf die ausschließlich nukleär vorhandene U6 snRNA (120bp). Ribozym-transfizierte HuH7-Zellen wurden nach Ernte und Lyse der Zellen sowie anschließender Cytoplasma- und Nukleus-Fraktionierung auf Expression der U6 snRNA überprüft. Cy = Cytoplasma N = Nukleus

5.4.6 Protektive Wirkung stabil transfizierter shRNAs in HuH-7 Zellen

Die Frage, ob die stabile Expression von plasmid-basierten shRNAs eine protektive Wirkung gegen die Infektion mit HCV RNA hat, wurde in HuH-7 Zellen untersucht. Dafür wurden HuH-7 Zellen mit verschiedenen shRNAs transfiziert und mittels G418 selektioniert. Stabil selektionierte Zellen wurden dann mit dem Luciferase Reporter-Konstrukt pRL5'FL3'UTR transfiziert und die Aktivität der IRES-vermittelten Luciferase überprüft. Die Beobachtungen zeigten, dass die HCV gerichteten als auch HCV Kofaktor-gerichteten shRNAs keinen im Vergleich zur transienten Co-Transfektion von shRNA und pRL5'FL3'UTR protektiven Wirkungsmechanismus besitzen. Der inhibitorische Effekt auf

die Translation der HCV IRES-vermittelten Luciferase durch shRNAs in transienten Versuchen konnte durch stabil transfizierte shRNAs nicht verstärkt werden..

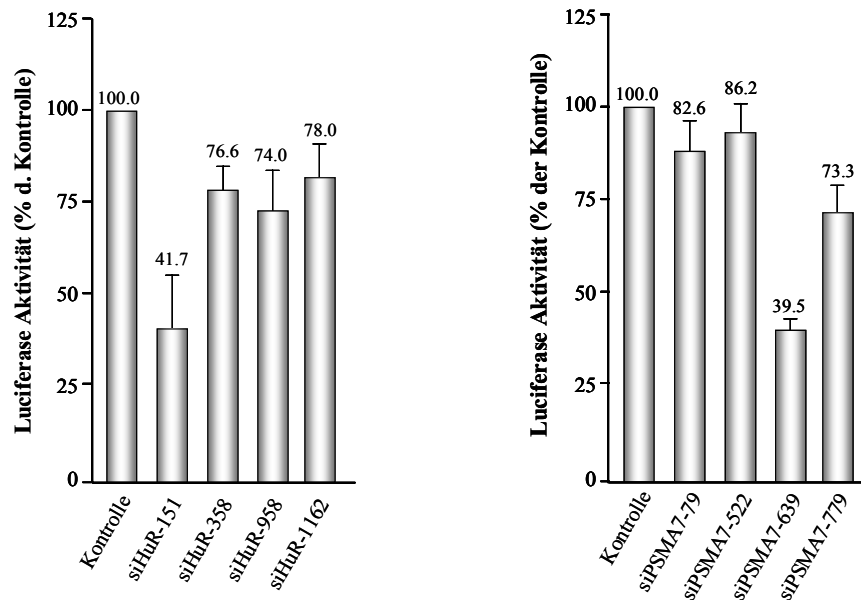


Abb.5.30: Luciferase Aktivität nach transienter Transfektion des Luciferase Reporters pRL-IRES-FL-3'UTR in stabil transfizierte HuH-7 Zellen. von A. HuR-gerichteten shRNAs b. PSMA7-gerichteten shRNAs

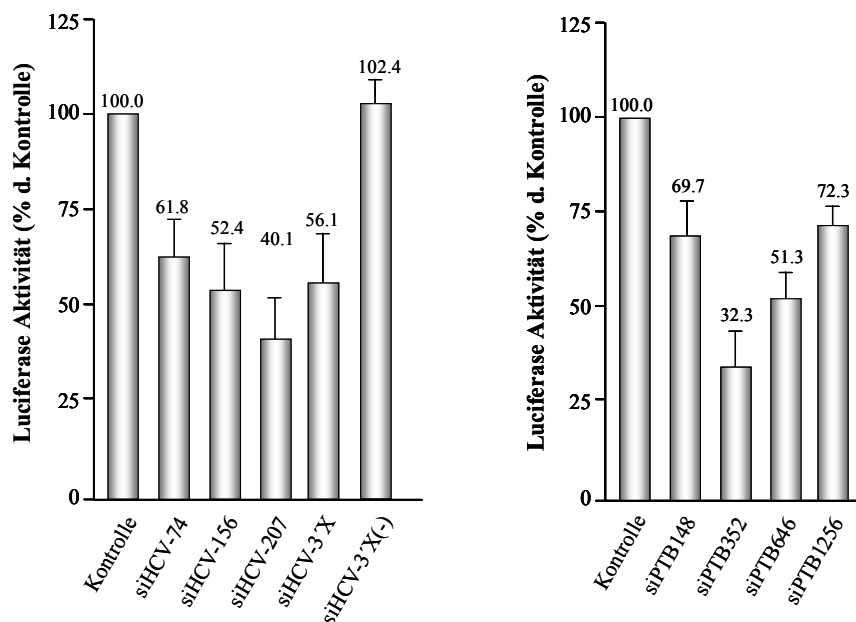


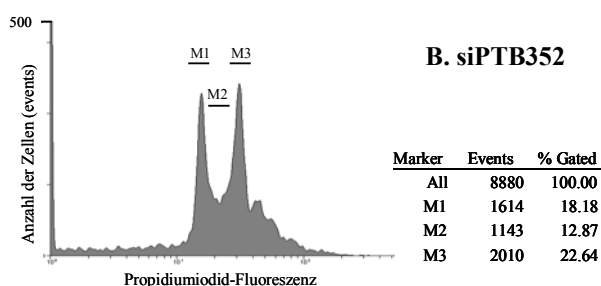
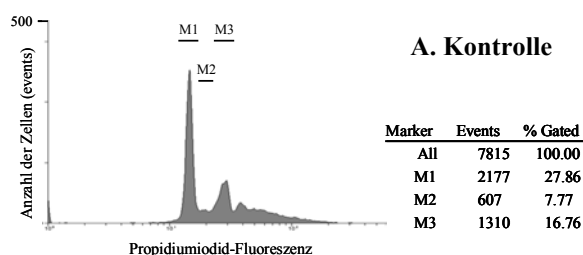
Abb.5.31: Luciferase Aktivität nach transienter Transfektion des Luciferase Reporters pRL-IRES-FL-3'UTR in stabil transfizierte HuH-7 Zellen. von A. HCV-gerichteten shRNAs b. PTB-gerichteten shRNAs

5.5 Untersuchungen von Veränderungen biologischer Eigenschaften durch antivirale RNA gerichtete Moleküle

Die in Northern und Western Blot Untersuchungen gezeigte Inhibition der genspezifischen Expression durch HCV Kofaktor-gerichtete shRNAs führte zu einer Verminderung des HCV NS5B Protein und HCV RNA Levels in monocistronischen subgenomischen HCV Replikonzellen. Da die Beeinflussung zellulärer Proteine durch small interfering RNAs unter Umständen zu erheblichen Auswirkungen auf die biologischen Eigenschaften der Hepatocytzelllinie HuH-7 führen könnte, musste nachgewiesen werden, dass nicht die Störung des Zellstoffwechsels sondern ausschließlich die spezifische shRNA und Ribozym Aktivität zu der Inhibition des HCV Replikon Replikationszyklus geführt hat.

5.5.1 Proliferation

Die Inhibition von zellulären regulativen Proteinen, wie PSMA7, HuR und PTB durch RNA Interferenz kann zur Störung des Zellstoffwechsels in den transfizierten HuH-7 Zellen führen. Solch eine Störung könnte in dem Fall ursächlich für die im Northern Blot gezeigte HCV RNA Inhibition und im Western Blot gezeigte NS5B Protein Expression sein. Um eine Beeinträchtigung der Proliferation auszuschließen, musste der Zellzyklus der mit shRNA transfizierten Zellen mittels Propidiumiodid-Färbung im FACS überprüft werden.



So wurden HuH-7 Zellen zum einen mit den Plasmiden transient transfiziert, die shRNAs gegen HCV Kofaktoren exprimieren und zum anderen mit Plasmiden, die gegen die nicht translatierten 5' und 3' Regionen gerichtet sind. Als Kontrolle wurde ein gegen EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) gerichtetes shRNA-exprimierendes Plasmid eingesetzt. Es zeigte sich, dass sich bei einer gegen PTB gerichteten shRNA (siPTB352) der Zellzyklus verändert wird. Eine große Anzahl der Zellen ist apoptotisch und das Verhältnis zwischen G1-, S- und

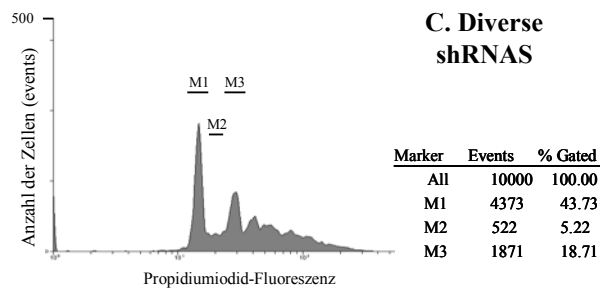


Abb.5.30: Überprüfung des Zellzyklus nach Transfektion von HuH-7 Zellen mit A. shRNA-Kontrolle siEGFP B. siPTB352 und C. diversen shRNAs, Ribozymen. FACS-Messung nach Propidiumiodid-Färbung. M1:G1-Phase M2:Synthese Phase M3:G2/Mitose-Phase

G2/M-Phase hat sich offensichtlich zugunsten der G2/M-Phase verschoben, was auf einen G2/M-Phasen-Arrest schließen lässt. Im Gegensatz dazu zeigte keine der anderen shRNAs, weder HCV- noch Kofaktor-gerichtete shRNAs, eine Veränderung der zelltypischen Proliferation.

5.5.2 Induktion von Interferon

Interferon sind Cytokine, die von Zellen, Fibroblasten und T-Lymphozyten nach einer Infektion mit Viren und Bakterien gebildet werden und immunmodulatorische, antivirale und antiproliferative Wirkung haben. Ebenso wird die Bildung von Interferonen durch doppelsträngige RNA (≥ 30 bp) ausgelöst, wodurch eine generelle Degradierung aller mRNAs in der Zelle ausgelöst wird. Obwohl dieser Mechanismus durch die 19-23 bp-großen siRNAs theoretisch nicht ausgelöst werden sollte, wurde dieser Effekt schon bei einigen plasmid-basierten shRNAs nachgewiesen. Für die Aussagekraft der gezeigten Ergebnisse musste deshalb der Interferonstatus der Zelle nach der Transfektion der HuH-7 Replikon-Zellen mit shRNAs, Ribozymen und Antisense-Konstrukten geprüft werden.

Im Falle der Induzierung von Interferon kommt es zur Bindung der Cytokine Interferon α und β an ihre Rezeptoren IFNAR1 und IFNAR2, welche dimerisieren und die Aktivierung der Tyrosinkinasen JAK1 (*Janus-Kinase1*) und Tyk2 (*Tyrosin-Kinase2*) durch Tyrosin-Phosphorylierung auslösen. Die aktivierten Kinasen JAK1 und Tyk2 phosphorylieren Stat1 und Stat2 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), was zu Stat1/2-Heterodimeren führt, die mit p48 als ISGF3-Transkriptionskomplex (*Interferon Stimulating Gene Factor*) in den Zellkern transportiert werden und dort zur Genaktivierung an die spezifischen ISRE-Sequenzen (*Interferon Stimulated Response Element*) binden und die weitere Interferon α/β -Ausschüttung induzieren.

Der Jak/Stat-Signaltransduktionsweg kann so als Nachweis für die Induzierung von Interferon genutzt werden. So wurden shRNA- und Ribozym-transfizierte HuH-7 Zellen nach Extraktion nukleärer Proteine im Western Blot auf Expression des Stat1-Transkriptionsfaktors überprüft. Als Positiv-Kontrolle wurden nukleäre Extrakte von Interferon-behandelten HuH-7 Zellen eingesetzt.

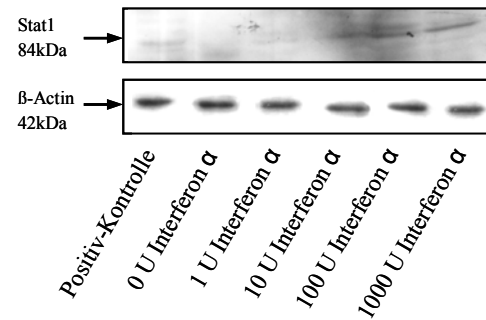


Abb.5.31: Stat1-Western Blot von Interferon-behandelten HuH-7 Zellen mit 0, 1, 10, 100 und 1000 Units Interferon

Im Western Blot der Interferon-behandelten HuH-7 Zellen konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Stat 1 bei Interferonzugabe aktiviert und in den Nukleus transportiert wird und der dortige Expressionsstatus mit der eingesetzten Menge an Interferon (0, 1, 10, 100, 1000 Einheiten Interferon) korreliert.

Der Stat1-Expressions-Level im Nukleus wurde dann bei sämtlichen shRNAs und Ribozymen nach Transfektion in HuH-7 Zellen überprüft. Eine Stat1-Expression konnte ausschließlich bei der Interferon-behandelten Positiv-Kontrolle gezeigt werden, während die durch den U6 Promoter des pSuppressorRetro exprimierten shRNAs keinen aktivierten Stat1-Level zeigten. Auch konnte keine Stat1 Expression bei tRNA^{Val}-exprimierten Ribozymen und bei Antisense-RNA nachgewiesen werden.

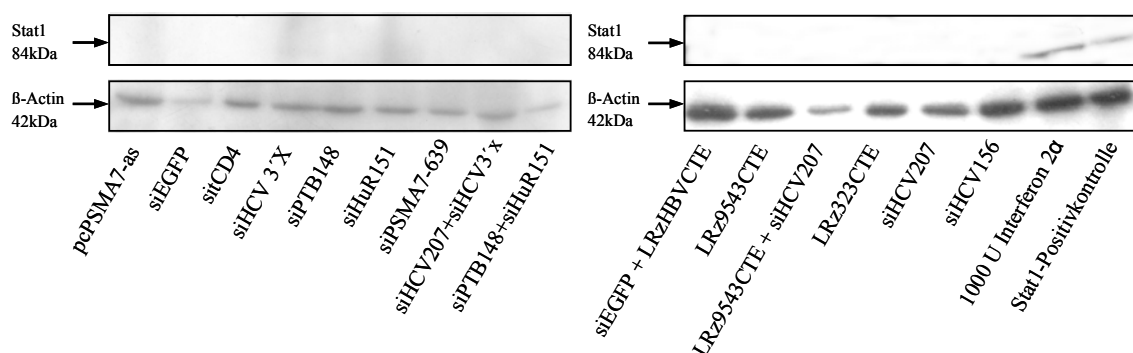


Abb.5.32: Überprüfung der Interferoninduktion in HuH-7 Zellen nach Transfektion mit small hairpin RNAs, Ribozymen und Antisense-Konstrukten. Stat1-Nachweis im Western Blot von nukleären Extrakten.

5.6 Generierung eines HCV IRES-tCD4-Expressionssystems

Zur Identifizierung neuer effizienter HCV IRES-gerichteter small interfering RNAs und Ribozyme eignet sich ein Reportersystem, in dem ein CD4-Oberflächenrezeptor unter der Kontrolle der HCV IRES (5'UTR) translatiert und auf der Zelloberfläche exprimiert wird. RNA Interferenz oder Ribozym-vermittelte Spaltung im HCV 5'UTR würde die Translation und damit die Expression des CD4-Rezeptors auf der Zelloberfläche unterbinden. CD4-positive Zellen können dann durch magnetische Zellselektion über Säulen von CD4-negativen Zellen getrennt werden. So sollte ein stabil transfiziertes Reportersystem mit einem gekürzten CD4-Oberflächenrezeptor etabliert werden, in dem die hoch konservierten untranslatierten 5' und 3' Regionen des Hepatitis C Virus für die Expression des CD4 verantwortlich sind. Aus einer transfizierten siRNA- oder Ribozym-Bibliothek könnten dann wirkungsvolle siRNAs und Haarnadel Ribozyme gegen die untranslatierten Regionen oder gegen HCV Kofaktoren durch Inhibition der IRES-vermittelten Translation, einhergehend mit dem Verlust der CD4-Oberflächenexpression, identifiziert werden.

5.6.1 Oberflächenexpression des tCD4-Rezeptors eines bicistronischen Reporter-konstruktes in HuH-7 Zellen

Zunächst wurden mittels PCR drei verschiedene HCV IRES-core-tCD4-Plasmide synthetisiert, die über die Restriktionsschnittstellen SpeI und HindIII in den Ausgangsvektor pGL3R hinter die Renilla Luciferase eingefügt wurden. Das erste Konstrukt wurde aus der Renilla Luciferase, der HCV IRES, den ersten 30 Basen des HCV Core Proteins sowie tCD4 gebildet (pR5'dCtCD4). Das zweite Konstrukt bestand im Vergleich zu pR5'dCtCD4 aus einem Fusionsprotein von Core und tCD4 (pR5'CtCD4) und ein weiteres Konstrukt aus dem kompletten Core-Protein vor dem tCD4 (pR5'CoretCD4).

Nach transients Transfektion in HuH-7 Zellen wurden alle Konstrukte dahingehend überprüft, ob der tCD4-Rezeptor auf der Oberfläche exprimiert wird. Dabei wurden die Zellen mit FITC-gekoppelten CD4-Antikörpern inkubiert und einerseits unter Fluoreszenzlicht betrachtet und andererseits im FACScalibur gemessen. Bei Sichtung im Mikroskop konnte bei keinem der Konstrukte eine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Diese scheinbar fehlende Expression des trunkierten CD4-Rezeptors auf der Zelloberfläche konnte bei der FACS-Messung bestätigt werden, transfizierte HuH-7 Zellen zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle (pGL3) keine quantitative Verschiebung der Fluoreszenz.

Es wurde vermutet, dass das Core-Gen die Expression des tCD4 stört, so dass ein viertes Konstrukt kloniert wurde, in dem das Gen für die Core Expression entfernt wurde. Dementsprechend schließt das tCD4-Gen direkt an die HCV IRES (pR5'tCD4), jedoch auch bei diesem vierten Konstrukt konnte keine Fluoreszenz detektiert werden.

Für die Etablierung stabiler tCD4-Zelllinien sollte die Renilla Luciferase gegen den Selektionsmarker Hygromycin ausgetauscht werden. Dabei wurde Hygromycin nach PCR Amplifikation über EcoRV- und XbaI-Schnittstellen an die Stelle der Renilla Luciferase kloniert. Erneut wurden die Konstrukte auf ihre Fähigkeit zur Expression des tCD4-Rezeptors überprüft. Durch den Austausch der beiden Gene (Renilla gegen Hygromycin) konnte eine verbesserte wenn auch sehr schwache Fluoreszenz ausgemacht werden.

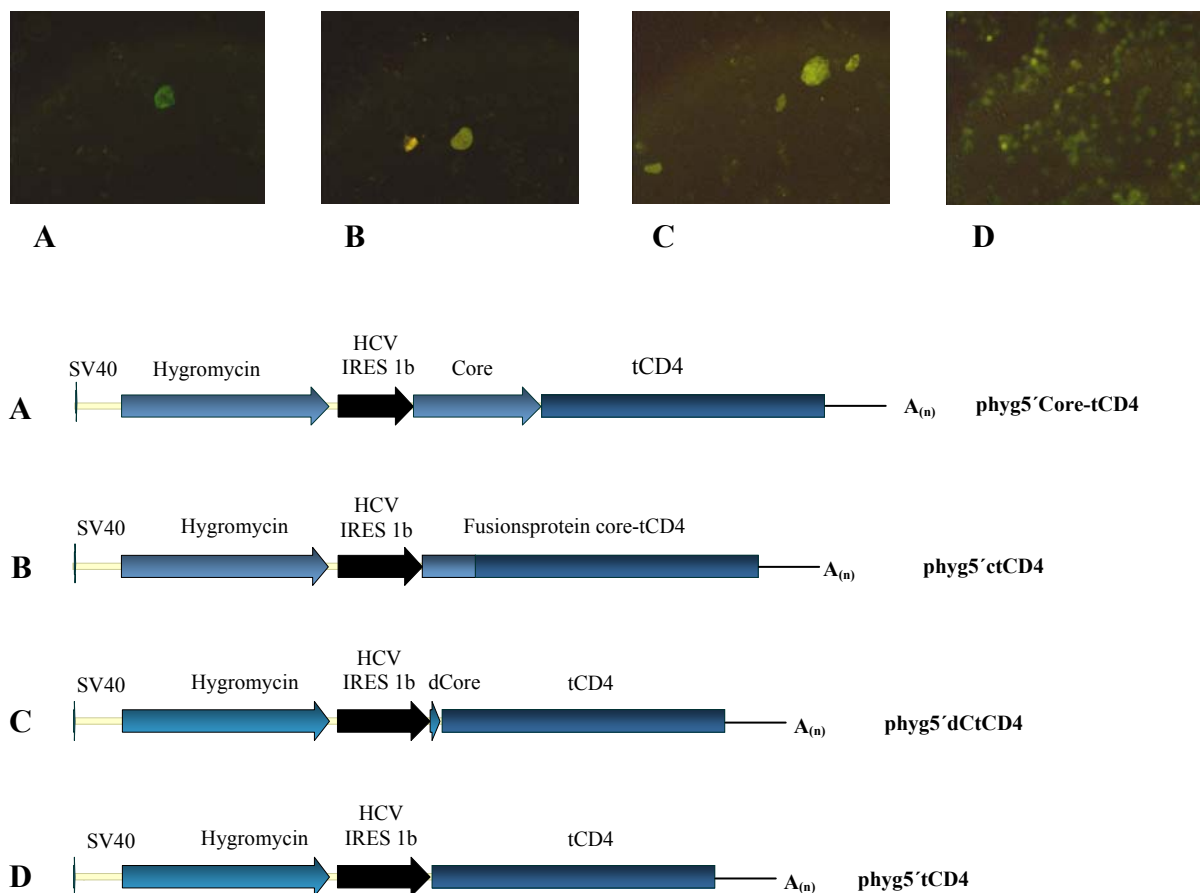


Abb.5.33: Überprüfung der Expression des Oberflächenrezeptors CD4 nach Transfektion verschiedener Konstrukte (A-D) in HuH-7 Zellen. Sichtung im Mikroskop nach CD4-AK-FITC-Staining bei verschiedenen Konstrukten

Da der Austausch der Renilla Luciferase gegen Hygromycin keine wesentliche Verbesserung der CD4-Expression auf der Zelloberfläche einbrachte, sollte dann ausgeschlossen werden, dass das tCD4-Gen nicht funktionsunfähig ist und darüber hinaus auch zur Zelloberfläche transportiert wird. So wurde das Renilla Luciferase Gen sowie die HCV IRES aus dem Plasmid deletiert, so dass die verschiedenen Core-tCD4-Konstrukte unter der Kontrolle des SV40 Promoter exprimiert wurden.

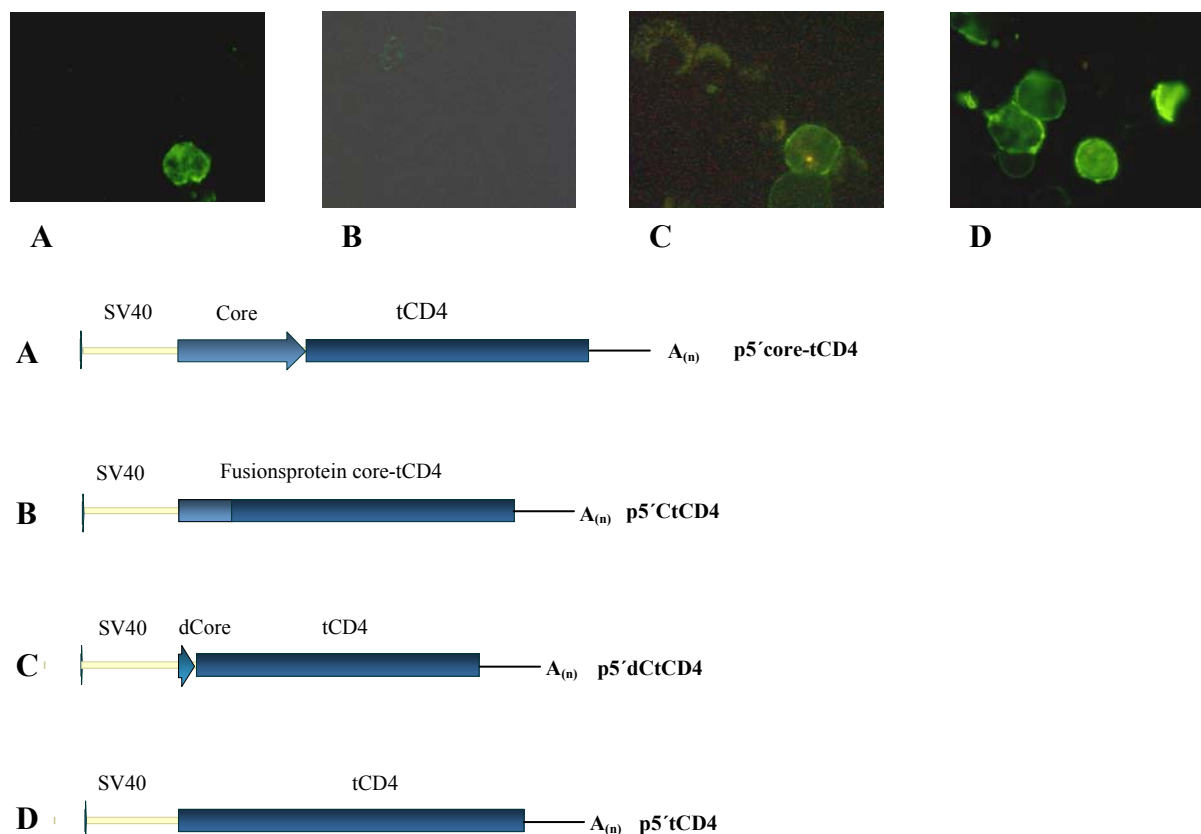


Abb.5.34: Überprüfung der Expression des Oberflächenrezeptors CD4 nach Transfektion verschiedener Konstrukte (A-D) in HuH-7 Zellen. Sichtung im Mikroskop nach CD4-AK-FITC-Staining bei verschiedenen Konstrukten

Die stark fluoreszierenden Zellen des Antikörper-Stainings zeigten, dass das tCD4-Gen funktionell aktiv ist und auch auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Lediglich bei dem Fusionsprotein aus Core und tCD4 (p5'CtCD4) konnte keine Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb.5.34).

5.6.2 Generierung einer stabilen tCD4-Zelllinie

Da die Funktion des tCD4 unter direkter Kontrolle des SV40 Promotors gezeigt werden konnte, musste jetzt die wahrscheinliche Fehlerquelle sowie neue Möglichkeiten zur Verbesserung des HCV IRES Expressionssystems gefunden werden. Aufgrund der bisherigen Beobachtungen konnte davon ausgegangen werden, dass der tCD4-Rezeptor wegen struktureller Behinderungen des bicistronischen Reporterkonstrukts nicht exprimiert wird. Um eine effiziente tCD4-Expression auf der Zelloberfläche zu erreichen, wurden die Konstrukte deshalb in den Vektor pcDNA3.1(+)*hygro* umkloniert, in dem das Hygromycin-Gen abseits des tCD4-Gens exprimiert wird. Zusätzlich wurde die HCV 3'UTR über XbaI-Restriktionsstellen hinter das tCD4-Gen in das ohne Core generierte Plasmid pc5'tCD4 kloniert. Sämtliche generierten Klone wurden in HuH-7 Zellen transfiziert und die Fluoreszenz-Aktivität mittels FITC-gekoppelten Antikörper im FACS als auch unter dem Mikroskop untersucht. Verglichen mit der Fluoreszenz-Aktivität der Positivkontrolle pMACS4.1 zeigte sich, dass die tCD4-Expression der HCV IRES-tCD4-Konstrukte nur noch geringfügig von der Intensität der pMACS4.1-vermittelten quantitativen Expression abweichen (Abb 5.36).

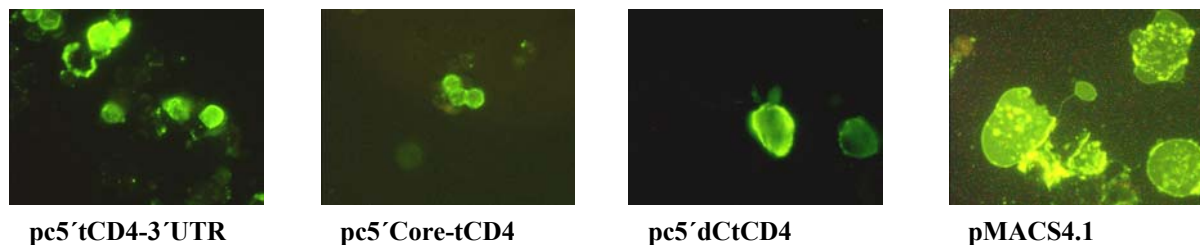


Abb.5.36: Überprüfung der Expression des Oberflächenrezeptors CD4 durch Sichtung im Mikroskop nach CD4-AK-FITC-Staining bei verschiedenen Konstrukten nach Umklonierung in pcDNA3.1(+)*hygro*.

Für die Etablierung stabiler Zelllinien wurden die in HuH-7 Zellen transfizierten Konstrukte mit Hygromycin bis zur Entstehung monoklonaler Kulturen selektiert. Die stabilen Zelllinien wurden im Mikroskop auf Expression des tCD4-Rezeptors nach Inkubation mit FITC-gekoppelten Antikörpern überprüft und zeigten nicht alle eine Fluoreszenz, so dass mittels „magnetic cell sorting“ nur die Zellen, die eine hohe Zahl an tCD4-Rezeptoren exprimierten von den anderen CD4-negativen Zellen getrennt wurden.

Dabei wurden die HuH-7 Zellen mit magnetischen Anti-CD4 Microbeads inkubiert, die beim Durchfluss durch Säulen in einem magnetischen Feld zurückgehalten und so tCD4-positive Zellen von Zellen mit wenig exprimierenden tCD4-Rezeptoren getrennt werden. Nach Anreicherung der positiven tCD4-Zellen lag eine homogene deutlich tCD4-exprimierende und fluoreszierende Zellkultur vor.

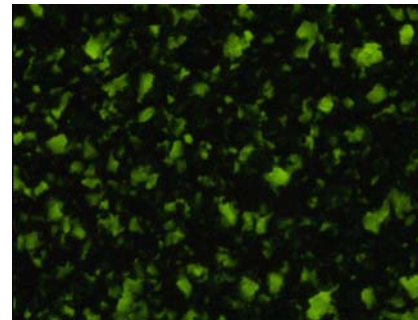


Abb.5.37 Stabile Zelllinie pc5'tCD4-3'UTR in HuH-7 Zellen. Fluoreszenz nach Inkubation mit FITC-CD4-Antikörpern.

5.6.3 Funktionalität des tCD4-Expressionssystem

Nachdem die stabile Zelllinie pc5'tCD4-3'UTR in HuH-7 Zellen etabliert wurde, sollte dann untersucht werden, inwiefern durch dieses Expressionssystem effiziente shRNAs identifiziert werden können. Pc5'tCD4-3'UTR wurde transient mit sitCD4-665 transfiziert und CD4-positive Zellen nach drei Tagen durch magnetische Zellsortierung von CD4-negativen Zellen im Durchfluss getrennt. Die durchgelassenen Zellen wurden in zwei Fraktionen aufgeteilt, wobei eine Zellfraktion in einer PCR mittels spezifischer Primer erfolgreich auf Vorhandensein des sitCD4-665-exprimierenden Plasmids getestet wurde. Die zweite Fraktion wurde mittels CD4-Antikörper-Staining auf Expression des tCD4-Rezeptors auf der Zelloberfläche getestet und die im Mikroskop analysierten Zellen zeigten im Vergleich zur Ausgangspopulation eine nur sehr schwache Fluoreszenz. Folglich konnte ein Fluoreszenzverlust bei gleichzeitiger Expression des sitCD4-Plasmids gezeigt werden und bestätigte die Funktionalität des tCD4-Expressionssystems.

6. Diskussion

6.1 Untersuchungen zum Einfluss zellulärer Proteine auf die subgenomische Replikation und Translation eines Hepatitis C Virus Replikons

Das Hepatitis C Virus nutzt für die virale Replikation und HCV IRES-vermittelte Translation neben den eigenen viralen Proteinen auch eine Vielzahl von zellulären Proteinen der Wirtszelle. So wurde bei mehreren Proteinen eine Bindung mit der HCV RNA nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Genexpression zellulärer Proteine, die als HCV Kofaktoren diskutiert wurden, verstärkt als auch inhibiert werden. Die dadurch veränderte Expression auf Proteinebene könnte sich auf die virale Replikation und Translation von HCV auswirken und so einen Aufschluss über die potentielle Funktion einzelner Proteine als Kofaktoren des HCV Replikationszyklus geben.

Zelluläre Proteine wurden mittels PCR aus einer cDNA-Bibliothek heraus amplifiziert und in Sense- beziehungsweise Antisense-Orientierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+)*hygro* kloniert. Nach transienter Transfektion der genspezifischen Expressionsplasmide in HuH-7 Zellen, die ein subgenomisches HCV Replikon exprimieren, wurde zunächst im Northern Blot mit ³²P radioaktiv markierten Sonden in RNA-Studien überprüft, ob die Gene intrazellulär durch die Plasmide exprimiert wurden. Dabei zeigte sich, dass der Level der Genexpression durch Einbringen der Sense- sowie Antisense-Plasmide in die Hepatozytenzelllinie HuH-7 im Vergleich zur Leervektor-transfizierten Kontrolle deutlich gesteigert wurde. Nachdem die plasmid-vermittelte Genexpression in Sense- oder Antisense-Orientierung in den HuH-7 Replikonzellen im Northern Blot gezeigt wurde, musste anschließend bestätigt werden, dass die Überexpression oder Suppression der Gene auf RNA-Ebene folglich auch zu einer veränderten Proteinexpression führt. Die Proteinexpression von PSMA7, HuR und PTB wurde fünf Tage nach Transfektion der Sense- und Antisense-Konstrukte in die Replikonzellen im Western Blot mit monoklonalen, spezifischen Antikörpern überprüft. Bei der Transfektion von Sense-Konstrukten in die Replikonzellen konnte jeweils eine Erhöhung der genspezifischen Proteinexpression bis zu 200% detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte durch Plasmid-vermittelte Antisense-RNA eine genspezifische Verminderung der Proteinexpression bei PTB, PSMA7 und HuR bis zu etwa 40% detektiert werden.

Die nächste Überlegung war, ob sich die Verminderung oder die Erhöhung der spezifischen Genexpression auf den Replikationszyklus des Hepatitis C Virus auswirkt. In Northern und Western Blot Analysen zeigte sich, dass der HCV RNA Level und HCV NS5B

Proteinlevel indirekt nach Änderung der Genexpression einiger zellulärer Proteine durch Expressionsplasmide ebenfalls verstärkt bzw. inhibiert wurde.

6.1.1 Modulation der subgenomischen HCV Replikation und Translation durch PTB und hnRNP C

Polypyrimidin Tract Binding Protein (PTB), ein 57 kDa Protein, gehört zur Familie der heterogenen nukleären Ribonukleinproteine (hnRNP), besteht aus vier RNA-Erkennungs-Bindungsmotiven und besitzt nukleäre sowie cytoplasmatische Funktionen. Im Nukleus reprimiert es das „splicen“ verschiedener Exons der prä-mRNA [105], im Cytoplasma stellt PTB einen Modulator viraler und zellulärer IRES-vermittelter Translation dar.

PTB (hnRNP I) wurde für die Untersuchung HCV modulierender Eigenschaften ausgewählt, da mehrmals nachgewiesen wurde, dass PTB an verschiedenen Stellen im HCV Genom bindet. Gezeigt wurde die Bindung von PTB mit HCV mittels Elektronenmikroskopie am „stem loop“ III der hoch konservierten HCV Internal Ribosomal Entry Site (IRES) [106], an den „stem loops“ II und III der hoch konservierten untranslatierten 3' Region [37] und besonders auch in einem Bereich des strukturellen HCV Core Proteins [39]. In Bezug auf die Modulation der viralen und zellulären IRES-vermittelten Translation brachten bisher einige Untersuchungen an PTB gegensätzliche Ergebnisse. Die Erhöhung der IRES-Aktivität [107,108] durch PTB als auch deren Verminderung wurden schon beschrieben [109, 110]. Die Komplexität der Regulatorfunktion durch multiple Bindungsstellen und diverse Funktionen von PTB reflektiert sich in den vielseitigen Beobachtungen.

Aufgrund dieser unterschiedlichen Beobachtungen sollte die Rolle von PTB bei der HCV IRES-vermittelten Translation sowie bei der Replikation geklärt werden. Die Überexpression von PTB in Sense- und in Antisense Orientierung sollte einen ersten Anhalt für die Funktion von PTB für die subgenomische HCV Replikation und Translation geben. Nachdem die PTB Protein Überexpression durch Sense- und die Verminderung der Proteinexpression durch Antisense-RNA gezeigt wurde, wurde im Northern Blot ein geringfügig verstärkter HCV RNA Level durch Überexpression und ein moderat inhibierter HCV RNA Level durch PTB-Antisense beobachtet. Die subgenomische HCV Replikation konnte durch PTB nicht signifikant verstärkt werden, jedoch führte die Verminderung der PTB Protein Konzentration zu einem deutlich verringerten HCV RNA Level. Eindeutig ist die Rolle von PTB bei der HCV IRES-vermittelten Translation, der verminderte PTB Protein Level führte zu einer signifikanten Reduktion des HCV NS5B Protein Levels. Dies deutet vor

allem auf eine essentielle Funktion von PTB bei der Modulation der HCV IRES-vermittelten Translation hin, wohingegen die Beobachtungen in Bezug auf die Beeinflussung der subgenomischen Replikation eher auf eine untergeordnete Rolle von PTB schließen lassen.

Für das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein hnRNP C, ein 35 kDa Protein, wurden ähnliche RNA-bindende Eigenschaften beschrieben wie für hnRNP I (PTB). Die RNA Bindungsaktivität von hnRNP C scheint in erster Linie durch eine RNA Bindungsdomäne, die 94 aminoterminalen Aminosäuren umfasst, vermittelt zu werden [111]. Diese RNA Erkennungsmotive sind evolutionär konservierte Pyrimidin-reiche Domänen in prä-mRNA-, mRNA-, prä-rRNA- und snRNA-Bindungsproteinen, zu denen hnRNP-Proteine, Splicing Faktoren und Polyadenylierungsfaktoren gezählt werden [112].

Um die Bedeutung von hnRNP C für die subgenomische HCV Replikation und Translation abzuschätzen, wurde die hnRNP C RNA und Protein Expression nach Expression durch Sense- und Antisense-Plasmide im Northern und Western Blot untersucht. Die Wirkung von hnRNP C auf HCV zeigte ähnliche Ergebnisse wie bei hnRNP I (PTB), eine signifikante Verminderung des HCV RNA und Protein Levels durch Expression von Antisense-RNA und geringfügige Verstärkung der HCV IRES-vermittelten Translation durch Expression von Sense-RNA.

Dabei zeigen die Untersuchungen, dass durch PTB Antisense-RNA die subgenomische HCV Replikation weniger beeinträchtigt wird, als durch hnRNP C Antisense RNA. Bei der HCV Translation zeigte sich allerdings ein gegensätzliches Bild, nämlich die im Vergleich zu hnRNP C stärkere Reduktion der HCV NS5B Protein Expression durch PTB in Antisense-Orientierung. Das korreliert mit bisherigen Untersuchungen, bei denen PTB schon mehrfach die Modulation der HCV IRES-vermittelten Translation gezeigt hat. Im Gegensatz zu PTB scheint hnRNP C aufgrund der Beobachtungen und der nachgewiesenen Bindung an die HCV RNA beider Polaritäten [41] vermutlich vorzugsweise an der Transkription des HCV RNA Genoms beteiligt zu sein [40]. Die bevorzugte Bindung von hnRNP C an die HCV 3'UTR von Plus- als auch Minusstrang könnte auf eine besondere Bedeutung für hnRNP C bei der Stabilisierung und Modulation der HCV RNA während der Replikation hinweisen. Auch wenn eine Bindung von PTB an die HCV 3'UTR nachgewiesen ist, wurden bevorzugte PTB Bindungsstellen durch Elektronenmikroskopie an der HCV IRES sowie im Core Bereich postuliert und unterstützen die Vermutung, dass PTB in erster Linie für die Modulation der HCV Translation zuständig ist [39].

6.1.2 RNA Stabilisierung durch das AU-reiche Element (ARE)-bindende Protein HuR

Die HCV 3'UTR setzt sich zusammen aus dem hoch konservierten 3'X-Bereich, der aus 98 Nukleotiden besteht, und dem besonderen poly(U/C)-Abschnitt [113]. Verschiedene zelluläre mRNAs, unter anderem Cytokine, Entzündungsfaktoren (z.B. Interleukin-6) und Onkogene, verfügen ebenfalls über diese AU-reichen Elemente (ARE) des poly (U/C)-Bereiches [114], die nachweislich Instabilität vermitteln [115]. Transwirkende Proteine, wie HuR (*Human antigen R*), binden an diese AU-reichen Sequenzen mit definierten Motiven (AUUUA-Motive), stabilisieren die zelluläre messengerRNA [116] und verhindern so die RNA Degradation. Der stabilisierende Effekt von HuR wurde gezeigt, indem ein durch UV-Licht ausgelöster erhöhter Level an cytoplasmatischer HuR Konzentration mit einer erhöhten Stabilität zellulärer mRNA korrelierte [117].

HuR, 38 kDa, gehört zur Familie der ELAV-ähnlichen Proteine (*Embryonic Lethal Abnormal Version*) und besteht aus einer N-terminalen Region, gefolgt von zwei RNA-Bindungsmotiven, einer Verbindungsdomäne und einem dritten RNA-Bindungsmotiv. Es wurde nachgewiesen, dass HuR nach der Transkription bestimmter Gene an diese mRNAs bindet und diese mit Hilfe des eigenen Ex- und Importsignals aus dem Zellkern ins Cytoplasma führt und die mRNA gleichzeitig vor Degradierung schützt [118].

HuR bindet nachweislich an die AREs innerhalb der 3'UTR des HCV Plus- sowie des Minusstrangs [41] und schützt so vermutlich die HCV Replikation und Translation vor Instabilität und Degradation. Die Überexpression von HuR in Sense-Orientierung durch Expressionsplasmide könnte demnach zu einer Verstärkung der Hepatitis C Virus Replikation und Translation führen, wohingegen HuR Antisense-RNA durch Inhibition der HuR-Expression möglicherweise zur Instabilität der viralen RNA und damit zu einer Störung des subgenomischen Replikationszyklus von HCV führt. Nach dem Nachweis der spezifischen Überexpression von HuR auf RNA und Protein Ebene wurde die dadurch verbundene Auswirkung auf den HCV RNA und NS5B Protein Level überprüft. Durch HuR Antisense-RNA Expression und einer dadurch detektierten Verringerung des HuR Proteins Levels um 20% konnte keine signifikante Verminderung der HCV RNA Expression detektiert werden, was vermutlich auf die eher geringe HuR Protein Inhibition zurückzuführen sein könnte. Da aber der im Western Blot detektierte HCV NS5B Protein Level um 30 % verringert wurde, zeigt dies, dass die Inhibition der HuR Protein Expression zumindest für die Verminderung der HCV Translation ausreichend war. Zusammengefasst hat die Verminderung der HuR Protein Konzentration um 20% schon zu einer Instabilität der HCV RNA und damit zu einer Reduktion der HCV IRES-vermittelten Translation geführt. Diese Vermutung wird auch

durch die Beobachtung gestützt, dass die Plasmid-bedingte Überexpression von HuR in Sense Orientierung von etwa 80% zu einem um 60% erhöhten HCV NS5B Protein Level führte. Möglicherweise wurde die HCV RNA durch die erhöhte HuR Konzentrationen länger stabilisiert und das HCV Polyprotein effizienter und vermehrt translatiert. Auch in diesem Fall konnte keine signifikante Veränderung der HCV RNA Expression detektiert werden und deutet vermutlich auf eine nicht ausreichende Suppression der genpezifischen HuR-Expression durch Antisense-RNA hin.

6.1.3 Überexpression von IRF1/IRF3 induziert die Transkription von Interferon-assoziierten Genen

Die Familie der *Interferon regulatorischen Faktoren* (IRF) spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung der Transkription von Interferon-stimulierten Genen als auch von Interferon-Genen direkt. IRF1 und IRF3 sind Transkriptionsfaktoren, die aufgrund von Virusinfektionen aktiviert werden und eine Signalkaskade zur Eliminierung des Virus in infizierten Zellen auslösen.

Durch IKK (*IKappaB Kinase*) wird IRF3, ein 50 kDa Protein, an Serin-Resten phosphoryliert und somit aktiviert. Aktiviertes IRF3 stimuliert mit Hilfe des co-aktivierten Transkriptionsfaktors CBP/p300 die Transkription von Interferon α und Interferon β . Die Interferone aktivieren den Transkriptionsfaktor ISGF3 (*Interferon Stimulated Gene Factor 3*) und darüber hinaus dessen Zielgen, den *Interferon Regulatory Factor 7* (IRF7). Das neu produzierte IRF7 wird ähnlich wie IRF3 durch Phosphorylierung aktiviert und aktiviert seinerseits wieder die IFN α/β Promoter [119]. Durch diesen positiven „Feedback Loop“ kann von den Zellen eine massive Interferonproduktion ausgelöst werden.

Es wurde schon gezeigt, dass HCV in persistierenden Infektionen diese durch IRF3, einem entscheidenden Transkriptionsfaktor für antivirale Antworten, auszulösende Signalkaskade blockiert und die Induktion von Interferon zur Eliminierung des Virus unterbindet. Dabei wird durch die Blockierung der Phosphorylierungsstelle von IRF3 durch die HCV NS3 Serinprotease die auslösende Signaltransduktion verhindert und kann so die Interferonantwort unterdrücken [120]. Dementsprechend sollte jetzt untersucht werden, inwiefern die Überexpression von IRF3 diese Kaskade in den HuH-7 Replikon Zellen dennoch auslösen und den subgenomischen HCV Replikationszyklus unterbinden kann. Die Transfektion des IRF3 Sense-Plasmids in die HuH-7 Replikonzellen zeigte eine fast vollständige Eliminierung der subgenomischen HCV Replikation, so dass vermutlich davon

ausgegangen werden kann, dass die NS3-Protease durch die gesteigerte Expression von IRF3-Genen die Phosphorylierungsstelle nicht mehr vollständig blockieren kann und die Kaskade ausgelöst wird. Durch die anschließende Aktivierung kommt es so zur Interferonproduktion, die folglich zur Eliminierung der HCV RNA und Proteine führt.

Nahezu die gleiche Wirkung konnte bei der Überexpression von IRF1 gezeigt werden, unter dem Einfluss von IRF1 in Sense-Orientierung konnte die subgenomische HCV Replikation und Translation bis zu 80% inhibiert werden. Die Tatsache, dass IRF3 eine stärkere Inhibition der HCV Replikation und Translation als IRF1 zeigte, lässt sich vermutlich auf den oben erwähnten „positiven Feedback-Loop“ mit IRF7 zurückführen. IRF1 scheint diese massive Interferonproduktion dagegen nicht auszulösen, auch wenn dem Transkriptionsfaktor IRF1 ebenfalls Bindungsstellen in dem Promoterbereich von Interferon α/β nachgewiesen wurden. Die aktivierende Wirkung von IRF1 wird durch IRF2, welches an der gleichen Nukleotidsequenz bindet und eher in der Funktion als Repressor agiert, aufgehoben [121].

6.1.4 Proteosom-Untereinheiten PSMA1 und PSMA7

Das 20S-Proteosom ist ein ubiquitär vorhandener zylinder-förmiger multikatalytischer Proteinasekomplex im Cytoplasma und im Zellkern von Zellen. Das Proteosom ist ein proteinabbauender Komplex der sich aus vier Ringen von je sieben Untereinheiten zusammensetzt. Die beiden inneren Ringe bestehen aus β -Untereinheiten, die das katalytische Zentrum bilden und durch die Peptidbindungen gespalten werden. Die beiden äußeren Ringe werden aus je sieben α -Untereinheiten zusammengesetzt, die den Zugang zum Lumen des 20S-Proteosoms kontrollieren und an der Steuerung der Proteolyse beteiligt sind [43]. Da sich das 20S Proteosom frei im Cytoplasma und im Zellkern befindet, muss der Zugang von Proteinsubstraten zum proteinverdauenden Innenraum des 20S-Proteosoms daher genau geregelt sein.

Proteasome Subunit Alpha 1 (PSMA1), ein 30 kDa Protein und *Proteasome Subunit Alpha 7* (PSMA7), ein 28 kDa Protein sind Untereinheiten des äußeren Alpha-Rings des 20S Proteosoms und sollten auf deren Wirkung auf die HCV Replikation und Translation getestet werden. Die Proteosom α -Untereinheit 7 wurde als potentieller HCV Kofaktor diskutiert, da eine Ribozym-vermittelte Spaltung von PSMA7 zu einer Verringerung der HCV IRES-

vermittelten Translation führte [42]. Darüber hinaus sollte durch Auswahl einer weiteren Alpha-Untereinheit untersucht werden, ob die Verminderung der HCV Translation durch Inhibition von PSMA7 durch den gesamten Alpha-Ring des 20S Proteosomen vermittelt wird, oder ob die Wirkung ausschließlich auf PSMA7-spezifische Inhibition beruht. Die Beeinflussung einer zweiten α -Untereinheit, PSMA1, durch Expression der cDNA in Sense- und Antisense Orientierung könnte darüber Aufschluss geben.

Die durch das 20S-Proteosom vermittelte Aktivität beruht auf der Spaltung von Peptiden in einem ATP/Ubiquitin-abhängigen Prozess eines nicht lysosomalen Signalwegs. Durch Interferon stimulierte Zellen ersetzen drei Untereinheiten der inneren β -Ringe durch die induzierbaren Proteosom Untereinheiten LMP2, LMP7 und MECL-1 um dann mit zwei Partikeln des 19S Proteosomen das sogenannte 26S Immunproteosom zu bilden, das für die Generierung von MHC Klasse I Molekülen zur Antigen Präsentation verantwortlich ist [122]. Weiter wurde gezeigt, dass persistierende Virusinfektionen mit einem reduzierten LMP7-Level korrelieren [123], was darauf hindeutet, dass Viren zur viralen Etablierung in Zellen einen Mechanismus zur Inaktivierung der proteosomalen Epitop-Prozessierung durch LMP7-Inhibition nutzen.

Scheinbar gegensätzlich sehen im Vergleich dazu die nach der Transfektion von PSMA7 Sense- und Antisense-Konstrukten im Northern und Western Blot detektierten Ergebnisse aus. Der verminderte PSMA7 Protein Level durch Expression von PSMA7 RNA in Antisense-Orientierung führte dann auch zu einem reduzierten HCV RNA und NS5B Protein Level. Diese Beobachtung deutet auf die potentielle Rolle von PSMA7 als HCV Kofaktor hin, denn demgegenüber steht auch eine Verstärkung der subgenomischen HCV Replikation und Translation durch Überexpression von PSMA7. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine modulatorische Funktion von PSMA7 in der subgenomischen HCV Replikation und Translation hin.

Diese Beobachtungen korrelieren mit den Ergebnissen, die eine Inhibition der HCV IRES-vermittelten Translation durch PSMA7-gerichtete Ribozyme zeigte [42]. Andere Untersuchungen zeigten, dass PSMA7 in Hepatitis B Virus infizierten Zellen mit dem HBV X Protein (HBX) interagiert und eine plasmid-vermittelte Expression von PSMA7 Antisense RNA die Transaktivierung von HBX blockiert, während die Überexpression von PSMA7 HBX aktiviert. PSMA7 unterstützt demnach die Aktivierung von zellulären und auch viralen Promoter [124], was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen im Kontext mit HCV gezeigt wurde. Aus diesem Grund wurde deshalb die Vermutung postuliert, dass PSMA7 in

Verbindung mit HBX eine andere Funktion ausübt und nicht im üblichen Kontext der Proteosom-Funktion steht [124].

Bei der Überprüfung der Proteosom Alpha-Untereinheit 1 (PSMA1) als potentieller HCV Kofaktor konnten keine vergleichbaren Ergebnisse wie bei PSMA7 gezeigt werden. Die Veränderung des PSMA1 RNA und Protein Levels durch Expression von Sense- und Antisense-Konstrukten zeigte darüber hinaus keine signifikante Auswirkung auf den subgenomischen HCV Replikationszyklus. Diese Beobachtung verdeutlicht die besondere Position von PSMA7 in dem Proteosom-Komplex für die subgenomische HCV Replikation und IRES-vermittelte Translation.

6.1.5 Der eukaryotische Initiationsfaktor 3 (eIF3)

Die Initiierung der Cap-unabhängigen Hepatitis C Virus Translation wird durch die HCV Internal Ribosomal Entry Site (IRES) kontrolliert, an die die 40S ribosomale Untereinheit direkt binden kann. Die bei der IRES-vermittelten Translation der HCV Proteine zusätzlich erforderlichen eukaryotischen Initiationsfaktoren, eIF2 und eIF3, bilden zusammen mit der Ribosomenuntereinheit den 48S ribosomalen Prä-Initiations-Komplex, der sich später zum Translations-kompetenten Ribosomen zusammensetzt [34, 36]. Bei eIF3 (*Eukaryotic Initiation Factor 3*) konnte die Bindung des Translationsfaktors an die Domäne III der HCV IRES gezeigt werden. So sollte untersucht werden, ob die Interaktion von eIF3 mit der HCV IRES für die IRES-vermittelte Translation essentiell ist und durch Inhibition von eIF3-Untereinheit 9 (116 kDa), die als essentieller Faktor des aus 10 Untereinheiten bestehenden eIF3-Komplexes genannt wird [34], supprimiert werden kann.

So wurden die HCV Replikonzellen mit einem eIF3 Antisense-exprimierenden Plasmid transfiziert und HCV RNA als auch HCV Protein Level quantifiziert. Nach Bestätigung der Expression der eIF3 RNA im Northern Blot wurde die HCV RNA Expression untersucht. Durch die Ergebnisse konnte bestätigt werden, dass der Translationsfaktor eIF3 keinen Einfluss auf die subgenomische HCV Replikation hat und diese nicht inhibiert werden konnte. Die Inhibition der eIF3-Untereinheit 9 (p116) zeigte allerdings ebenfalls eine nur geringfügige Verminderung der HCV IRES-vermittelten Translation um etwa 10%. Vermutlich konnte die Funktion der gesamten eIF3-Einheit durch die Verminderung des eIF3-p116-Levels nicht ausreichend inaktiviert werden, um den HCV Replikationszyklus entscheidend zu beeinflussen.

6.1.6 Modulation der HCV IRES-vermittelten Luciferase Expression durch zelluläre Proteine

Die in den Replikonzellen gewonnenen Erkenntnisse über die zellulären Proteine als potentielle Hepatitis C Virus Kofaktoren, wurden auch im Luciferase Reportersystem untersucht. Das Reportersystem besteht aus der vom SV40 Promoter gesteuertem Renilla Luciferase (*Renilla reniformis*) und der HCV IRES-vermittelten Translation der Firefly Luciferase (*Photinus pyralis*) mit abschließendem HCV 3'UTR.

Nach Co-Transfektion der genspezifischen Sense-Konstrukte mit dem Luciferase-Plasmid in die HuH-7 Zellen zeigte die Überexpression der Gene in dem bicistronischen Reportersystem ein teilweise andere Wirkung auf die HCV IRES-vermittelte Aktivität als in den HuH-7 Replikonzellen. HnRNP C und HuR zeigten den gleichen Effekt wie in den subgenomischen HCV Replikonzellen und erhöhten durch ihre genspezifische Überexpression die HCV IRES vermittelte Luciferase-Aktivität. IRF1, IRF3, PSMA1, PSMA7 und PTB, konnten die in den Replikonzellen gezeigte Wirkung im Luciferasesystem nicht bestätigen.

IRF1 und IRF3, durch die die HCV Replikation und Translation in den Replikonzellen fast vollständig inhibiert wurde, hatten hier einen im Vergleich zu vorher geringen inhibierenden Einfluss auf die HCV IRES-vermittelte Luciferase Translation. Das subgenomische HCV Replikon zeigte sich sensitiver gegenüber *Interferon Regulatory Factor* 1 und 3 (IRF) induziertem Interferon als das Luciferase-Konstrukt. Dabei wurde schon gezeigt, dass ein definierter Bereich im HCV NS5A Protein, das im Luciferase Reporterkonstrukt nicht vorhanden ist, für die hohe Sensitivität gegenüber Interferon verantwortlich ist. Mutationen in der Region, der sogenannten *Interferon Sensitivity Determing Region* (ISDR), korrelierten unter anderem mit dem Ansprechen auf eine Interferontherapie [125].

PSMA7 und PTB konnten die Beobachtungen im Replikonsystem, durch Überexpression die HCV IRES-vermittelte Translation zumindest geringfügig zu verstärken, nicht bestätigen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass z.B im Luciferase Reportersystem aufgrund der fehlenden viralen Proteine auch nicht sämtliche Interaktionen zwischen PTB und HCV greifen können und bei PTB neben der HCV IRES und der HCV 3'UTR auch andere HCV Bindungsstellen durchaus notwendig sind, um durch PTB Überexpression die IRES-vermittelte Translation zu verstärken.

Im Gegensatz dazu konnte die Expression von Antisense-RNA im Wesentlichen die in den HCV Replikonzellen gezeigten Ergebnisse manifestieren. Außerordentlich effizient zeigte

sich die Inhibition der HCV IRES-vermittelten Luciferase Translation durch Expression von HuR, PSMA7 und auch hnRNP C RNA in Antisense-Orientierung. So scheint unter anderem die HCV 3'UTR eine bedeutende Funktion für die Stabilität der IRES-vermittelten Luciferase Translation zu spielen, da die Inhibition der HCV 3'UTR-bindenden Faktoren HuR und hnRNP C zu einer signifikanten Verminderung der Luciferase Expression führte.

6.2 Inhibition der subgenomischen Hepatitis C Virus Replikation und Translation durch RNA Interferenz

RNA Interferenz ist ein Prozess, der sequenzspezifisch und posttranskriptionell die Expression von Genen durch sogenannte small interfering RNA (siRNA) unterbindet. Sequenzspezifische RNA Moleküle mit einer Größe von 19-23 Basenpaaren dienen als Vorlage für den *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC), die entsprechende Ziel-RNA durch Spaltung zu degradieren. Dieser Mechanismus kann zum einen genutzt werden, um die Funktion der von Genen translatierten Proteine zu charakterisieren. Außerdem könnte dieser Mechanismus das Potential liefern, um als gentherapeutische antivirale Applikation persistierende Virusinfektionen, wie HCV zu eliminieren.

Bisherige Forschungsergebnisse konnten die Inhibition der subgenomischen HCV Replikon RNA und Protein Expression durch RNA Interferenz in HuH-7 Zellen zeigen. Als Ziele für HCV-gerichtete siRNAs wurden bisher NS3-, NS4B- und NS5A/B-Proteinkodierende Bereiche gewählt, um die Genexpression durch I. synthetisch hergestellte small interfering RNAs (siRNA) [126] und II. Plasmid-basierende small hairpin RNAs (shRNA) [127] zu inhibieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Replikationszyklus von HCV durch plasmid-basierende RNA Interferenz gegen hochkonservierte Regionen im RNA Genom inhibiert werden. Dabei hängt die Effizienz von siRNAs im Wesentlichen von bestimmten Kriterien, wie G/C-Gehalt und Sekundärstrukturen der Ziel-RNA ab, so dass für die Identifikation von wirkungsvollen siRNAs mehrere geeignete Sequenzen gegen die gleiche Ziel-RNA ausgewählt wurden. Um eine Bandbreite von potentiellen Sequenzen für die Inhibition von HCV RNA durch shRNAs auszutesten, ist die Anwendung von Plasmid-basierenden small hairpin RNAs aus Kostengründen praktikabler.

Zuerst musste überprüft werden, ob die plasmid-basierenden shRNAs im Cytoplasma vorhanden und intrazellulär aktiv sind. So wurde das fluoreszierende Protein EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) zusammen mit einem gegen die Position 126 der

mRNA gerichtete shRNA in HuH-7 Zellen co-transfiziert und auf Fluoreszenz überprüft. Im Vergleich zu HuH-7 Zellen, die mit Kontroll-shRNA transfiziert wurden, konnte bei siGFP126-transfizierten Zellen eine deutliche Verringerung der Fluoreszenz detektiert werden und bestätigte die Inhibition der Genexpression durch RNA Interferenz. In weiteren Untersuchungen konnte durch Einsatz unterschiedlicher DNA-Mengen bei der Transfektion die Abhängigkeit der Effizienz der RNA Interferenz von der eingesetzten Menge gezeigt werden, so dass für wirkungsvolle RNA Interferenz neben der geeigneten Zielsequenz auch die optimale Konzentration von shRNAs entscheidend ist.

6.2.1 Auswahl der Zielsequenzen für shRNAs gegen HCV RNA

Nach der Bestätigung der prinzipiellen Wirksamkeit von shRNAs in HuH-7 Zellen durch Inhibition von EGFP, wurden Zielsequenzen für die Erstellung von plasmid-basierenden shRNAs ausgewählt, die gegen das RNA Plusstranggenom des Hepatitis C Virus gerichtet sind. Zuerst galt es zu klären, welche Bereiche des HCV-Genoms als Zielsequenzen geeignet wären. RNA Interferenz gegen NS3, NS4B, NS5A und NS5B wurde bereits untersucht und diese Ziele sind aufgrund der hohen Mutationsrate im Hepatitis C Virus Genom gerade in diesen Bereichen auch eher ungeeignete Ziele im Hinblick auf neue siRNA-basierende therapeutische Applikationen gegen HCV. So könnten möglicherweise neue sogenannte „Escape Varianten“ entstehen, durch die HCV weiter in den Zellen persistieren könnte. Die hohe Mutationsrate führte unter anderem zu der großen Anzahl an verschiedenen HCV Genotypen und zusätzlichen Subtypen, so dass für die Entwicklung einer siRNA-basierenden therapeutischen antiviralen Anwendung Bereiche gewählt werden sollten, die über sämtliche HCV Genotypen hoch konserviert sind. Solche Bereiche finden sich in den 5' (HCV IRES)- und 3'-Regionen des HCV mit einer Nukleotid-Identität von 99,6% über alle HCV Genotypen [128].

Für die Auswahl von Zielsequenzen für siRNAs gibt es Richtlinien, die die Vermeidung von 5' und 3' Regionen empfiehlt, da die besonders in diesen Bereichen verstärkt auftretenden Sekundärstrukturen sowie ansetzende Transkriptions- und Translationsfaktoren die siRNA am Zugang zur Zielsequenz entscheidend hindern könnten. Aufgrund der hohen Mutabilität im Polyproteinbereich von HCV wurden trotzdem Sequenzen innerhalb der konservierten 5' und 3' Regionen ausgewählt und eventuelle sterische Hinderungen in Kauf genommen. Es wurden drei shRNAs gegen die HCV IRES erstellt, siHCV74 gegen den „stem loop II“ und siHCV156 sowie siHCV207 gegen den „stem loop

III“. Die gegen den HCV 3'UTR gerichtete siHCV3'X wurde gegen den Plusstrang und siHCV3'X(-) in erster Linie gegen den Minusstrang des HCV Genoms gerichtet. Allerdings wurde schon gezeigt, dass der Sense als auch der Antisense-Strang der siRNA vom RISC erkannt und als Vorlage zur Spaltung der Zielsequenz genutzt wird, so dass z.B. durch siHCV3'X(-) nicht nur der intermediäre HCV Minusstrang, sondern theoretisch auch der Plusstrang gespalten wird. Lediglich sequenzspezifische Merkmale, wie z.B. die Verteilung AT- oder GC-reicher Bereiche sind entscheidend, ob der Sense- oder der Antisense-Strang der siRNA als Vorlage vom RISC inkorporiert wird.

Erste Erkenntnisse über die Wirkung der HCV-gerichteten shRNAs sollte im Luciferase Reportersystem gezeigt werden, in dem die Firefly-Luciferase unter der Kontrolle der HCV 5'UTR (IRES) translatiert wird. Anschließend sollten die shRNAs in monocistronischen HCV Replikonzellen untersucht werden, um deren Fähigkeit zur Inhibition der subgenomischer HCV Replikation und Translation zu überprüfen.

6.2.2 ShRNAs gegen hoch konservierte 5' und 3' Regionen des HCV Replikons inhibieren die subgenomische Replikation und Translation

Nach Co-Transfektion des Luciferase Reporters pRL-IRES-FL-3'UTR und der shRNA-Plasmide in HuH-7 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Luciferase Aktivität nach Transfektion von siHCV74 und der gegen das HCV 3'UTR gerichteten siHCV3'X bis zu 50% inhibiert werden konnte. SiHCV156 und siHCV207, die gegen den „stem loop III“ der HCV IRES gerichtet sind, inhibierten die Luciferase Aktivität dagegen nur um 20-30%, was eventuell auf sterische Hinderungen durch Sekundärstrukturen oder zelluläre Translationsfaktoren zurückzuführen ist, da neben weiteren zellulären Proteinen z.B. auch der eukaryotische Initiationsfaktor eIF3 für die Initiation der Translation an eben diesen stem loop III bindet [34]. Darüber hinaus zeigte sich, dass die gegen den Minusstrang gerichtete siHCV3'X(-) in dem Luciferasesystem nicht wirksam war, was auch erwartet wurde, weil die Zielsequenz nach optimierten Regeln für shRNA-Design ausgesucht wurde und gegen den HCV Minusstrang gerichtet ist. Da die ausgewählte Sequenz aus dem Minusstrang im Luciferase Reporter nicht vorhanden ist und die komplementäre gegen den Plusstrang-gerichtete Sequenz nicht den optimalen Bedingungen für die Inkorporation in den RISC entspricht, konnte keine Inhibition der IRES-vermittelten Luciferase Expression detektiert werden.

Die Wirksamkeit von vier der fünf untersuchten shRNAs konnte in dem Luciferase Reportersystem gezeigt werden und sollte anschließend in dem Zellkultursystem überprüft werden. Die monocistronischen HCV Replikonzellen wurden mit den shRNA-Plasmiden transfiziert und nach fünf Tagen für Protein und RNA Analysen geerntet, da gezeigt wurde, dass sich eine Inhibition von NS5B durch die lange Halbwertszeit des Proteins erst am fünften Tag zeigt [129]. Die Überprüfung der RNA Expression im Northern Blot zeigte, dass durch alle gegen die HCV 5'UTR-gerichteten shRNAs eine Inhibition der subgenomischen HCV Replikation bis zu 60% erreicht werden konnte. Der subgenomische HCV Protein Level korrelierte mit dem Ergebnis und zeigte einen bei allen gegen HCV 5'UTR-gerichteten shRNAs eine Inhibition der HCV Translation um 70-80%. Trotz Sekundärstrukturen und Transkriptionsfaktoren, die den Zugang zur Zielsequenz verhindern könnten, konnten die shRNAs gegen die hoch konservierten HCV Regionen den Replikationszyklus deutlich inhibieren.

Die Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die HCV NS5B Protein Expression des HCV Replikons durch HCV IRES-gerichtete shRNAs wirkungsvoller supprimiert wurde als der Luciferase Reporter. Der stärkere shRNA Effekt auf das HCV Replikon könnte auf verschiedene Effekte des autonomen Replikationsmechanismus von HCV zurückzuführen sein. Die Blockierung der IRES-vermittelten Synthese von nichtstrukturellen Proteinen, die für die virale RNA Synthese essentiell sind und die Spaltung von Teilen des 5'UTR, die für die komplementäre RNA-Minusstrangsynthese wichtig sind, könnten zu einer weitergehenden Suppression der viralen Replikation führen.

Bei den gegen die HCV 3'UTR gerichteten shRNAs konnte nur siHCV3'X, die gegen Position 7798 des Plusstranges des HCV Replikons gerichtet ist, die subgenomische Replikation als auch die HCV IRES-vermittelte Translation inhibieren. Die Spaltung erfolgt dabei genau zwischen stem loop II und III der HCV 3'UTR, die unter anderem auch für die Bindung von dem RNA-stabilisierenden und vor Degradation schützenden Protein HuR verantwortlich sind. Ebenso sind dabei die Bindungenstellen von hnRNP C und hnRNP I (PTB) betroffen, so dass zusätzlich auch der Verlust an Bindungsstellen für zelluläre Kofaktoren der HCV Replikation und Translation zu der effizienten Inhibition führt. SiHCV3'X(-) hingegen zeigte eine vergleichsweise moderate Wirkung und reduzierte den HCV RNA Level um etwa 25 %. Obwohl theoretisch auch der HCV Plusstrang durch siHCV3'X(-) gespalten werden kann, scheint die gezeigte Wirkung aber ausnahmslos auf der Spaltung der HCV 3'UTR des HCV Minusstrang-Intermediates zu beruhen, da der HCV Protein Level überhaupt nicht beeinträchtigt werden konnte. Eine Spaltung des HCV

Plusstranges würde sich vermutlich auch inhibierend auf die Translation des Polyproteins auswirken. Die Tatsache, dass auch bei unverändertem HCV Protein Level wenigstens der HCV RNA Level durch siHCV3'X(-) um immerhin 25% reduziert werden konnte, lässt zumindest schlussfolgern, dass die shRNA nicht unwirksam ist. Die geringe Wirkung auf die Replikation zeigt, dass die Abspaltung der terminalen Sequenzen in der HCV 3'UTR durch RNAi die Bindung von modulierenden HCV Kofaktoren des Replikationszyklus in stem loop III höchstens geschwächt, nicht aber vollkommen aufgehoben haben kann.

6.3 RNA Interferenz gegen zelluläre HCV Kofaktoren

HCV RNA-gerichtete RNA Interferenz inhibierte die subgenomische HCV Replikation und Protein Translation signifikant, dennoch ist der Einsatz HCV RNA-gerichteter siRNAs nicht ganz unproblematisch. Sekundärstrukturen und IRES-Protein-Interaktionen können zum einen den Zugang für siRNAs verhindern und zum anderen bestehen trotz hoher Konservierung der HCV 5'UTR unter den verschiedenen HCV Geno- und Subtypen beträchtliche genetische Sequenzunterschiede. So kann es auch in diesem Bereich durch die hohe Fehlerrate und der gleichzeitig ungenauen „Proofreading-Aktivität“ der RNA-abhängigen RNA-Polymerase zu Mutationen während der Replikation kommen, die dann der sequenzspezifischen RNA Interferenz entgehen, da bereits ein einzelner „Basen-mismatch“ zur Aufhebung der siRNA-Funktion führen kann.

Zelluläre Proteine, die essentiell für die HCV Replikation und Translation sind, können als alternative Ziele für RNA Interferenz gewählt werden, da Nachteile wie Sekundärstrukturen und Mutationen weitgehend ausgeschlossen werden können. Die durch Plasmid-vermittelte Expression der Gene in Sense- und Antisense-Orientierung identifizierten potentiellen Kofaktoren der subgenomischen HCV Replikation und Translation (s.6.1) wurden jetzt durch die im Vergleich zur Antisense Blockierung effektivere Methode der RNA Interferenz [130] mit dem Ziel inhibiert, dadurch eine Verstärkung des inhibitorischen Effektes auf den HCV Replikationszyklus zu detektieren. Im Falle einer signifikanten Inhibition des subgenomischen HCV Replikationszyklus durch HCV Kofaktor-gerichtete RNA Interferenz könnte RNAi gegen Kofaktoren ein alternativer Ansatz für antivirale Strategien werden und möglicherweise in Kombination mit direkter HCV-gerichteter RNAi die Entstehung von Escape-Varianten minimieren.

6.3.1 PTB ist essentiell für die subgenomische HCV IRES-vermittelte Translation

Die Funktion von PTB als Kofaktor bei der HCV Replikation und Translation wurde schon einige Male kontrovers diskutiert [107, 108, 109, 110] und ebenso zeigt sich beim Vergleich der Plasmid-basierten Expression von PTB in Sense- und Antisense-Orientierung im Luciferase Test eine andere Funktionalität als in den Replikonzellen für den HCV Replikationszyklus. Diese Tatsache lässt auf einen komplexen Zusammenhang zwischen PTB und seinen essentiellen Bindungsstellen, von denen einige im Luciferase Konstrukt nicht vorhanden sind, schließen. Ebenso könnten Interaktionen zwischen PTB und anderen HCV Kofaktoren ebenso eine Auswirkung auf die Funktion von PTB zeigen. Nachdem gezeigt wurde, dass die Inhibition von PTB durch Antisense RNA indirekt auch zu einer Reduzierung von HCV RNA und HCV NS5B führte, sollte PTB durch shRNAs, die gegen diverse Zielsequenzen gerichtet sind, noch effizienter inhibiert werden .

Die effektivsten PTB-gerichteten shRNAs, siPTB148 und siPTB352 reduzierten den PTB RNA und Proteinlevel um etwa 50%. Diese Halbierung des PTB Protein Levels führte letztendlich zu einer Inhibition der HCV IRES-vermittelten Translation bis zu 60%. Dieses Ergebnis zeigt, dass PTB eine besondere Bedeutung als potentieller Kofaktor für den HCV Replikationszyklus hat und dieses vermutlich auch in den zahlreichen Bindungsstellen für Interaktionen mit dem HCV Genom begründet liegt. Die Inhibition von PTB führte zu einer signifikanten Reduzierung ($p \leq 0.004$) des HCV Protein Levels, die subgenomische Replikation war von der RNA Interferenz im Vergleich zur Translation weniger betroffen. Dies kann bedeuten, dass entweder PTB an der HCV-Replikation grundsätzlich nur geringfügig beteiligt ist, oder das nach Inhibition von PTB durch RNA Interferenz, Funktionen durch andere HCV Kofaktoren, z.B. HuR, kompensiert werden. So wurden Funktionen der Stabilisierung der RNA neben PTB auch HuR zugesprochen.

Im Luciferase Reportersystem konnte die Bedeutung von PTB als Kofaktor der HCV IRES-vermittelten Translation nochmals bestätigt werden, die Luciferase Aktivität verminderte sich nach Transfektion von PTB-gerichteten shRNAs um bis zu 30%, bei siPTB352 sogar bis 45%. Unterschiede in der Inhibition der Luciferase Aktivität und der HCV Replikon Translation liegen, wie schon vermutet, höchstwahrscheinlich an mehreren Faktoren. Zum einen ist das Replikonsystem, das aus mehreren HCV Komponenten besteht, wesentlich komplexer und zum anderen könnte es auch an der Inkubationsdauer nach der Transfektion liegen, da die Replikonzellen nach fünf Tagen und Luciferase-transfizierte Zellen im Gegensatz dazu nach drei Tagen untersucht wurden. Dies war nötig aufgrund der Tatsache, dass die Aktivität der Luciferase beginnend ab ihrem Maximum nach etwa 48

Stunden rapide abnimmt. Bei zwei Tagen Inkubation kann möglicherweise die Halbwertszeit von PTB auch für die vergleichsweise geringere Inhibition im Luciferasesystem verantwortlich sein, da die Translation der Luciferase durch PTB-shRNAs nur indirekt supprimiert werden kann.

6.3.2 PSMA7 moduliert die subgenomische HCV Replikation und Translation

Die Untersuchungen von HuH-7 Zellen, die mit PSMA7-exprimierenden Plasmiden in Sense- und in Antisense-Orientierung transfiziert wurden, offenbarte eine Beeinflussung der HCV IRES-vermittelten Translation eines co-transfizierten Luciferase Reporters als auch der subgenomischen HCV Translation in den HCV Replikonzellen durch PSMA7. Gleichzeitig wurde durch Inhibition von PSMA7 durch Antisense-exprimierende Plasmide auch die HCV Replikation entscheidend inhibiert. Demgegenüber steht die Erhöhung der HCV Replikation und Translation durch Überexpression von PSMA7 RNA, so dass die Ergebnisse auf eine Modulation des HCV Replikationszyklus durch PSMA7 hinweisen.

Eine weitere Charakterisierung der Funktion als Kofaktor der HCV Replikation sollte dann durch RNA Interferenz gegen die PSMA7 RNA gezeigt werden. Vier gegen PSMA7-gerichtete plasmid-basierende shRNAs reduzierten den PSMA7 RNA und Protein Level nach transienter Transfektion und fünf Tagen Inkubation um etwa 50%. Die RNA und Protein Level konnten auch bei PSMA7 nicht mehr als halbiert werden, was möglicherweise wieder an der Protein-Halbwertszeit aber vielleicht auch an einer nicht optimalen Wahl der Zielsequenzen liegen könnte. Nichtsdestotrotz zeigte sich durch Inhibition von PSMA7 um 50% eine indirekte Wirkung, bzw. Suppression der HCV Replikation und Translation um ebenfalls 50% ($p \leq 0.004$). Dies bestätigte die in den Antisense-Untersuchungen gezeigten Resultate nochmals, dass PSMA7 vermutlich ein wichtiger zellulärer Kofaktor der subgenomischen HCV Replikation und Translation ist.

6.3.3 RNAi gegen HuR

Die stabilisierende Funktion von Human antigen R (HuR) für die HCV Replikation und Translation wurde schon mehrmals beschrieben[114, 117]. Die Beobachtungen in den Western und Northern Blot Analysen durch Plasmid-basierte Hur Expression in Sense- und Antisense-Orientierung konnten diese bisherigen Erkenntnisse nochmals bestätigen. Jetzt

wurden vier Zielsequenzen zum Design von shRNAs für die effiziente Inhibition der HuR Genexpression ausgesucht. Da neben HuR noch einige andere zelluläre Proteine an der HCV 3'UTR binden und stabilisierende sowie unterstützende Funktionen bei der HCV Replikation und Translation erfüllen, könnte es trotzdem möglich sein, dass die RNAi-bedingte Suppression von HuR durch andere Proteine kompensiert werden kann. So sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß der Replikationszyklus von HCV durch RNA Interferenz gegen HuR inhibiert werden kann. Sollte durch Inhibition der HuR-Genexpression der HCV RNA und NS5B Protein Level deutlich vermindert werden, ließe dies auf eine Funktion von HuR als HCV Kofaktor schließen. Durch Transfektion des HuR Antisense-Plasmids in HuH-7 Replikonzellen konnte die Verminderung des NS5B Protein Levels schon bestätigt werden.

Nach Transfektion der HuR-gerichteten shRNAs in die Replikonzellen und fünftägiger Inkubation konnte eine Inhibition der HuR Protein Konzentration um 50% durch siHuR151 beobachtet werden. Drei andere HuR-gerichtete shRNAs waren insgesamt gesehen ineffizienter und verringerten den HuR Level um nicht mehr als 30%. Die Suppression von HuR führte schließlich zu einer signifikanten Inhibition der subgenomische HCV IRES-vermittelten Translation um 40%. Einen größeren Effekt zeigte die Inhibition von HuR auf den HCV RNA Level, der im Vergleich zur siEGFP-Kontrolle sogar um 60% ($p \leq 0.004$) reduziert wurde.

Human antigen R bindet an destabilisierende AUUUA-Motive in zellulären mRNAs und verhindert deren Degradation. So ist HuR in erster Linie für die Stabilisierung der HCV RNA und deren Schutz vor Abbau durch zelluläre Nukleasen zuständig. Durch den verminderten HuR Level in der Zelle ist die HCV RNA vermutlich schneller degradiert worden als normal und kann dadurch natürlich auch einen reduzierenden Effekt auf die HCV Protein Translation haben. Durch die Untersuchungen konnte verdeutlicht werden, dass HuR als potentieller HCV Kofaktor eine essentielle Bedeutung für den HCV Replikationszyklus besitzt.

6.4 Synergistische Wirkung durch Kombination von HCV RNA-gerichteten Strategien

Die Ergebnisse der direkten (HCV RNA-gerichtet) und indirekten (HCV Kofaktor-gerichtet) RNA Interferenz gegen die Hepatitis C Virus RNA zeigt, dass siRNAs wirkungsvolle und geeignete Mittel zur Inhibition des Hepatitis C Virus Replikationszyklus sind. Allerdings können auch hier die Möglichkeiten in gewisser Hinsicht durch komplexe

Sekundärstrukturen der Ziel RNA begrenzt sein. Ebenso können Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und RNA der siRNA den Zugang zur Zielsequenz verwehren und die siRNA ineffizient erscheinen lassen. Neben diesen Limitierungen kommt beim Hepatitis C Virus zusätzlich noch die hohe Mutationsfähigkeit, verursacht durch die hohe Fehlerrate und gleichzeitig ungenaue „Proofreading Aktivität“ der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, dazu. Die genannten Punkte machen auch den Einsatz von RNA Interferenz schwierig. Diese Probleme könnten überwunden werden, wenn RNA Interferenz gegen mehrere Ziele gerichtet ist und so der inhibitorische Effekt von RNAi während des HCV Replikationszyklus verstärkt werden würde und zweitens das Entstehen von Mutationen im Bereich der siRNA Sequenz durch das zweite avisierte Ziel kompensiert wird. Die Vermeidung von HCV Quasispezies durch eine duale Strategie ist vor allem in Bezug auf mögliche therapeutische Anwendungen in der Zukunft von großer Bedeutung.

6.4.1 Synergistische inhibitorische Effekte von shRNA Kombinationen auf die IRES-vermittelte Translation eines Luciferase Reporters

Verschiedene Kombinationen von HCV RNA- und HCV Kofaktor-gerichteten shRNAs sollten dahingehend untersucht werden, ob der inhibitorische Effekt einzelner shRNAs zusätzlich verstärkt werden kann. So wurden zuerst die in den bisherigen Untersuchungen effektivsten shRNAs (siHCV207, siHCV3'X, siHuR151, siPSMA7-639, siPTB148) in Luciferase Untersuchungen miteinander kombiniert und mit einzeln transfizierten shRNAs in deren Wirkung miteinander verglichen. Die Beobachtungen zeigten, dass in dem Luciferase Reportersystem zwei Kombinationen eine wesentliche Verstärkung des inhibitorischen Effektes mit sich brachten: **I. siHCV207/siHCV3'X** und **II. siHCV3'X/siHuR151**.

Bei Kombination I ist das Ergebnis nicht überraschend, da diese Kombination zwei wichtige essentielle Bereiche, die HCV 5'UTR und 3'UTR, der HCV IRES-vermittelten Translation gleichzeitig und auch direkt durch RNAi spaltet. Kombination II hingegen setzt sich aus direkter und indirekter RNAi gegen HCV zusammen. Die Inhibition des RNA-Bindungsprotein HuR zusammen mit der zusätzlich das HCV 3'UTR angreifenden siHCV3'X scheinen die HCV RNA noch effizienter zu destabilisieren.

Die Beobachtung, dass mehrere andere Kombinationen nicht zu einer Verstärkung des inhibitorischen Effekts führen, lässt sich wahrscheinlich auf verschiedene Faktoren zurückführen. Im Luciferase Reportersystem wird bei Kombination mit PTB-gerichteten shRNAs vermutlich durch das Fehlen einiger in der HCV RNA vorhandener PTB-

Bindungsstellen die Inhibition von PTB nicht die Auswirkung haben, wie in den subgenomischen Replikonzellen und deshalb auch nicht zu einer wesentlichen Beeinträchtigung der HCV IRES-vermittelten Luciferase Translation führen. Ein weiterer Faktor könnte die in den Luciferase Untersuchungen kurzen Inkubationszeiten (2-3 Tage) sein, die die Halbwertszeit der Proteine nicht berücksichtigt. Längere Inkubationszeiten sind allerdings im Luciferasesystem nicht sinnvoll, da die Luciferase Aktivität am zweiten Tag nach der Transfektion ihr Maximum hat und kontinuierlich bis zum fünften Tag signifikant wieder absinkt (Daten nicht gezeigt).

6.4.2 Inhibition der subgenomischen HCV Replikation und Translation durch Kombination von shRNAs

Die in den Luciferase Reportersystemen untersuchten shRNA-Kombinationen wurden anschließend in dem weit komplexeren HCV Replikonsystem getestet. Kombinationen wurden im Northern und Western Blot auf RNA und Protein Expression überprüft, wobei die im Northern Blot detektierten RNA Level dabei meistens mit dem Protein Level im Western Blot korrelierten. Dabei konnte die synergistische Effektivität bei zwei shRNA-Kombinationen bestätigt werden, die eine weitere Reduktion der RNA und Protein Expression um immerhin 10% zeigten: **I. siHCV207/siHCV3'X** und **II. siHCV3'X/siHuR151**.

Die Bestätigung der Ergebnisse im Luciferase Reportersystem durch Ergebnisse in den subgenomischen HCV Replikonzellen unterstreicht deren Aussagekräftigkeit. RNA Interferenz durch shRNA-Kombinationen, die direkt gegen die regulatorischen hochkonservierten 5' und 3' Regionen des HCV gerichtet ist, erhöhte den inhibitorischen Effekt auf den HCV Replikationszyklus. Ebenso führte die Destabilisierung der HCV 3'UTR durch RNAi mittels Kombination von direkter 3'UTR-gerichteter shRNA und über HuR indirekt 3'UTR-gerichteter shRNA zu einer Verstärkung des inhibitorischen Effektes. Auffallend war dabei die Effizienz im Luciferase Reportersystem verglichen mit dem HCV Replikonsystem, die durch HCV Kofaktor-gerichtete shRNA-Kombinationen beobachtet wurde. Während in den Luciferase Untersuchungen kaum Effekte durch Kombination von HCV Kofaktor-shRNAs zu detektieren waren, zeigten diese im Replikonsystem in Northern und Western Blot Analysen zum Teil deutliche Verstärkungen des inhibitorischen Effektes auf die subgenomische HCV Replikation und Translation. PSMA7-, bzw. HuR-gerichtete RNA Interferenz inhibierte die HCV Replikation und Translation um 30-40%, durch Kombination von siPSMA7 und siHuR zeigte sich eine weitere additive Verstärkung des inhibitorischen

Effektes auf HCV um etwa 30% auf insgesamt 60-70% Reduktion. Die Tatsache, dass zwei blockierte Kofaktoren einen additiv inhibitorischen Effekt auf den HCV Replikationszyklus ausüben, bestätigt die essentielle Bedeutung der zellulären Proteine für HCV. Ähnliche Ergebnisse konnten für die Kombination von PTB/HuR- und PTB/PSMA7-gerichteten shRNAs gezeigt werden. Eine Erklärung ist möglicherweise, dass die Inhibition zweier HCV Kofaktoren nicht mehr kompensiert werden kann. Zusammenfassend gesagt, kann HCV Kofaktor-gerichtete RNA Interferenz als Kombination mit anderen Kofaktor-gerichteten oder mit effizienten HCV UTR-gerichteten shRNAs ein wirkungsvoller Mechanismus für neue antivirale Kombinationstherapien sein.

6.4.3 Kombination aus RNA Interferenz und Ribozym-vermittelter Spaltung

Durch die Anwendung von shRNA Kombinationen ist ein Weg aufgezeigt worden, die inhibitorische Wirkung von RNA Interferenz auf den HCV Replikationszyklus im Vergleich zu einzeln transfizierten shRNAs durch synergistische oder additive Wirkung zu verstärken. Dabei wurde letztendlich der gleiche Mechanismus genutzt, RNAi durch den *RNA-Induced Silencing Complex*, um zwei unterschiedliche Zielsequenzen aus einer Reihe von mehreren möglichen Zielen (HCV 5'UTR, HCV 3'UTR, HuR, PSMA7, PTB) gleichzeitig durch small hairpin RNAs zu spalten. Die Wirkung einzelner small hairpin RNAs auf die subgenomische HCV Replikation sowie Translation konnte mittels bestimmter Kombinationen von shRNAs geringfügig bis additiv verstärkt werden.

Zusätzlich zur Kombination verschiedener Zielsequenzen des Hepatitis C Virus Genoms wurde dann der Wirkungsmechanismus kombiniert. Die Nutzung verschiedener Mechanismen, nämlich zum einen die RNA Interferenz und zum anderen die Ribozym-vermittelte Spaltung, könnte die Kapazitäten der Zelle noch besser nutzen und die inhibitorische Wirkung auf den HCV Replikationszyklus verstärken. Ein Beispiel der effizienteren Wirkung durch Kombination verschiedener Mechanismen in der Praxis ist die Kombinationstherapie des Cytokins Interferon α mit dem Nukleosidanalogen Ribavirin, mit der die Heilungschancen für HCV-infizierte Patienten im Vergleich zu früheren Monotherapien wesentlich gestiegen sind.

HCV- und HCV Kofaktor-gerichtete small hairpin RNAs wurden mit den Ribozymen tRz323-CTE (Anti-HCV-5'UTR) und tRz9543-CTE (Anti-HCV-3'UTR) unterschiedlich kombiniert und im Luciferase System auf Inhibition der HCV IRES-vermittelten Translation untersucht.

Der inhibitorische Effekt einzelner shRNAs und Ribozyme konnte durch Kombination von shRNAs mit Ribozymen signifikant ($p \leq 0.004$) verstärkt werden. Beide Ribozyme, das HCV 5'UTR-gerichtete tRz323-CTE, beziehungsweise das HCV 3'UTR-gerichtete tRz9543-CTE, zeigten in Kombination mit siHCV156 bzw. siHCV207 synergistische Effekte und inhibierten verstärkt die IRES-vermittelte Translation der Firefly Luciferase im Vergleich zu einzeln transfizierten shRNAs und Ribozymen. Bei weiteren Untersuchungen wurden Effizienz steigernde Kombinationen detektiert, bei denen tRz323-CTE und tRz9543-CTE synergistische Effekte mit jeweils unterschiedlichen shRNAs zeigten. tRz9543-CTE (HCV 3'UTR-gerichtet) zeigte starke inhibitorische Effekte mit siHCV3'X und siHuR151, die ebenfalls beide, direkt sowie indirekt über HuR, gegen die HCV 3'UTR gerichtet sind. Das unterstützt die Vermutung, wie bei der shRNA-Kombination siHCV3'X-siHuR151, dass es durch duale Strategien gegen die HCV 3'UTR zur Destabilisierung und Degradierung der HCV RNA kommt. Moderate synergistische Effekte konnten bei tRz9543-CTE mit siPSMA7-639 und siPTB148 beobachtet werden. Bei tRz323-CTE konnte mit keiner der HCV Kofaktor-gerichteten shRNAs ein synergistischer Effekt im Luciferase System gezeigt werden. Die effektivsten Kombinationen zwischen shRNAs und Ribozymen wurden ausgewählt, um die gezeigten Effekte im Luciferase System auch in den subgenomischen HCV Replikonzellen zu überprüfen. Nach Transfektion der Kombinationen in die HuH-7 Replikonzellen, wurden der HCV RNA und NS5B Protein Level im Northern und Western Blot überprüft. Der HCV RNA Level konnte, im Vergleich zu einzeln transfizierten shRNAs oder Ribozymen, durch Kombination von tRz9543 mit siHCV156/207/3'X um weitere 25% vermindert werden und sank dadurch z.B. bei siHCV207-tRz9543-CTE auf 10% des Kontrollwertes.

Die Ergebnisse bestätigten, dass die Kombination verschiedener Zielsequenzen innerhalb der HCV RNA als auch die Kombination verschiedener RNA-gerichteter Strategien zu einer weiteren Verstärkung des inhibitorischen Effektes auf den HCV Replikationszyklus führt.

6.4.4 Wirkung durch Kombination von U6-Promoter und tRNA^{Val}-Promoter

Da durch Kombination von Ribozym-vermittelter Spaltung und RNA Interferenz eine deutliche Verstärkung des inhibitorischen Effektes auf den HCV Replikationszyklus um durchschnittlich 25% gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt in erster Linie auf die Nutzung der zwei unterschiedlichen HCV RNA-gerichteten Wirkungs-

mechanismen beruht oder ob die Nutzung der verschiedenen Promoter ursächlich an dem gezeigten Effekt sein könnte.

Alle bisher untersuchten shRNAs wurden unter der Kontrolle des U6-Promoters und alle Ribozyme unter der Kontrolle des tRNA^{Val}-Promoters exprimiert. Für einen Vergleich sollten entweder shRNAs zusätzlich hinter den tRNA^{Val}-Promoter oder Ribozyme hinter den U6 Promoter kloniert werden. Die erste Methode ist aufgrund der Möglichkeit, dass der RISC die durch den langen tRNA^{Val} Bereich veränderte shRNA nicht mehr als *small interfering RNA* erkennt, nicht praktikabel. Folglich wurden einige Ribozyme in den Vektor pSuppressorRetro hinter den U6 Promoter kloniert (Dissertation von Dominik Jarczak) und Kombinationen von U6- und tRNA^{Val}-Promoter-gesteuerten Ribozymen in die HCV Replikonzellen transfiziert und im Western Blot auf HCV NS5B Expression überprüft. Dabei wurden zwei Ribozyme, nämlich das HCV 5'UTR-gerichtete Rz323-CTE und das HCV 3'UTR-gerichtete Rz9543 miteinander in Plasmiden mit verschiedenen Promoter kombiniert. Es sollte kein Unterschied des inhibitorischen Effektes auf HCV im Vergleich zur Kontrolle zu sehen sein, es sei denn, die Nutzung zweier verschiedener Promoter wäre dabei entscheidend.

Die Ergebnisse zeigten dann, dass der HCV NS5B Level durch Kombination von Rz323-CTE und Rz9543-CTE hinter dem gleichen Promoter (U6 oder tRNA^{Val}) eine Verminderung der HCV IRES-vermittelten Translation von etwa 40% erreicht werden konnte. Da einzeln transfizierte Rz323-CTE und Rz9543-CTE eine demgegenüber geringere Reduktion der HCV Proteinexpression von 30% zeigten, ist durch die Kombination von Ribozymen in gleichen Promoter eine moderate Verstärkung des inhibitorischen Effektes um 10% detektiert worden. Die Verbesserung der Effekte um 10% entsprach auch in etwa den Ergebnissen, die mit einigen shRNA Kombinationen (z.B. siHCV207/siHCV3'X) erreicht wurden.

Die Kombination von U6- und tRNA^{Val}-Promoter, uRz323-CTE-tRz9543-CTE, bestätigte dann die Vermutung, dass zumindest ein Teil des deutlich verstärkten inhibitorischen Effektes auf HCV auf die Verwendung verschiedener Systeme zurückzuführen ist. Der HCV NS5B Level konnte bei Kombination verschiedener Promotersysteme um 60% reduziert werden, was eine Verbesserung des inhibitorischen Effektes um etwa 20% bedeutete. Die Verwendung mehrerer Systeme scheint vorteilhaft zu sein, da dieses auch die bessere Nutzung von Kapazitäten der Zelle einschließt und eventuell die Möglichkeiten der Limitierung von Faktoren (z.B. RISC, Transkriptionsfaktoren) minimiert werden.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass durch Kombination verschiedener Wirkungsmechanismen, RNA Interferenz und Ribozym-vermittelte Spaltung, und zusätzlich der Verwendung unterschiedlicher Systeme, U6- und tRNA^{Val} Promoter, die inhibitorischen Effekte auf den HCV Replikationszyklus noch wesentlich gesteigert werden konnten.

6.5 Untersuchung des Zellzyklus und der Induktion von Interferon in shRNA-transfizierten Replikonzellen

Die Transfektion von Expressionsplasmiden, Ribozymen und small interfering RNAs in die humane Hepatozytenzelllinie HuH-7 könnte unter Umständen durch eine Vielzahl von Gründen zu einer Veränderung charakteristischer biologischer Eigenschaften der Zellen führen. Um zu bestätigen, dass der HCV RNA und NS5B Protein Level aufgrund von spezifischen, RNA-gerichteten Strategien vermindert wurde und nicht z.B. durch verminderte Zellproliferation oder der Ausschüttung von Interferon gehemmt wurde, mussten deshalb diese Möglichkeiten unspezifischer Inhibitionen überprüft werden.

Man kann nicht ganz ausschließen, dass die Ribozyme oder shRNAs eventuell neben den gewollten Zielsequenzen auch andere Gene zufällig ausschalten könnte. SiRNAs könnten unter Umständen auch im Fall von Mismatch-Basenpaaren als microRNA (miRNA) fungieren und die Translation anderer Gene durch partielle Bindung regulieren. Dabei könnten wichtige Faktoren inhibiert werden, durch die dann der Zellzyklus verändert werden könnte. Ein veränderter Zellzyklus könnte eventuell zur Veränderung der subgenomischen HCV Replikation und Translation und damit zu falschen Interpretationen führen. Neben der zufälligen unbeabsichtigten Ausschaltung von Genen könnte darüber hinaus auch die beabsichtigte Inhibition von PSMA7, HuR und PTB durch shRNAs zu Fehlfunktionen innerhalb der Zelle führen, da die Funktion der einzelnen Gene noch nicht abschließend geklärt ist.

Zellen durchleben einen Zellzyklus, der verschiedene Phasen impliziert und letztendlich mit der mitotischen Teilung und der Verdoppelung der Zelle endet, um dann wieder einen neuen Zellzyklus zu durchlaufen. Der sogenannten Ruhephase sich nicht teilender Zellen, die G₀/G₁-Phase (Chromosomensatz=2n), folgt die Synthesephase S (2n+) und zuletzt die G₂/M-Phase (4n). Diese Phasen können durch die DNA-interkalierende Propidiumiodid-Färbung im FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) anhand der DNA-Menge innerhalb der Zelle sichtbar gemacht werden. Im Normalfall ergibt sich ein hoher Peak für die G₀/G₁-Phase, da es sich um eine lange Phase handelt, in der sich dementsprechend

viele Zellen befinden. Es folgt die breite Phase mit sich in DNA-Synthese befindlichen Zellen und zum Schluss ein kleiner Peak der G₂/M-Phase, hierbei handelt es sich um eine kurze mitotische Phase des Zellzyklus mit entsprechend wenigen Zellen. Der Zellzyklus aller shRNAs und Ribozyme wurde nach Transfektion in HuH-7 Zellen im FACS überprüft und es konnte, mit Ausnahme von siPTB352, keine Veränderung der Proliferation beobachtet werden. Bei siPTB352 allerdings wurde ein wesentlich erhöhter zweiter Peak erkannt, der zu einer prägnanten Verschiebung der prozentualen Phasenverteilung führte. Hierbei wurde durch siPTB352 ein G₂/M-Arrest der Zellen detektiert. Die Zellen waren nicht in der Lage, die Mitose fehlerfrei zu durchlaufen und sich wieder in zwei Zellen zu teilen. Darüber hinaus konnten verhältnismäßig viele apoptotische Zellen detektiert werden, was auf eine erhebliche Störung der biologischen Eigenschaften durch siPTB352 schließen lässt. Die Frage nach der Ursache für diesen G₂/M-Arrest ist, wurde in dieser Arbeit nicht geklärt, jedoch kann ausgeschlossen werden, dass die Inhibition von PTB der Auslöser ist. Wenn dies der Fall gewesen wäre, dann hätten auch die anderen gegen PTB gerichteten shRNAs ansatzweise einen G₂/M-Arrest erzeugen müssen. Da dies nicht der Fall war, wäre es möglich, dass siPTB352 die mRNA eines anderen essentiellen zellulären Proteins des Zellstoffwechsels ausschaltet. Ein nochmaliges Suchen der Sequenz von siPTB352 in Gendatenbanken brachte allerdings auch keine neue Erkenntnis, so dass die Ursache nicht gefunden werden konnte. Da siPTB352 den Zellzyklus erheblich beeinträchtigt hat, müssen die Ergebnisse der PTB und HCV RNA/Protein Expression durch siPTB352 angezweifelt werden.

Die Induktion von Interferon durch die Zelle wird im Normalfall von dsRNA ausgelöst und ist für die Zelle evolutionär gesehen ein Zeichen einer Virusinfektion. Jedoch wurde auch schon nach Transfektion von shRNA-exprimierenden Plasmiden in Zellen in einzelnen Fällen die Induktion von Interferon nachgewiesen [131]. Interferon löst den JAK-Stat-Signaltransduktionsweg aus und führt zu einer kaskadenartigen Induktion weiterer Interferon-Gene. Da HCV Interferon-sensitiv ist, wirkt sich das sofort auf den HCV RNA Level durch Degradation aus. So musste auf jeden Fall ausgeschlossen werden, dass Interferon an der Reduktion des RNA und Protein Levels beteiligt ist. Der durch Interferon aktivierte Transkriptionsfaktor Stat1 ist im Nukleus an der Transkription von weiteren Interferon-Genen beteiligt und kann deshalb als Indikator für die Detektion einer potentiellen Interferonantwort genutzt werden.

Interferone sind Cytokine, die von Zellen, Fibroblasten und T-Lymphozyten nach einer Infektion mit Viren und Bakterien gebildet werden und immunmodulatorische, antivirale und antiproliferative Wirkung haben. Im Falle der Induzierung von Interferon

kommt es zur Bindung der Cytokine Interferon α und β an ihre Rezeptoren IFNAR1 und IFNAR2, die dimerisieren und die Aktivierung der Tyrosinkinase JAK1 (*Janus-Kinase1*) und Tyk2 (*Tyrosin-Kinase2*) durch Tyrosin-Phosphorylierung auslösen. Die aktivierten Kinasen JAK1 und Tyk2 phosphorylieren Stat1 und Stat2 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), was zu Stat1/2-Heterodimeren führt, die mit p48 als ISGF3-Transkriptionskomplex (*Interferon Stimulating Gene Factor*) in den Zellkern transportiert werden und dort zur Genaktivierung an die spezifischen ISRE-Sequenzen (*Interferon Stimulated Response Element*) binden und die weitere Interferon α/β -Ausschüttung induzieren [132].

Ebenso wird die Bildung von Interferonen durch doppelsträngige RNA (≥ 30 bp) ausgelöst, wodurch eine generelle Degradierung aller mRNAs in der Zelle ausgelöst wird. Obwohl dieser Mechanismus durch die 19-23 bp-großen siRNAs theoretisch nicht ausgelöst werden sollte, wurde dieser Effekt schon bei einigen plasmid-basierten shRNAs nachgewiesen [131]. Für die Aussagekraft der gezeigten Ergebnisse musste deshalb der Interferonstatus der Zelle nach der Transfektion der HuH-7 Replikon-Zellen mit shRNAs, Ribozymen und Antisense-Konstrukten geprüft werden. So wurden deshalb Kernextrakte von shRNA- und Ribozym-transfizierten HuH-7 Replikonzellen im Western Blot auf Expression des Stat1-Proteins überprüft, um dadurch eine Beteiligung von Interferon bei der Verminderung von HCV RNA und Protein durch RNA-gerichtete Moleküle auszuschließen.

Die biologischen Eigenschaften der Zelle scheinen, außer durch siPTB352, nicht beeinträchtigt worden zu sein, da weder eine Veränderung des Zellzyklus beobachtet werden konnte, noch eine Interferonantwort nach Transfektion von Ribozymen, cDNA-Expressionsplasmiden und shRNAs ausgelöst wurde.

6.6 Generierung eines HCV IRES tCD4 Expressionssystems

RNA Interferenz ist durch die inhibitorische Potenz ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung eines neuartigen therapeutischen Mittels gegen das Hepatitis C Virus. Dabei würden sich als Zielsequenz der RNA Interferenz die hoch konservierten 5' und 3' Regionen von HCV gut eignen, da sie sich unter den verschiedenen Genotypen wenig unterscheiden. Die Schwierigkeit in der Entwicklung liegt dabei in der Wahl einer geeigneten Zielsequenz, da sich nicht alle *small interfering RNAs* als funktionell aktiv erweisen. So sollte ein Expressionssystem entwickelt werden, mit dem plasmid-exprimierte shRNAs aus einer

siRNA Bibliothek identifiziert werden können, die die HCV IRES-vermittelte Translation effizient inhibieren können.

Dabei könnte das System des *Magnetic Cell Sorting* (MACS) durch tCD4-positive Zellen genutzt werden. Ein auf der Zelloberfläche exprimierter verkürzter CD4-Rezeptor (tCD4) kann durch Bindung von CD4-Antikörpern, die mit magnetischen Microbeads markiert sind, an magnetisierte Säulen gebunden werden und selektiv von Zellen, die diesen tCD4-Rezeptor nicht exprimieren, getrennt werden. Der tCD4-Rezeptor sollte dabei HCV IRES-abhängig exprimiert werden und terminal vom 3'UTR begrenzt werden. Zusätzlich wurde das HCV Core Protein noch mit in den Leserahmen kloniert. Das Konstrukt *HCV IRES-Core-tCD4-3'UTR* sollte dann als stabile Zelllinie etabliert werden. Die Transfektion einer siRNA Bibliothek in die stabile Zelllinie würde dann bei effizienten HCV-gerichteten siRNAs zu einer Inhibition der HCV IRES-vermittelten tCD4 Expression führen, so dass diese Zellen dann keinen Rezeptor auf der Oberfläche mehr exprimieren. Diese Zellen könnten nach Inkubation mit den tCD4-Antikörpern durch fehlende Bindung nicht mehr an magnetischen Säulen gehalten werden und könnten dann nach Durchfluss und weiterer Kultivierung auf Expression von siRNAs analysiert werden.

So wurde zuerst ein bicistronisches Reporterkonstrukt erstellt, das aus Renilla Luciferase und drei verschiedenen tCD4 Konstrukten mit HCV IRES und Core bestand. Da keines dieser drei Plasmide nach tCD4 Antikörper-Staining im Mikroskop eine Fluoreszenz zeigte, wurde davon ausgegangen, dass das Core Protein die Expression vom tCD4-Rezeptor stören könnte und es wurde noch ein viertes Konstrukt ohne Core erstellt. Auch dieses Konstrukt, pR5'tCD4, zeigte keine Fluoreszenz. Für eine spätere stabile Selektion wurde dann die Renilla Luciferase gegen das Hygromycin Resistenzgen ausgetauscht, wobei dann nach dem Austausch im Antikörper-Staining eine ganz schwache Fluoreszenz zu detektieren war. So war dann klar, dass durch die falsche Zusammensetzung des Konstruktes die Fluoreszenz verhindert wurde. Nach Klonierung einiger unterschiedlicher Konstrukte wurde das dem Konstrukt vorgeschaltete Hygromycingen als das die HCV IRES-vermittelte Translation störende Element ausgemacht und die Konstrukte in pcDNA3.1(+)-hygro umkloniert. Nach Feststellung der deutlichen Fluoreszenz wurden die Konstrukte stabil in HuH-7 Zellen transfiziert und die fluoreszierende Aktivität erneut nachgewiesen.

6.6.1 Untersuchung zur Funktionalität des HCV IRES-tCD4 Expressionssystem

Nach Fertigstellung der stabilen Zelllinien mit verschiedenen tCD4-Plasmiden, sollte deren Funktionalität überprüft werden. Die stabile Zelllinie HuH-7-pc5'tCD4/3'UTR (HCV IRES-tCD4-3'UTR) wurde mit der small hairpin RNA sitCD4-665, die gegen die mRNA des CD4-Rezeptors gerichtet ist, transfiziert und nach drei Tagen mittels magnetischer CD4-Antikörper über magnetisierte Säulen aufgereinigt. Die durch die Säule gelassenen Zellen wurden durch eine PCR-Reaktion auf Vorhandensein des shRNA-Plasmids überprüft. In den durch die Säule geflossenen Zellen konnte das sitCD4-exprimierende Plasmid nachgewiesen werden. Da das aber noch kein Garant für die Wirksamkeit von sitCD4-665 war, wurden die Zellen nach Transfektion mit sitCD4 auch im CD4 Antikörper-Staining überprüft und ein Fluoreszenzverlust festgestellt. Dieses Ergebnis zeigte, dass durch RNA Interferenz die Genexpression des Konstrukts theoretisch inhibiert und die verantwortliche shRNA detektiert werden könnte.

Für die Erstellung einer siRNA-Bibliothek wurde ein Primer (5'- aaa aag cgg acc gaa gtc cgc tct aga aaa a **(agct)₁₉c** agt act c **(agct)₁₉c** tcg act agt ata tgt gct gcc gaa gcg-3') hergestellt, mit dem shRNA-Bibliotheken erstellt werden können. Dieser Primer generiert in einer Polymerase Kettenreaktion zusammen mit einem Antisense Primer ein Fragment, das über Restriktionsschnittstellen in den Basisvektor pSuppressorRetro kloniert und in die stabile tCD4-exprimierende Zelllinie transfiziert wurde. Nach drei Tagen wurden die Zellen über die magnetisierten Säulen aufgereinigt und die durchgelassenen Zellen in einer PCR auf Vorhandensein von shRNA-Plasmiden überprüft. Jedoch konnte kein shRNA-Plasmid nachgewiesen werden, was bedeutet, dass keine effiziente shRNA exprimiert wurde und die durchgelassenen Zellen wahrscheinlich durch Apoptose oder spontanen Verlust des Plasmids die tCD4 Oberflächenexpression verloren haben.

Bei der Frage nach der Effizienz dieses Systems kann schon auf die Vorversuche mit sitCD4-665 verwiesen werden, die gezeigt haben, dass effiziente shRNAs, die gegen das Konstrukt gerichtet sind, durch das tCD4 Expressionssystem identifiziert werden können. Schwierig gestaltete sich dabei die Erstellung der siRNA-Bibliothek durch PCR und Klonierung, da aufgrund des shRNA-Primer-Designs eine Vielzahl von shRNAs entstehen, die durch nicht komplementäre Sense und Antisense-Bereiche des Sense-Stranges innerhalb der shRNA nicht funktionell aktiv sind. So wird in Zukunft die Erstellung von siRNA-Bibliotheken ohne Haarnadel-Loop angestrebt, wobei ein duales Vektorsystem genutzt werden soll. Dabei werden siRNAs durch einen strangaufwärts exprimierenden H1-Promoter

und einen strangabwärts exprimierenden U6 Promoter exprimiert, um dann in dem CD4 Expressionssystem effiziente siRNAs gegen HCV oder HCV Kofaktoren zu identifizieren.

7. Literaturverzeichnis

- [1] **Finestone SM, Kapikian AZ, Purcell RH.** Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness. *Science* 1973; 182:1026-1108
- [2] **Prince AM.** An antigen detected in the blood during incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 60:814-821
- [3] **Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M.** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989. 4902:359-362.
- [4] **Rizzetto M, Canese MG, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, Verme G.** Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (delta/ anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HbsAg carriers. *Gut* 1977; 18, 997-1003.
- [5] **Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, Bradley DW.** Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990; 247: 1335-1339.
- [6] **Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, Desai SM, Mushahwar IK.** Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature Medicine* 1995; 1:564-569
- [7] **Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, Koonin E, Gallagher M, Alter M, Hadziyannis S, Karayiannis P, Fung K, Nakatsuji Y, Shih JW, Young L, Piatak M Jr, Hoover C, Fernandez J, Chen S, Zou JC, Morris T, Hyams KC, Ismay S, Lifson JD, Kim JP.** Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271: 505-508.
- [8] **Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M.** A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 92-97.
- [9] **Miller RH and Purcell RH.** Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2057-2061
- [10] **Vogel W, Graziadei I, Umlauf F, Datz C, Hackl F, Allinger S, Grunewald K, Patsch J.** High-dose interferon-alpha2b treatment prevents chronicity in acute hepatitis C: a pilot study. *Dig Dis Sci* 1996; 41 (12Suppl):81S-85S.
- [11] **Poynard T, Bedossa P, Chevallier M, Mathurin P, Lemonnier C, Trepo C, Couzigou P, Payen JL, Sajus M, Costa JM.** A comparison of three interferon alpha-2b regimens for the long-term treatment of chronic non-A, non-B hepatitis. Multicenter Study Group. *N Engl J Med* 1995; 123(12):897-903.

- [12] **McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK.** Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med.* 1998; 339(21):1485-92..
- [13] **Hadziyannis SJ, Cheinquer H, Morgan T, Diago M, Jensen DM, Sette H, Ramadori G, Bodenheimer HC, Marcellin P, Lee SD, Roberts PJ, Ackrill AM.** Peginterferon alfa-2A (40KD) (Pegasys) in combination with Ribavirin (RBV): Efficacy and safety results from a phase III, randomized, double-blind, multicentre study examining effect of duration of treatment and RBV dose. *J Hepatology* 2002, 36 (1): 3.
- [14] **Major ME, Feinstone SM.** The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 6: 1527-1538.
- [15] **Tsukiyama-Kohara K, Lizuka N, Kohara M, Nomoto A.** Internal ribosome entry site within hepatitis c virus RNA. *J Virol* 1992; 66: 1476-1483.
- [16] **Ito T, Tahara SM and Lai MM.** The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J Virol* 1998; 72: 8789-8796.
- [17] **Bartenschlager R, Lohmann V.** Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000; 81 PT 7: 1631-1648.
- [18] **Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T and Koike K.** The core protein of hepatitis c virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998; 4: 1065-1067.
- [19] **Ruggieri A, Harada T, Matsuura Y and Miyamura T.** Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1997; 229: 68-76.
- [20] **Chen SY, Kao CF, Chen CM, Shih CM, Hsu MJ, Chao CH, Wang SH, You LR, Lee YH.** Mechanisms for inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by hepatitis C virus core protein *J Biol Chem* 2003; 278(1):591-607.
- [21] **Taniguchi H, Kato N, Otsuka M, Goto T, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M.** Hepatitis C virus core protein upregulates transforming growth factor-beta 1 transcription. *J Med Virol.* 2004; 72(1):52-9.
- [22] **Blight KJ, Kolykhalov AA, Reed KE, Agapov EV and Rice CM.** Molecular virology of hepatitis C virus: an update with respect to potential antiviral targets. *Antivir Ther* 1998; 3:71-81.
- [23] **Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N.** 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.* 2003 13;100(10):6104-8.

- [24] **Griffin SD, Harvey R, Clarke DS, Barclay WS, Harris M, Rowlands DJ.** A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol.* 2004 ;85(Pt 2):451-61.
- [25] **Yamaga AK, Ou JH.** Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein : *J Biol Chem.* 2002 6; 277(36):33228-34.
- [26] **Yang SS, Lai MY, Chen DS, Chen GH, Kao JH.** Mutations in the NS5A and E2-PePHD regions of hepatitis C virus genotype 1b and response to combination therapy of interferon plus ribavirin *Liver Int.* 2003; 23(6):426-33.
- [27] **Watanabe H, Nagayama K, Enomoto N, Itakura J, Tanabe Y, Sato C, Izumi N, Watanabe M** Amino acid substitutions in PKR-eIF2 phosphorylation homology domain (PePHD) of hepatitis C virus E2 protein in genotype 2a/2b and 1b in Japan and interferon efficacy. *Hepatol Res.* 2003; 26(4):268-274..
- [28] **Vyas J, Elia A, Clemens MJ.** Inhibition of the protein kinase PKR by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus genomic RNA. 2003; 9(7):858-70.
- [29] **Yang SH, Lee CG, Song MK, Sung YC.** Internal cleavage of hepatitis C virus NS3 protein is dependent on the activity of NS34A protease *Virology.* 2000, 268(1):132-40.
- [30] **Shoji I, Suzuki T, Sato M, Aizaki H, Chiba T, Matsuura Y, Miyamura T.** Internal processing of hepatitis C virus NS3 protein. *Virology.* 1999; 254(2):315-23.
- [31] **Pang PS, Jankowsky E, Planet PJ, Pyle AM.** The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO J.* 2002; 21(5):1168-76.
- [32] **Taguchi T, Nagano-Fujii M, Akutsu M, Kadoya H, Ohgimoto S, Ishido S, Hotta H.** 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.* 2004; 85(Pt 4):959-69.
- [33] **You S, Stump DD, Branch AD, Rice CM.** A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication *J Virol.* 2004; 78(3):1352-66.
- [34] **Ji H, Fraser CS, Yu Y, Leary J, Doudna JA** Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 24; in print
- [35] **Krüger M, Beger C, Li QX, Welch PJ, Tritz R, Leavitt M, Barber JR, Wong-Staal F.** Identification of eIF2B γ and eIF2 γ as cofactors of hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation using a functional genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97; 8566-8571

- [36] **Sizova DV, Kolupaeva VG, Pestova TV, Shatsky IN, Hellen CU.** Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J Virol.* 1998 Jun;72(6):4775-82.
- [37] **Chung RT, Kaplan LM** Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I (hnRNP-I/PTB) selectively binds the conserved 3' terminus of hepatitis C viral RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jan 19;254(2):351-62.
- [38] **Pudi R, Abhiman S, Srinivasan N, Das S.** Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen. *J. Biol. Chem.* 2002; 278;14 ;12231-12240
- [39] **Ito T, Lai MM** An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence *Virology.* 1999 Feb 15;254(2):288-96.
- [40] **Gontarek RR, Gutshall LL, Herold KM, Tsai J, Sathe GM, Mao J, Prescott C, Del Vecchio AM** hnRNP C and polypyrimidine tract-binding protein specifically interact with the pyrimidine-rich region within the 3'NTR of the HCV RNA genome. *Nucleic Acids Res.* 1999 Mar 15;27(6):1457-63
- [41] **Spangberg K, Wiklund L, Schwartz S.** HuR, a protein implicated in oncogene and growth factor mRNA decay, binds to the 3' ends of hepatitis C virus RNA of both polarities. *Virology.* 2000 Sep 1;274(2):378-90.
- [42] **Kruger M, Beger C, Welch PJ, Barber JR, Manns MP, Wong-Staal F.** Involvement of proteasome alpha-subunit PSMA7 in hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *Mol Cell Biol.* 2001; 21(24):8357-64.
- [43] **Coux O, Tanaka K, Goldberg AL.** Structure and functions of the 20S and 26S Proteasomes. *Ann.Rev.Biochem.*1996; 65:801-47.
- [44] **Bukh J.** A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology.* 2004; 39(6):1469-75
- [45] **Walker FM, Dazza MC, Dauge MC, Boucher O, Bedel C, Henin D, Lehy T.** Detection and localization by in situ molecular biology techniques and immunohistochemistry of hepatitis C virus in livers of chronically infected patients. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 653-660.
- [46] **Feray C, Samuel D, Thiers V, Gigou M, Pichon F, Bismuth A, Reynes M, Maisonneuve P, Bismuth H, Brechot C.** Reinfection of liver graft by hepatitis C virus after liver transplantation.. *J Clin Invest.* 1992; 89(4):1361-5
- [47] **Nagao Y, Sata M, Noguchi S, Seno'o T, Kinoshita M, Kameyama T, Ueno T.** Detection of hepatitis C virus RNA in oral lichen planus and oral cancer tissues.. *J Oral Pathol Med.* 2000; 29(6):259-66.
- [48] **Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Inchauspe G, Bain C.** Molecular evidence that the hepatitis C virus replicates in the oral mucosa.. *J Hepatol.* 2002; 37(3):364-9.

- [49] **Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Inchauspe G, Bain C.** Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2003; 187(12):1951
- [50] **Tian D, Yang D, Wang W, Xia Q, Shi S, Song P, Theilmann L.** Extrahepatic and intrahepatic replication and expression of hepatitis C virus. *J Tongji Med Univ.* 1998;18(3):149-52.
- [51] **Arrieta JJ, Rodriguez-Inigo E, Ortiz-Movilla N, Bartolome J, Pardo M, Manzarbeitia F, Oliva H, Macias DM, Carreno V.** In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. *Am J Pathol.* 2001; 159(4): 1593-1594..
- [52] **Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, Guenzi E, Cousens L, Chin M, Dong C, Weiner AJ, Lau JY, Choo QL, Chien D, Pileri P, Houghton M, Abrignani S.** A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(5):1759-63
- [53] **Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S.** Binding of hepatitis C virus to CD81 *Science.* 1998; 282(5390):938-41.
- [54] **Cormier EG, Tsamis F, Kajumo F, Durso RJ, Gardner JP, Dragic T.** CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(19):7270-4.
- [55] **Allander T, Fornis X, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J.** Hepatitis C virus envelope protein E2 binds to CD81 of tamarins. *Virology.* 2000; 277(2):358-67.
- [56] **Masciopinto F, Campagnoli S, Abrignani S, Uematsu Y, Pileri P.** The small extracellular loop of CD81 is necessary for optimal surface expression of the large loop, a putative HCV receptor. *Virus Res.* 2001; 80(1-2):1-10.
- [57] **Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL.** Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor.. *J Biol Chem.* 2003; 278(43):41624-30.
- [58] **Wunschmann S, Medh JD, Klinzmann D, Schmidt WN, Stapleton JT.** Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol.* 2000; 74(21):10055-62.
- [59] **Beales LP, Rowlands DJ, Holzenburg A.** The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy RNA. 2001; 7(5):661-70.
- [60] **Santolini E, Migliaccio G, La Monica N.** Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 1994; 68(6):3631-41.
- [61] **Negro F..** Detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue. *Ital. J Gastroenterol Hepatol;* 30: 205-210.
- [62] **Lanford RE, Sureau C, Jacob JR, White R, Fuerst TR.** Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR.. *Virology.* 1994; 202(2):606-14..

- [63] **Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J.** Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(16):8738-43.
- [64] **Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM.** Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science.* 1997; 277(5325):570-4.
- [65] **Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R.** Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 1999; 285(5424):110-3.
- [66] **Bartenschlager R, Lohmann V.** Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res.* 2001; 52(1):1-17.
- [67] **Nomoto A, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M.** Mechanism of translation initiation on hepatitis C virus RNA. *Princess Takamatsu Symp.* 1995;25:111-9.
- [68] **Ali N, Siddiqui A.** The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(6):2249-54.
- [69] **Green J, Pines O, Inouye M.** The role of antisense RNA in gene regulation. *Ann.Rev.Biochem.*1986; 55:569-97.
- [70] **Braasch DA, Corey DR.** Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression.. *Biochemistry.* 2002; 41(14):4503-10
- [71] **Brown-Driver V, Eto T, Lesnik E, Anderson P, Hanecak C.** Inhibition of translation of hepatitis C virus RNA by 2'-modified antisense oligonucleotides.*Nucleic Acid Drug Dev.* 1999; 9: 145-154
- [72] **Zhang H, Hanecak R, Brown-Driver V, Azad R, Conklin B, Fox MC, Anderson KP.** Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 347-353.
- [73] **Levin AA.** A review of the issues in the pharmacokinetics toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489: 69-84.
- [74] **De Smet MD, Meenken CJ, van den Horn GJ.** Fomivirsen – a phosphorothioate pligonucleotide for the treatment of CMV retinitis. *Ocul Immunol Inflamm* 1999; 7: 189-198.
- [75] **Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ.** Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Cell* 1996; 84(4):551-562.
- [76] **McManus MT, Sharp PA.** Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet.* 2002 ;3(10):737-47.
- [77] **Bernstein E, Caudy A, Hammond SM, Hannon GJ.** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409, 363-366.

- [78] **Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T.** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 2001; 15(2):188-200.
- [79] **Nykanen A, Haley B, Zamore PD.** ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001; 107,309-321.
- [80] **Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T.** Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 2002; 110(5):563-74.
- [81] **Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD.** Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 2003; 115(2):199-208.
- [82] **Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R..** Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature Genet* 2003; 34:263-264.
- [83] **Sledz CA, Holko M, DeVeer MJ, Silverman RH, Williams BR..** Activation of the interferon system by short interfering RNAs. *Nature Cell Biol*; 834-839.
- [84] **Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS.** Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 2002; 16(8):948-58.
- [85] **Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T.** Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002; 26:199-213.
- [86] **Miyagishi M, Taira K.** U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2002; 20(5):497-500
- [87] **Kawasaki H, Taira K.** Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(2):700-7.
- [88] **Shinagawa T, Ishii S.** Generation of Ski-knockdown mice by expressing a long double-strand RNA from an RNA polymerase II promoter. *Genes Dev.* 2003, 17(11):1340-5.
- [89] **Shen C, Buck AK, Liu X, Winkler M, Reske SN.** Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett.* 2003, 539: 111-114.
- [90] **McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA.** RNA interference in adult mice.. *Nature.* 2002; 418(6893):38-9.
- [91] **Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J.** RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med.* 2003; 9(3):347-51.
- [92] **Hommel JD, Sears RM, Georgescu D, Simmons DL, DiLeone RJ.** Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med.* 2003; 9(12):1539-44

- [93] **Haseloff J, Gerlach WL.** Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* 1988; 334: 585-591.
- [94] **Ohkawa K, Yuki N, Kanazawa Y, Ueda K, Mita E, Sasaki Y, Kasahara A, Hayashi N.** Cleavage of viral RNA and inhibition of viral translation by hepatitis C virus RNA-specific hammerhead-ribozyme in vitro. *Journal of Hepatology* 1997; 27: 78-84.
- [95] **Sakamoto N, Wu CH, Wu GY.** Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes. *J Clin Invest.*; 98: 2720-2728.
- [96] **Lieber A, He CY, Polyak SJ, Gretch DR, Barr D, Kay MA.** Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. *J Virol* 1996; 8782-8791.
- [97] **Turik MA, DeSante KA, Hillgren KM, Braun DK, Sandberg JA, Gonzalez CR, Blatt LM.** Single-dose safety and pharmacokinetics of LY466700, a synthetic nuclease-resistant anti-HCV ribozyme, in healthy adult subjects. *Hepatology* 2000; 32:443A
- [98] **Zhang YA, Nemunaitis J, Tong AW.** Generation of a ribozyme-adenoviral vector against K-ras mutant human lung cancer cells. *Mol Biotechnol.* 2000; 15(1):39-49.
- [99] **Sano M, Kuwabara T, Nara Y, Warashina M, Taira K.** Construction of a ribozyme-expression system that effectively transports ribozymes to the cytoplasm. *Nucleic Acids Symp Ser.* 2000; (44):203-4.
- [100] **Kuwabara T, Warashina M, Koseki S, Sano M, Ohkawa J, Nakayama K, Taira K.** Significantly higher activity of a cytoplasmic hammerhead ribozyme than a corresponding nuclear counterpart: engineered tRNAs with an extended 3' end can be exported efficiently and specifically to the cytoplasm in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(13):2780-8
- [101] **Jeltsch A, Wenz C, Stahl F, Pingoud A.** Linear diffusion of the restriction endonuclease EcoRV on DNA is essential for the in vivo function of the enzyme. *EMBO J.* 1996; 15(18):5104-11.
- [102] **Lee CG, Zamore PD, Green MR, Hurwitz J.** RNA annealing activity is intrinsically associated with U2AF. *J Biol Chem.* 1993; 268(18):13472-8.
- [103] **Wagner JD, Jankowsky E, Company M, Pyle AM, Abelson JN.** The DEAH-box protein PRP22 is an ATPase that mediates ATP-dependent mRNA release from the spliceosome and unwinds RNA duplexes. *EMBO J.* 1998; 17(10):2926-37
- [104] **Kuwabara T, Warashina M, Nakayama A, Ohkawa J, Taira K.** tRNAVal-heterodimeric maxizymes with high potential as gene-inactivating agents: simultaneous cleavage at two sites in HIV-1 Tat mRNA in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(5):1886-91.

- [105] **Wagner EJ, Garcia-Blanco MA.** Polypyrimidine Tract Binding Protein Antagonizes Exon Definition *Mol Cell Biol.* 2001 May;21(10):3281-8. *Mol Cell Biol.* 2000 Mar;20(5):1583-95
- [106] **Beales LP, Rowlands DJ, Holzenburg A** The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy RNA. 2001 May;7(5):661-70.
- [107] **Anwar A, Ali N, Tanveer R, Siddiqui A.** Demonstration of functional requirement of polypyrimidine tract-binding protein by SELEX RNA during hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation initiation. *J BiolChem.* 2000 Nov 3;275(44):34231-5
- [108] **Gosert R, Chang KH, Rijnbrand R, Yi M, Sangar DV, Lemon SM** Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap-independent translation directed by both picornaviral and flaviviral internal ribosome entry sites *In vivo.*
- [109] **Collier B, Goobar-Larsson L, Sokolowski M, Schwartz S** Translational inhibition in vitro of human papillomavirus type 16 L2 mRNA mediated through interaction with heterogenous ribonucleoprotein K and poly(rC)-binding proteins 1 and 2. *J Biol Chem.* 1998 Aug 28;273(35):22648-56
- [110] **Kim YK, Hahm B, Jang SK** Polypyrimidine tract-binding protein inhibits translation of bip mRNA. *J Mol Biol.* 2000 Nov 24;304(2):119-33.
- [111] **Gorlach M, Wittekind M, Beckman RA, Mueller L, Dreyfuss G** Interaction of the RNA-binding domain of the hnRNP C proteins with RNA. *EMBO J.* 1992 Sep;11(9):3289-95
- [112] **Kenan DJ, Query CC, Keene JD.** RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem Sci.* 1991 Jun;16(6):214-20
- [113] **Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K, Shimotohno K** Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol.* 1996 May; 70(5):3307-12.
- [114] **Peng SS, Chen CY, Shyu AB.** Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c-jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements *Mol Cell Biol.* 1996 Apr; 16(4):1490-9.
- [115] **Chen CY, Shyu AB.** Selective degradation of early-response-gene mRNAs: functional analyses of sequence features of the AU-rich elements. *Mol Cell Biol.* 1994 Dec;14(12):8471-82.
- [116] **Peng SS, Chen CY, Xu N, Shyu AB.** RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J.* 1998 Jun 15; 17(12):3461-70.
- [117] **Wang W, Furneaux H, Cheng H, Caldwell MC, Hutter D, Liu Y, Holbrook N, Gorospe M** HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol.* 2000 Feb; 20(3):760-9
- [118] **Gallouzi IE, Brennan CM, Stenberg MG, Swanson MS, Eversole A, Maizels N, Steitz JA** HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28; 97(7):3073-8.

- [119] **Nakaya T, Sato M, Hata N, Asagiri M, Suemori H, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T** Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 May 25;283(5):1150-6.
- [120] **Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R Jr, Ikeda M, Lemon SM, Gale M Jr.** Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science.* 2003 May 16;300(5622):1145-8
- [121] **Harada H, Willison K, Sakakibara J, Miyamoto M, Fujita T, Taniguchi T** Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated. *Cell.* 1990 Oct 19;63(2):303-12.
- [122] **Schwarz K, van Den Broek M, Kostka S, Kraft R, Soza A, Schmidtke G, Kloetzel PM, Groettrup M.** Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 alpha/beta, enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope. *J Immunol.* 2000 Jul 15;165(2):768-78
- [123] **Khu YL, Tan YJ, Lim SG, Hong W, Goh PY** Hepatitis C virus non-structural protein NS3 interacts with LMP7, a component of the immunoproteasome, and affects its proteasome activity. *Biochem J.* 2004 Dec 1;384(Pt 2):401-9.
- [124] **Huang J, Kwong J, Sun EC, Liang TJ.** Proteasome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein. *J Virol.* 1996 Aug;70(8):5582-91
- [125] **Tang Z, Kock J, Moradpour D, Yang D, Hao L, Blum H.** Implication of mutation of hepatitis C virus 1b interferon sensitivity determining region(NS5A aa 2209-2248) response to interferon alpha therapy in patients with chronic hepatitis C] *J Tongji Med Univ.* 1999;19(2):115-9. German.
- [126] **Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV** Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Feb 18;100(4):2014-8.
- [127] **Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatino S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, Sarangi F, Harris-Brandts M, Beaulieu S, Richardson CD** RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar 4;100(5):2783-8
- [128] **Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Iizuka H, Machida A, Miyakawa Y, Mayumi M** Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol.* 1991 Nov;72 (Pt 11):2697-704
- [129] **Randall G, Grakoui A, Rice** Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 7;100(1):235-40
- [130] **Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C** Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Aug 30;296(4):1000-4.

- [131] **Pebernard S, Iggo RD.** Determinants of interferon-stimulated gene induction by RNAi vectors. *Differentiation*. 2004 Mar;72(2-3):103-11
- [132] **Horvath CM.** The Jak-STAT Pathway Stimulated by Interferon {alpha} or Interferon {beta}. *Sci STKE*. 2004 Nov 23;2004(260):tr10
- [133] **Miyagishi M, Sumimoto H, Miyoshi H, Kawakami Y, Taira K** Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in mammalian cells *J Gene Med*. 2004 Jul;6(7):715-23.

8. Anhang

8.1 Oligonukleotide

8.1.1 SiRNA-Oligonukleotide

siRNA-Oligo	Sequenz	Beschreibung
EGFPsi122+	5'-tcg agg ctg acc ctg aag ttc atc <u>gag tac</u> <u>tgg atg aac ttc agg gtc agc ttt tt-3'</u>	Position 122 der EGFP-mRNA, 56-mer, G/C-Gehalt 48,7 %
EGFPsi122-	5'-cta gaa aaa gct gac cct gaa gtt cat cca gta ctc gat gaa ctt cag ggt cag cc-3'	Antisense-Oligonukleotid
tCD4si665+	5'-tcg agt aga cat cgt ggt gct agc <u>gag tac</u> <u>tgg cta gca cca cga tgt cta ttt tt-3'</u>	Position 665 der tCD4-mRNA, 56-mer, G/C-Gehalt 48,2 %
tCD4si665-	5'-cta gaa aaa tag aca teg tgg tgc tag cca gta ctc gct agc acc acg atg tct ac-3'	Antisense-Oligonukleotid
HCVsi74+	5'-tcg aga gcg tet agc cat ggc gtt <u>agg agt</u> <u>act get aac gcc atg get aga cgc ttt ttt-3'</u>	Position 74 der HCV-RNA, 60-mer, G/C-Gehalt %
HCVsi74-	5'-cta gaa aaa agc gtc tag cca tgg cgt tag cag tac tcc taa cgc cat ggc tag acg etc-3'	Antisense-Oligonukleotid
HCVsi156+	5'-tcg agc egg tga gta cac egg aat <u>tgg agt</u> <u>act gea att ceg gtg tac tca ceg gtt ttt-3'</u>	Position 156 der HCV-RNA, 60-mer, G/C-Gehalt %
HCVsi156-	5'-cta gaa aaa ceg gtg agt aca ceg gaa ttg cag tac tcc aat tcc ggt gta ctc acc ggc-3'	Antisense-Oligonukleotid
HCVsi207+	5'-tcg agc ceg ctc aat gcc tgg aga <u>gag tac</u> <u>tgt etc cag gca ttg agc ggg ttt tt-3'</u>	Position 207 der HCV-RNA, 56-mer, G/C-Gehalt %
HCVsi207-	5'-cta gaa aaa ccc gct caa tgc ctg gag aca gta ctc tet cca ggc att gag cgg gc-3'	Antisense-Oligonukleotid
HCVsi3X+	5'-tcg agg gtc cgt gag ceg ctt gac <u>gag tac</u> <u>tgg tea agc ggc tea egg acc ttt tt-3'</u>	Position 7798 der HCV-RNA, 56-mer, G/C-Gehalt 58,9 %
HCVsi3X-	5'-cta gaa aaa ggt ceg tga gcc gct tga cca gta ctc gtc aag egg etc acg gac cc-3'	Antisense-Oligonukleotid
HCVsi3X(-)F	5'- tcg agg cag aga ggc cag tat cag <u>gag</u> <u>tac tgc tga tac tgg cct etc tgc ttt tt-3'</u>	Position 7823 der HCV-RNA, 56-mer, G/C-Gehalt 51,8 %
HCVsi3X(-)R	5'-cta gaa aaa gca gag agg cca gta tea gca gta ctc ctg ata ctg gcc tet ctg cc-3'	Antisense-Oligonukleotid
HuR127+	5'-tcg agt ggt tat gaa gac cac atg <u>gcg agt</u> <u>act ggc cat gtg gtc ttc ata acc att ttt-3'</u>	Position 127 der HuR-mRNA, 60-mer, G/C-Gehalt 45 %
HuR127-	5'-cta gaa aaa tgg tta tga aga cca cat ggc cag tac teg cca tgt ggt ctt cat aac cac-3'	Antisense-Oligonukleotid
HuR334+	5'-tcg agg gat gca gag aga gcg atc aag <u>agt act gtt gat cgc tet etc tgc atc ctt ttt-</u> <u>3'</u>	Position 334 der HuR-mRNA, 60-mer, G/C-Gehalt 48,3 %

siRNA-Oligo	Sequenz	Beschreibung
HuR334-	5'-cta gaa aaa gga tgc aga gag agc gat caa cag tac tct tga teg ctc tct ctg cat ccc-3'	Antisense-Oligonukleotid
HuR947+	5'-tcg agt gtg aaa gtg atc cgc gac <u>gag tac</u> <u>tgg teg cgg atc act ttc aca ttt tt-3'</u>	Position 947 der HuR-mRNA, 56-mer, G/C-Gehalt 48,2 %
HuR947-	5'-cta gaa aaa tgt gaa agt gat cgc cga cca gta ctc gtc gcg gat cac ttt cac ac-3'	Antisense-Oligonukleotid
HuR1137+	5'-tcg agg agt gaa gga gtt gaa act <u>gag tac</u> <u>tga gtt tea act cct tea ctc ttt tt-3'</u>	Position 1137 der HuR- mRNA, 56-mer, G/C-Gehalt 41,1 %
HuR1137-	5'-cta gaa aaa ga tga agg agt tga aac tea gta ctc agt ttc aac tcc ttc act cc-3'	Antisense-Oligonukleotid
PSMA7-79+	5'-tcg agg tgg agt acg cgc agg agg ccg <u>agt act ggg cct cct gcg cgt act cca ctt ttt-</u> <u>3'</u>	Position 79 der PSMA7- mRNA, 60-mer, G/C-Gehalt 61,7 %
PSMA7-79-	5'-cta gaa aaa gtg gag tac gcg cag gag gcc cag tac teg gcc tcc tgc gcg tac tcc acc-3'	Antisense-Oligonukleotid
PSMA7-522+	5'-tcg agg tca gtg cgc gag ttc ctg <u>gag agt</u> <u>act gtc cag gaa ctc gcg cac tga ctt ttt-3'</u>	Position 522 der PSMA7- mRNA, 60-mer, G/C-Gehalt 55 %
PSMA7-522-	5'-cta gaa aaa gtc agt gcg cga gtt cct gga cag tac tct cca gga act cgc gca ctg acc-3'	Antisense-Oligonukleotid
PSMA7-639+	5'-tcg agc att gaa ctt gct gtc atg <u>agg agt</u> <u>act gct cat gac agc aag ttc aat gtt ttt-3'</u>	Position 639 der PSMA7- mRNA, 60-mer, G/C-Gehalt 41,7 %
PSMA7-639-	5'-cta gaa aaa cat tga act tgc tgt cat gag cag tac tcc tea tga cag caa gtt caa tgc- 3'n	Antisense-Oligonukleotid
PSMA7-779+	5'-tcg aga atg tct ttg ctt gta att <u>gag tac</u> <u>tga att aca agc aaa gac att ttt tt-3'</u>	Position 779 der PSMA7- mRNA, 56-mer, G/C-Gehalt 30,4 %
PSMA7-779-	5'-cta gaa aaa aat gtc ttt gct tgt aat tca gta ctc aat tac aag caa aga cat tc-3'	Antisense-Oligonukleotid
PTB148+	5'-tcg agc gga aat gac agc aag aag <u>gag</u> <u>tac tgc ttc ttg ctg tea ttt ceg ttt tt-3'</u>	Position 148 der PTB-mRNA, 56-mer, G/C-Gehalt 44,6 %
PTB148-	5'-cta gaa aaa cgg aaa tga cag caa gaa gca gta ctc ctt ctt get gtc att tcc gc-3'	Antisense-Oligonukleotid
PTB352+	5'-tcg agc acc atg gtg aac tac tac acg <u>agt</u> <u>act ggt gta gta gtt cac cat ggt gtt ttt-3'</u>	Position 352 der PTB-mRNA, 60-mer, G/C-Gehalt 45 %
PTB352-	5'-cta gaa aaa ca cat ggt gaa cta cta cac cag tac teg tgt agt agt tea cca tgg tgc-3'	Antisense-Oligonukleotid

siRNA-Oligo	Sequenz	Beschreibung
PTB646+	5'- tcg agg ttc ggc aca gtg ttg aag atg <u>agt act</u> gat ctt caa cac tgt gcc gaa ctt ttt-3'	Position 646 der PTB-mRNA, 60-mer, G/C-Gehalt 45 %
PTB646-	5'-cta gaa aaa gtt cgg cac agt gtt gaa gat cag tac tca tct tca aca ctg tgc cga acc-3'	Antisense-Oligonukleotid
PTB1256+	5'- tcg agg cac cag aac gtg cag ctg ccg <u>agt act</u> ggg cag ctg cac gtt ctg gtg ctt ttt-3'	Position 1256 der PTB-mRNA, 60-mer, G/C-Gehalt 58,3 %
PTB1256-	5'-cta gaa aaa gca cca gaa cgt gca gct gcc cag tac tgc gca gct gca cgt tct ggt gcc-3'	Antisense-Oligonukleotid

Die genspezifische Zielsequenz der small hairpin RNA ist fett gedruckt, der hairpin loop ist unterstrichen.

Alle siRNA-Oligonukleotide sind für die Einfügung in pSuppressorRetro durch XhoI- (5'-tcgag) und XbaI- (5'-ctag)Überhänge flankiert.

8.1.2 Sense-/Antisense-Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Beschreibung
hnRNPC-5-HindIII	5'-cat caa <u>agc tta</u> tgg cca gca acg tta cc-3'	Forward-Primer für hnRNP C-Gen in Sense-Orientierung mit HindIII-Schnittstelle
hnRNPC-3-Xho	5'-gtg <u>ctc tcg agt</u> cat cct cca ttg gcg ctg-3'	Reverse-Primer in Sense-Orientierung mit XhoI-Schnittstelle
hnRNPC-5-Xho	5'-Cat cac <u>tcg aga</u> tgg cca gca acg tta cc-3'	Forward-Primer für hnRNP C-Gen in Antisense-Orientierung mit XhoI-Schnittstelle
hnRNPC-3-Hind	5'-gtg <u>cta agc ttt</u> cat cct cca ttg gcg ctg-3'	Reverse-Primer in Antisense-Orientierung mit HindIII-Schnittstelle
IRF1-5-Hind	5'-gca gaa <u>agc tta</u> tgc cca tca ctc gga tg-3'	Forward-Primer für IRF1-Gen in Sense-Orientierung mit HindIII-Schnittstelle
IRF1-3-Xho	5'-cag <u>ggc tcg agc</u> tac ggt gca cag gga atg-3'	Reverse-Primer in Sense-Orientierung mit XhoI-Schnittstelle

siRNA-Oligo	Sequenz	Beschreibung
IRF1-5-Xho	5'-gca gac <u>tcg aga</u> tgc cca tea ctc gga tg-3'	Forward-Primer für IRF1-Gen in Antisense-Orientierung mit XhoI- Schnittstelle
IRF1-3-Hind	5'-cag gga <u>agc ttc</u> tac ggt gca cag gga atg g-3'	Reverse-Primer in Antisense- Orientierung mit HindIII- Schnittstelle
PSMA1-5'NheI	5'-gcg ccg <u>cta gca</u> tgt ttc gaa atc agt atg-3'	Forward-Primer für PSMA1-Gen in Sense-Orientierung mit NheI- Schnittstelle
PSMA1-3'XhoI	5'-tgg ctc <u>tcg agt</u> taa tgt tcc att ggt tca t-3'	Reverse-Primer in Sense- Orientierung mit XhoI-Schnittstelle
PSMA1-5'XhoI	5'-gcg ccc <u>tcg aga</u> tgt ttc gaa atc agt atg-3'	Forward-Primer für PSMA1-Gen in Antisense-Orientierung mit XhoI- Schnittstelle
PSMA1-3'NheI	5'-tgg gct <u>gct agc</u> tta atg ttc cat tgg ttc at-3'	Reverse-Primer in Antisense- Orientierung mit HindIII- Schnittstelle
Hypo-5'BamHI	5'-cgg ccg <u>gat cca</u> tgc cac aga atg aat at-3'	Forward-Primer für hypothetical protein-Gen in Sense-Orientierung mit BamHI-Schnittstelle
Hypo-3'XbaI	5'-tga aat <u>cta gat</u> caa acc agt aag act gca-3'	Reverse-Primer in Sense- Orientierung mit XbaI-Schnittstelle
Hypo-5'XbaI	5'-cgg cct <u>cta gaa</u> tgc cac aga atg aat at-3'	Forward-Primer für hypothetical protein-Gen in Antisense- Orientierung mit XbaI-Schnittstelle
Hypo-3'BamHI	5'-tga aag <u>gat cct</u> caa acc agt aag act gca-3'	Reverse-Primer in Antisense- Orientierung mit HindIII- Schnittstelle
HuR 5'HindIII	5'-gaa aaa <u>gct tat</u> gtc taa tgg tta tg-3'	Forward-Primer für HuR-Gen in Sense-Orientierung mit HindIII- Schnittstelle
HuR 3'XhoI	5'- cat <u>gct cga</u> gtt att tgt ggg act tg-3'	Reverse-Primer in Sense- Orientierung mit XhoI-Schnittstelle
HuR 5'XhoI	5'-gaa act <u>cga gat</u> gtc taa tgg tta tg-3'	Forward-Primer für HuR-Gen in Antisense-Orientierung mit XhoI- Schnittstelle
HuR 3'HindIII	5'-cat gaa <u>gct ttt</u> att tgt ggg act tg-3'	Reverse-Primer in Antisense- Orientierung mit HindIII-Schnittstelle

siRNA-Oligo	Sequenz	Beschreibung
IRF3 5'HindIII	5'-agg <u>caa gct</u> tat ggg aac ccc aaa gcc acg-3'	Forward-Primer für IRF3-Gen in Sense-Orientierung mit HindIII-Schnittstelle
IRF3 3'XhoI	5'-agg <u>act cga gtt</u> att ggt tga ggt ggt gg-3'	Reverse-Primer in Sense-Orientierung mit XhoI-Schnittstelle
IRF3 5'XhoI	5'-agg <u>cct cga gat</u> ggg aac ccc aaa gcc acg-3'	Forward-Primer für IRF3-Gen in Antisense-Orientierung mit XhoI-Schnittstelle
IRF3 3'HindIII	5'-agg <u>aaa gct ttt</u> att ggt tga ggt ggt gg-3'	Reverse-Primer in Antisense-Orientierung mit HindIII-Schnittstelle
EIF3 5'NheI	5'ggc agc <u>gct agc</u> ccc atg cag gac gcg ga-3'	Forward-Primer für eIF3-Gen in Sense-Orientierung mit NheI-Schnittstelle
EIF3 3'XhoI	5'-gaa gcg <u>ctc gag</u> tta aat ccc cca ctg-3'	Reverse-Primer in Sense-Orientierung mit XhoI-Schnittstelle
EIF3 5'HindIII	5'-gcc gac ggc tac <u>aag ett</u> gac aa-3'	Forward-Primer mit HindIII-Schnittstelle
EIF3 3'HindIII	5'-ttg tca <u>agc ttg</u> tag ccg tcg gcg-3'	Reverse-Primer mit HindIII-Schnittstelle
EIF3 5'XhoI	5'-ggc agc <u>ctc gag</u> ccc atg cag gac gcg ga-3'	Forward-Primer für IRF1-Gen in Antisense-Orientierung mit XhoI-Schnittstelle
EIF3 3'NheI	5'-gaa gcg <u>gct agc</u> tta aat ccc cca ctg-3'	Reverse-Primer in Antisense-Orientierung mit HindIII-Schnittstelle

Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen dargestellt. Der ATG-Codon (Translations-Start), sowie der TGA- und TAA-Codon (Translations-Ende) sind jeweils fett gedruckt.

8.1.3 Ribozym-Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Beschreibung
BR1F	5'-gaa aca gtc gac agg ttg gga gaa gc-3'	Forward-Primer 5' für das gegen HBV gerichtete Ribozym tRzHBV
CR2AF	5'-gaa aca gtc gac gtc tac gaa gaa tc-3'	Forward-Primer 5' für das gegen HCV 5'UTR gerichtete Ribozym tRz323
9490F	5'-gaa aca gtc gac cta gcc gta gaa ag-3'	Forward-Primer 5' für das gegen HCV 3'UTR gerichtete Ribozym tRz9523
9510F	5'-gaa aca gtc gac ggc tca cga gaa tt-3'	Forward-Primer 5' für das gegen HCV 3'UTR gerichtete Ribozym tRz9543
5'MluICTE	5'-tta tac gcg tca aaa gac aca tcc ctc g-3'	Reverse-Primer 3' des Constitutive Transport Element (CTE)
RzuniR	5'-gag gtg tet aga acc agg taa tat ac-3'	Reverse-Primer 3' aller Ribozyme ohne CTE

8.1.4 Diverse Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Beschreibung
pSupSeq	5'-aat acg tga cgt aga aag ta-3'	Sequenzierprimer für pSuppressorRetro
siLibR	5'-aaa aag cgg acc gaa gtc cgc tct aga aaa a (agct) ₁₉ <u>c agt act c</u> (agct) ₁₉ tcg act agt ata tgt gct gcc gaa gcg-3'	PCR-Primer für die Produktion von siRNA-Libraries
siLibR2	5'-aaa aag cgg acc gaa gtc cgc tct aga aaa a-3'	Reverse-Primer für die Vervielfältigung einer siLibrary
NeoEcoRI F	5'-atc gga att cat gat tga aca aga tgg att gc-3'	PCR-Primer für die Vervielfältigung einer siLibrary für pSR
5'siLib	5'-cgc ttc ggc agc aca tat act agt cga g(agct) ₁₉ <u>g agt act g</u> -3'	PCR-Primer für die Produktion von siRNA-Libraries
3'siLib	5'-aaa aag cgg acc gaa gtc cgc tct aga aaa a(agct) ₁₉ <u>c agt act c</u> -3'	PCR-Primer für die Produktion von siRNA-Libraries
HygroF	5'-gga tct <u>gat atc</u> cac gtg atg aaa aag c-3'	Forward-Primer für die Klonierung des Hygromycin-Gens mit EcoRV-Schnittstelle
HygroR	5'-tcg aaa <u>tct aga</u> agc acg tgc tat tcc-3'	Reverse-Primer für die Klonierung des Hygromycin-Gens mit XbaI-Schnittstelle

siRNA-Oligo	Sequenz	Beschreibung
5'-P1	5'-gct gac tag tgc cag ccc ccg att ggg ggc ga-3'	5'Primer mit SpeI Schnittstelle für die Klonierung der HCV Internal Ribosomal Entry Site
3'-P2	5'-cgg ttg aat tca cgt ttg gtt ttt ctt tga-3'	3'Primer mit EcoRI Schnittstelle für die Klonierung der HCV IRES
3'-P3	5'-cac gtg aat tca tgc atg acc tta ccc aaa t-3'	3'Primer mit EcoRII Schnittstelle für die Klonierung der HCV IRES
3'-P4	5'-cat ggt aca ctc cga att cgt tgc gca c-3'	3'Primer mit EcoRI Schnittstelle für die Klonierung der HCV IRES
P2tCD4A	5'-ttc gtg aat teg gtg cac ggt cta cga gac c-3'	tCD4-Primer mit EcoR1- Schnittstelle
P2tCD4B	5'-gga ttg aat tcc atg gtg cac ggt cta cga gac c-3'	tCD4-Primer mit EcoR1- Schnittstelle und zusätzlichem ATG codon
3'tCD4	5'-atc tgg ccg gcc gtt taa aca agc ttg ggc tgc agg teg c-3'	Reverse-Primer mit EcoRI- Schnittstelle
Oligo(dT)	5' ttt ttt ttt ttt ttt tt(agg)-3'	Primer für die RT-PCR
U6 snRNA 5'	5'-gtc ctc get teg gca gca c-3'	Forward-Primer für die U6 small nuclear RNA im Nukleus
U6 snRNA 3'	5'-aaa aat atg gaa cgc ttc acg-3'	Reverse-Primer für die U6 small nuclear RNA im Nukleus

8.2 Ribozym-Sequenzen

5'	Helix1	Loop1	Helix2	Hairpin	Ribozym
AGGTTGGG	<i>AGAA</i>	GCGA		ACCAGAGAAACACACGTTGTGGTATATTACCTGGTA	RzHBV
GTCTACGA	<i>AGAA</i>	TCCC		ACCAGAGAAACACACGTTGTGGTATATTACCTGGTA	Rz 323
CTAGCCGT	<i>AGAA</i>	AGGG		ACCAGAGAAACACACGTTGTGGTATATTACCTGGTA	Rz 9523
GGCTCACG	<i>AGAA</i>	TTTC		ACCAGAGAAACACACGTTGTGGTATATTACCTGGTA	Rz 9543

HCV spezifische Sequenzen sind fett gedruckt

8.3 Constitutive Transport Element (CTE) (Mason-Pfizer Monkey Virus (MPMV) 256bp)

```

1  tgctacgcgt  cacctcccct  gtgagctaga  ctggacagcc  aatgacgggt  aagagagtga
61  cttttctcac  taacctaaaga  caggagggcc  gtcaaagcta  ctgcctaate  caatgacggg
121 taatagtgac  aagaaatgta  tcaactcaac  ctaagacagg  cgcagcctcc  gagggatgtg
181 tcttttgttt  tttataatta  aaaaggggtga  catgtccgga  gccgtgctgc  ccggatgatg
241 tcttgacgc  gtaggc

```


8.4 Gene

Bezeichnung	GenBank -Nr.	mRNA	Protein	Gen
Hn RNP C	GI_58476966	1270 bp	37 kDa	Heterogenous Nuclear Ribonukleoprotein C
PTB	GI_35767	3131 bp	57 kDa	Polypyrimidin Tract Binding Protein
PSMA7	NM_002792	893 bp	28 kDa	Proteasome Alpha-Subunit 7
HuR	BC_003376	2357 bp	38 kDa	Human antigen R
eIF3/p116	GI_12654668	2862 bp	116 kDa	Eucaryotic Initiation Factor 3
PSMA1	NM_148976	1480 bp	30 kDa	Proteasome Alpha Subunit 1
IRF1	NM_002198	2035 bp	48 kDa	Interferon Regulatory Factor 1
IRF3	NM_001571	1648 bp	50 kDa	Interferon Regulatory Factor 3
GAPDH	NM_002046	1283 bp	37 kDa	Glyceraldehyd 3-Phosphotase-Dehydrogenase
Actin	NM_001101	1793 bp	42kDa	β -Actin
tCD4	M_35160	1371 bp	38 kDa	Truncated Human T4 Surface Glycoprotein CD4
EGFP	U_57608	4737 bp	127 kDa	Enhanced Green Fluorescent Protein
U6 snRNA	GI_37562	107 bp	-	U6 small nuclear Ribonucleicacid

8.5 Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Klon	Firma	Größe	Gen
Actin	AC-40	Sigma-Aldrich	42 kDa	β -Actin
HCV NS5B	Moradpour	Universiät Freiburg	68 kDa	HCV Nichtstrukturprotein 5B
HuR	Sc-5261	Santa Cruz Biotechnology	38 kDa	Human antigen R
PSMA7	MCP34	Affiniti Research Products	28 kDa	Proteasome Alpha-Subunit 7
PTB	Bb7	University of California, USA	57 kDa	Polypyrimidin Tract Binding Protein
STAT1 p84/p91	Sc-464	Santa Cruz Biotechnology	84/91 kDa	Signal Transducer and Activator of Transcription 1

8.6 Hepatitis C virus...[GI_22129792] - Isolat H77 - Genotyp 1a

1	gccagccccc	tgatgggggc	gacactccac	catgaatcac	tcccctgtga	ggaactactg	HCV IRES
61	tcttcacgca	gaagcgtct	agccatggcg	ttagtatgag	tgctgtgcag	octccaggac	
121	ccccctccc	gggagagcca	tagtggctcg	cggaaccggg	gagtacaccg	gaattgccag	
181	gacgaccggg	tcctttcttg	gataaacccg	ctcaatgcct	ggagatttgg	gctgcccccc	
241	gcaagactgc	tagccgagta	gtgttgggtc	gcgaaaagcc	ttgtgggtact	gcctgatagg	
301	gtgcttgcga	gtgccccggg	aggctctgta	gaccgtgcac	catgagcacc	aatcctaata	Core
361	ctcaaagaaa	aaccaaactg	aacaccaacc	gtcgcccaca	ggacgtcaag	ttcccgggtg	
421	gcggtcagat	cgttgggtgga	gtttacttgt	tgcccgccag	gggccctaga	ttgggtgtgc	
481	gcgcgacgag	gaagacttcc	gagcggctgc	aacctcgagg	tagacgtcag	cctatcccca	
541	aggcacgctc	gcccagaggg	aggacctggg	ctcagcccgg	gtacccttgg	ccccctctat	
601	gcaatgaggg	ttgcccgtgg	gcgggatggc	tccctgtctc	ccgtggctct	cgccctagct	
661	ggggccccac	agacccccgg	cgtaggtcgc	gcaatttggg	taaggtcctc	gataccccct	
721	cgtagcggct	cgccgacctc	atggggtaca	taccgctcgt	cgccgcccct	cttgaggcgg	
781	ctgccagggc	cctggcgcat	ggcgtccggg	ttctggaaga	cgccgctgaa	tatgcaacag	
841	ggaaccttcc	tggttgctct	ttctctatct	tccttctggc	ctgtctctct	tgccctgact	
901	tgcccgttcc	agcctacca	gtgccaatt	cctcggggct	ttaccatgtc	accaatgatt	E1
961	gcctaactc	gagtattgtg	tacgaggcgg	ccgatgccat	cctgcacact	ccggggtgtg	
1021	tccttctcgt	tcgagagggt	aacgcctcga	gggtgtgggt	ggcgttgacc	cccacgggtg	
1081	ccaccaggga	cggcaaacct	cccacaacgc	agcttcgacg	tcataatgat	ctgcttctgc	
1141	ggagcgaact	cctctgctcg	gccctctacg	tgggggacct	gtgcccgtct	gtcttctctg	
1201	ttgggtcaact	gtttaccttc	ttccccaggc	gccactggac	gacgcaagac	tgcaattgtt	
1261	ctatctatcc	cgccatata	acgggtcact	gcatggcatg	ggatatgatg	atgaactggg	
1321	ccctacggc	agcgttggg	gtagctcagc	tgctccggat	cccacaagcc	atcatgggac	
1381	tgatcgctgg	tgctactgg	ggagtcctgg	cgggcatagc	gtatttctcc	atggtgggga	
1441	actggggcga	gtcctcgta	gtcgtcctgc	tatttgccgg	cgtcgacggc	gaaaccacag	E2
1501	tcaccggggg	aagtgcggcg	cgcaaccagg	ctgggcttgt	tggtctcctt	acaccaggcg	
1561	ccaagcagaa	catccaactg	atcaaaccca	acggcagttg	gcacatcaat	agcacggcct	
1621	tgaactgcaa	tgaaagcctt	aacaccggct	ggttagcagg	gctcttctat	cagcaacaa	
1681	tcactcttc	agcctgtcct	gagaggttgg	ccagctcgcc	acgccttacc	gatttggccc	
1741	agggtcgggg	tcctatcagt	tatgccaacg	gaagcggcct	cgacgaacgc	ccctactgct	
1801	ggactacc	tccaagacct	tgtggcattg	tgcccgcaaa	gagcgtgtgt	ggcccgggat	
1861	attgcttcc	tcccagcccc	gtgggtgggg	gaacgaccga	caggtcgggg	gcgcctacct	
1921	acagttggg	tgcaaatgat	acggatgtct	tcgtccttaa	caacaccagg	ccaccgctgg	
1981	gcaattgggt	cggttgtaac	tggaatgaact	caactggatt	caccaaagtg	tgccgagcgc	
2041	cccttctgt	catcggaggg	gtgggcaaca	acacctgtct	ctgcccactc	gattgtttcc	
2101	gcaagcatcc	ggaagccaca	tactctcggg	gcggctccgg	tccttggatt	acaccagggt	
2161	gcatggtcga	ctaccgtatg	aggctttggc	actatccttg	taccatcaat	tacaccatat	
2221	tcaaagtcag	gatgtacgtg	ggaggggtcg	agcacaggct	ggaagcggcc	tgcaactgga	
2281	cgccggggcg	acgctgtgat	ctggaagaca	gggacaggct	cgagctcagc	ccattgctgc	
2341	tgtccaccac	acagtggcag	gtccttccgt	gttctttcac	gaccctgcca	gccttgtcca	
2401	ccggcctcat	ccacctccac	cagaacattg	tggacgtgca	gtacttgtac	ggggtagggt	
2461	caagcatcgc	gtcctggggc	attaagtggg	agtagctcgt	tctcctgttc	ctcctgcttg	
2521	cagacgcgcg	cgctctgctc	tgcttgggga	tgatgttact	catatcccaa	gccgaggcgg	
2581	ctttggagaa	cctcgttaata	ctcaatgcag	catccctggc	cgggacgcac	ggctctgtgt	P7
2641	ccttctcctg	gttcttctgc	tttgctgtgt	atctgaagg	taggtgggtg	cccggagcgg	
2701	ctcactcctt	ctaccgggat	tgccctctcc	tctgtctcct	gctggcgttg	cctcagcggg	
2761	catacgcact	ggacacggag	gtggcccgct	cgctgtggcg	cgttgttctt	gtcgggttaa	NS2
2821	tgccgctgac	tctgtgcgca	tattacaagc	gctacatcag	ctgggtgatg	tggtggcttc	
2881	agtattttct	gaccagagta	gaagcgcaac	tgcaactgtg	ggttcccccc	ctcaactgct	
2941	ggggggggcg	cgatgcctgc	atcttactca	tgtgtgttgt	acaccgactc	ctggtatttg	
3001	acatcaccaa	actactcctg	gccactctcg	gacccctttg	gattcttcaa	gccagtttgc	
3061	ttaaagtccc	ctacttctgt	cgcggttcaag	gccttctccg	gatctgcgcg	ctagcgggga	
3121	agatagccgg	aggctattac	gtgcaaatgg	ccatcatcaa	gttagggggc	cttactggca	
3181	cctatgtgta	taaccatctc	acccctcttc	gagactgggc	gcacaacggc	ctgcgagatc	
3241	tgcccgctgc	tgtggaacca	gtcgtcttct	cccgaatgga	gaccaagctc	atcacgtggg	
3301	gggcagatac	cgccgcgtgc	ggtgacatca	tcaacggctt	gcccgtctct	gcccgtaggg	
3361	gccaggagat	actgcttggg	ccagccgacg	gaatggtctc	caagggggtg	aggttgctgg	
3421	cgcccatcac	ggcgtacgcc	cagcagacga	gaggcctcct	agggtgtata	atcaccagcc	NS3
3481	tgactggccg	ggacaaaaac	caagtggagg	gtgaggtcca	gatcgtgtca	actgctaccc	
3541	aaacttctct	ggcaacgtgc	atcaatgggg	tatgctggac	tgtctaccac	ggggccggaa	
3601	cgaggaccat	cgcatcacc	aagggtcctg	tcattccagat	gtataccaat	gtggaccaag	
3661	accttctggg	ctggcccgtc	cctcaagggt	cccgtcattt	gacaccctgc	acctcgggct	
3721	cctcggacct	ttacctgtgc	acgaggcacc	ccgatgtcat	tcccgtgcgc	cgccgagggt	
3781	atagcagggt	tagcctgctt	tcgcccgggc	ccatttctca	cttgaaggag	tcctcggggg	
3841	gtccgctggt	gtgcccggcg	ggacacggcg	tgggcctatt	caggccggcg	gtgtgcaccc	
3901	gtggagtggc	taaggcgggt	gactttatcc	ctgtggagaa	cctagagaca	accatgagat	
3961	ccccgggtgt	cacggacaac	tcctctccac	cagcagtgcc	ccagagcttc	cagggtggccc	
4021	acccgtgctc	tcccaccggc	agccgttaaga	gcaccaaggt	cccggctcgc	taccagcccc	
4081	agggtacaaa	ggtgttgggt	ctcaaccctc	ctgttctgct	aacgctgggc	tttgggtgct	
4141	acatgtccaa	ggcccatggg	gttgatccta	atatcaggac	cggggtgaga	acaattacca	
4201	ctggcagccc	catcacgtac	tccacctacg	gcaagttcct	tgccgacggc	gggtgctcag	
4261	gaggtgctta	tgacataata	atgtgtgacg	agtgccactc	cacggatgcc	acatccactc	
4321	tgggcatcgg	cactgtcctt	gaccaagcag	agactcgggg	ggcgagactg	gttgtgctcg	

4381 ccactgctac ccctccgggc tccgtcactg tgtcccatcc taacatcgag gaggttgctc
 4441 tgtccaccac cggagagatc cctttttacg gcaaggctat cccctctogag gtgatcaagg
 4501 gggcaagaca tctcatcttc tgcccactcoa agaagaagtg cgacgagctc gcccgcaagc
 4561 tggctgcatt gggcatcaat gccgtggcct actaccggcg tcttgacgtg tctgtcatcc
 4621 cgaccagcgg cgatgtgtgc gtocgtgtoga ccgatgctct catgactggc tttaccggcg
 4681 acttgcactc tgtgatagac tgcaacacgt gtgtcactca gacagtogat ttcagccttg
 4741 acctacctt taccattgag acaaccacgc tccccagga tgctgtctcc aggactcaac
 4801 gccggggcag gactggcagg gggagccag gcactctacag atttgtggca ccgggggagc
 4861 gccctccgg catgttcgac tccgtccgtcc tctgtgagtg ctatgacggc ggctgtgctt
 4921 ggtatgagct cacgcccgc gagactacag ttaggctacg agcgtacatg aacaccccgg
 4981 ggcttccgt gtgccaggac catcttgaat tttggaggg cgtctttacg ggctcactc
 5041 atatagatgc ccactttcta tcccagacaa agcagagtgg ggagaacttt ccttacctgg
 5101 tagcgtacca agccaccgtg tgcgctaggg ctcaagcccc tccccatcg tgggaccaga
 5161 tgtggaagtg tttgatccgc cttaaaccca ccctccatg gccaacaccc ctgctatata
 5221 gactggcgc tghtcagaat gaagtcacc tgacgcaccc aatcaccaaa tacaatcoga
 5281 catgcatgct ggcgcagctg gaggctgctc cgagcacctg ggtgctcgtt ggcggcgtcc **NS4A**
 5341 tggctgctct ggccgcgtat tgccctgtcaa caggetgctg ggtcatagtg ggcaggattg
 5401 tcttgtccgg gaagccggca attatacctg acagggaggt tctctaccag gacttogatg
 5461 agatggaaga gtgctctcag cacttaccgt acatcgagca agggatgatg ctcgctgagc **NS4B**
 5521 agttcaagca gaaggccctc ggctcctgct agaccgcgtc ccgccaagca gaggttatca
 5581 ccctgttctg ccagaccaac tggcagaaac tgcgagctct ctggcggaag cacaagtgga
 5641 atttcatcag tgggatacaa taacttggcg gctgtcaac gctgctgggt aaccccgcca
 5701 ttgcttcaat gatggctttt acagctgccc tcaccagccc actaacact ggccaacccc
 5761 tcctcttcaa catattgggg ggggtgggtg ctgccagct cgccgcccc ggtgccccta
 5821 ccgcttctg ccgctgctggc tttagctggcg ccgcatcg cagcgttggga ctgggggag
 5881 tcctcgtgga cattcttga gggatggcg cggcgctggc gggagctctt gtagcattca
 5941 agatcatgag cggtaggctc ccctccacgg aggcctggt caatctgctg cccgcatcc
 6001 tctgcctgg agcccttga tgcggtgtgg tctgcgcagc aatactggc cggcacgttg
 6061 gccgggcga gggggcagtg caatggatga accggcta atgccttgc tcccgggga
 6121 accatgttcc ccccacgcac tacgtgccc agagcgtatg agccgccc gtcactgcca
 6181 tactcagcag cctcactgta acccagctcc tgaggcgact gcactagtg ataagctcgg **NS5A**
 6241 agtgtaccac tccatgctcc ggttccctgg taaggacat ctgggactgg atatgagag
 6301 tgcctgagca ctttaagacc tggctgaaag ccaagctcat gccacaact cctgggattc
 6361 cctttgtgct ctgccagcgc gggataggg gggctctggcg aggagacgcg attatgcaca
 6421 ctgcctgcca ctgtggagct gagatcactg gacatgtcaa aaacgggacg atgaggatcg
 6481 tccgtccctg gacctgcagg aacatgtgga gtgggacgtt ccccattaac gcctacacca
 6541 cgggcccctg tactcccctt cctgcccga actataagtt cgcgctgtgg aggggtgctc
 6601 cacagaaata cgtggagata agccgggtg gggacttcca ctactatcg ggtatgacta
 6661 ctgacaatct taaatgcccg tgccagatcc catcgcccga atttttcaca gaattggacg
 6721 gggtagcct acataggttt gcgcccctt gcaagccctt gctgcccggg gaggtatcat
 6781 tcagagttag actccacgag tacccgggtg ggtcgaatt accttgcgag cccgaaccgg
 6841 acgtagcctg gttgacgtcc atgcctacca taccctcca tataacagca gaggcggcg
 6901 ggagaaggtt ggcgagaggg tcaccccctt ctatggccag ctccctggcc agccagctgt
 6961 ccgctccatc tctcaaggca acttgcaacc ccaaccatga ctcccctgac gccagctca
 7021 tagaggctaa cctcctgtg aggcaggaga tgggcggcaa catcaccagg gttgagtcag
 7081 agaacaagt ggtgattctg gactccttcg atccgctgtt ggcagaggag gatgagcgg
 7141 aggtctccgt accgcagaa attctgcgga agtctcggag attcggcccgg gccctgcccg
 7201 tttgggcccg gccggactac aacccccgc tagtagagac gtggaaaaag cctgactacg
 7261 aaccacctg ggtccatggc tgcccgcctc cacctccacg gtcccctctt gtgctcccg
 7321 ctcggaataa cgttacgggt gctcctaccg atcaaccct atctactgcc ttggccgagc
 7381 ttgccaccaa aagttttggc agctcctcaa cttccggcat tacggggagc aatacgaca
 7441 catcctctga gcccgcccct tctggctgcc ccccgcactc cgacgttgag tctattctt
 7501 ccatgcccc cctggagggg gagcctgggg atccggatct cagcagcggg tcatggtcga
 7561 cgttcagtag tggggccgac acggaagat tctgtgtctg ctcaatgtct tattcctgga **NS5B**
 7621 caggccact cgtcaccocg tgcgctgccc aagaacaaaa actgccatc aaccgactga
 7681 gcaactcgtt gctacgccat cacaatctgg tgtattccac cacttccgc agtgcttggc
 7741 aaaggcagaa gaaagtcaaa tttgacagac tgcaagttct ggacagccat taccaggagc
 7801 tgcctcaagga ggtcaaaagca cggcgctcaa aagtgaaggc taacttgcta tccgtagagg
 7861 aagcttgcag cctgacgccc ccacattcag ccaaatccaa gtttgctat gggcaaaaag
 7921 acgtccgttg ccatgccaga aaggccgtag cccacatcaa ctccgtgtgg aaagacctc
 7981 tggagacag tgaacacca atagacacta ccatcatggc caagaacgag gttttctgcg
 8041 ttcagcctga gaaggggggt cgtaagccag ctgctctcat cgtgttccc gacctgggcg
 8101 tgcgctgtg cgagaagatg gccctgtacg acgtggttag caagctccc ctggcctgga
 8161 tgggaagctc ctacggatcc caatactcac caggacagcg ggttgaattc ctctgcaag
 8221 cgtggaagtc caagaagacc ccgatgggggt tctcgtatga taccgctgt tttgactcca
 8281 cagtcactga gagcgacatc cgtacggagg aggcaattta ccaatgttgt gacctggacc
 8341 cccaagccc cgtggccatc aagtcctca ctgagaggct ttatgttggg ggccctctta
 8401 ccaattcaag ggggaaaaac tgccgctacc gcagggtgccc cgcgaggggc gtactgaca
 8461 ctagctgtgg taacaccctc acttgtctaca tcaaggccc ggccagcctgt cgagccgag
 8521 ggtccaggca ctgcaccatg ctogtgtgtg gcgacgact agtcgttatc agtgaaagt
 8581 cgggggtcca ggaggacggc gcgaccctga gaccctcac ggaggctatg accaggtact
 8641 ccgccccccc cggggacccc ccacaaccag aatacgaact ggagcttata acatcatgct
 8701 cctccaacgt gtcagtccc cagcagcggc ctggaagag ggtctactac cttaccctg
 8761 accctacaac cccctcgg agagcccgct gggagacagc aagacacat ccagtcatt
 8821 cctggctag caacataatc atgtttgccc ccacactgtg ggcgaggtg atactgata
 8881 ccaatttctt tagcgtctc atagccaggg atcagcttga acaggtctt aactgtgaga
 8941 tctacggagc ctgctactcc atagaaccac tggatctacc tccaatcatt caaagactcc

9001 atggcctcag cgcattttca ctccacagtt actctccagg tgaaatcaat aggggtggccg
 9061 catgcctcag aaaacttggg gtcccgcctt tgcgagcttg gagacaccgg gccccggagcg
 9121 tccgcgctag gcttctgtcc agaggaggca gggctgccat atgtggcaag tacctcttca
 9181 actgggcagt aagaacaaag ctcaaaactca ctccaatagc ggccgctggc cggctggact
 9241 tgcocggttg gttcacggct ggctacagcg ggggagacat ttatcacagc gtgtctcatg
 9301 cccggccccg ctggttctgg ttttgcctac tctgtctcgc tgcaggggta ggcatctacc
 9361 tcttccccaa ccgatgaagg ttggggtaaa cactccggcc tcttaggcca tttctgttt 3' UTR
 9421 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttttttttct tttttttttt
 9481 ttttttctct tttttttttt ttttttttct ttccttcttt tttcttttct tttcttctct
 9541 tctttaatgg tggctccatc ttagccctag tcacggctag ctgtgaaagg tccgtgagcc
 9601 gcatgactgc agagagtgtc gatactggcc tctctgcaga tcatgt

8.7 Monocistronisches HCV Replikon-Genotyp 1b

1 gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg HCV IRES 1b
 61 tcttcaagca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaaggac
 121 cccccctccc gggagagcca tagtggctcg cggaaccggg gtagtacaccg gaattgccag
 181 gacgaccggg tcttttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc
 241 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgttact gcctgatagg
 301 gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgtg gaccgtgcac catgagcagc aatcctaacc
 361 ctcaa agaa aaaccaaacy taacaccaac gggcgcgcca tgaaaaagcc tgaactcacc
 421 gcgacgtctg tcgagaagtt tctgatcgaa aagttcgaca gcgtctccga cctgatgcag
 481 ctctcggagg gcgaagaatc tctgtctttc agcttcgatg taggagggcg tggatatgtc
 541 ctgcccggtaa atagctgcgc cgatggtttc tacaagatc gttatgttta tcggcacttt
 601 gcatcggccc cgtcccgatg tccggaagtg cttgacattg gggaaattcag cgagagcctg
 661 acctattgca tctcccgcgc tgcacagggg gtcacgttgc aagacctgcc tgaaaccgaa
 721 ctgcccctg tctgcagcc ggtcgcggag gccatggatg cgatecgtgc ggccgatctt
 781 agccagacga gcgggttcgg cccattcggg ccgcaaggaa tccgtcaata cactacatgg
 841 cgtgatttca tatgcgcgat tgcgtatccc catgtgtatc actggcaaac tgtgatggc
 901 gacaccgtca gtgcgtccgt cgcgcaggct ctcgatgagc tgatgctttg ggccgaggac
 961 tgcccgaag tccggcacct cgtgcacgcy gatttcggct ccaacaatgt cctgacggac
 1021 aatggcccga taacagcggg cattgactgg agcagaggca tggttcgggga ttccaatac
 1081 gaggtcggca acatcttctt ctggaggccg tggttggctt gtatggagca cgacagcgc
 1141 tacttcgagc ggaggeatcc ggagcttgcg ggatcggccg ggctccgggc gtatatgctc
 1201 cgcattggtc ttgaccaact ctatcagagc ttggttgacg gcaatttcga tgatgcagct
 1261 tgggcgcagg gtcgatcgca cgcaatcgtc cgatecggag ccgggactgt cgggcgtaca
 1321 caaatgcgcc gcagaagcgc ggccgtctgg accgatggct gtgtagaagt tctcgcgat
 1381 agtggaaaacc gacgccccag cactcgtccg gatcgggaga tgggggaggc taacggttta
 1441 aacatgcaga tcttcgtgaa gaccctgacg ggcaagacca tcaactctga ggtcagccc
 1501 agtgacacca tcgagaatgt caaggccaag atccaagaca aggaaggcat cccacctgac
 1561 cagcagaggc tgatattcgc gggcaaacag ctggaggatg gccgcacctc gtcgactac
 1621 aacatccaga aagagtccac cttgcacctg gtgctcgtc tcccggtgg NS3 **tgccctatt**
 1681 acggcctact cccaacagac gcgaggccta cttggctgca tcatcactag cctcacaggc
 1741 cgggacagga accaggtcga gggggaggtc caagtgtct ccaccgcaac acaatctttc
 1801 ctggcgacct gcgtcaatgg cgtgtgttgg actgtctatc atggtgcccg ctcaagacc
 1861 cttgcggccc caaagggccc aatcacccaa atgtacacca atgtggacca ggacctcgtc
 1921 ggctggcaag cgcgccccgg ggccgcttcc ttgacaccat gcacctgccc cagctcggac
 1981 ctttacttgg tcacgaggca tgcccgatgtc attccggtgc gccggcgggg cgacagcagg
 2041 gggagcctac tctcccacg gcccgctctc tacttgaagg gctcttoggg cggctccactg
 2101 ctctgcccc tctgcaacc tctgtgcaatc tttcgggctg ccgtgtgccc ccagggggtt
 2161 gcgaaggcgg tggactttgt acccgtcgag tctatgggaa ccactatgcy gtcccccgtc
 2221 ttacgggaca actcgtcccc tccggccgta ccgcagacat tccaggtggc ccatctacac
 2281 gccctactg ttagcggcaa gacactaag gtgcccggct cgatecagc ccaagggtat
 2341 aaggtgcttg tctgaacc cctgcctgcc gccaccctag gtttcggggc gtatatgtct
 2401 aaggcacatg gtatcgacc taacatcaga atcggggtaa ggaccatcac cacgggtgcc
 2461 cccatcacgt actccacctg tggcaagttt cttgcccagc gtggttgcctc tgggggccc
 2521 tatgacatca taatattgta tgagtgcac tcaactgact cgaccactat cctgggcatc
 2581 ggacagtc tggaccaagc ggagacggct ggagcgcgac tctcgtgct cgcaccgct
 2641 acgctcctgg gatcggctac cgtgcacat ccaaacatcg aggaggtggc tctgtccagc
 2701 actggagaaa tccccttta tggcaagcc atcccctcag agaccatcaa gggggggagg
 2761 cacctcattc tctgccatc caagaagaaa tgtgatgagc tcgcccggaa gctgtcccgc
 2821 ctoggactca atgtctagc atattacogg ggcctttagt tatccgtcat accaactagc
 2881 ggagacgtca ttgtcgtagc aacggacgct ctaatgacgg gctttaaccg tgacttcgac
 2941 tcagtgatog actgcaatac atgtgtcacc cagacagtcg acttcaagcct ggaccogacc
 3001 ttaccattg agacgacgac cgtgccacaa gacgcggtgt cacgctogca gcggcgaggc
 3061 aggatggta ggggcaggat gggcatttac aggttttga ctccaggaga acggccctcg
 3121 ggcatgttgc atctcctggg tctgtgcgag tgctatgacg cgggctgtgc ttggatcgag
 3181 ctacgcccgc ccgagacctc agtttaggtg cgggcttacc taacacacc agggttgcc
 3241 gctcggcagg accatctgga gttctgggag agcgtcttta caggctcac ccacatagac
 3301 gccctttct tgtcccagc taagcaggca ggagacaact tcccctacct ggtagcatac
 3361 caggctacgg tgtgcgcgag ggtcaggct ccacctccat cgtgggacca aatgtggaag
 3421 tgtctcatac ggctaaagcc taogctgcac gggccaacgc cctcgtgta taggtggga

3481 gccgttcaaa acgaggttac taccacacac cccataacca aatacatcat ggcatgcatg
 3541 tccggtgacc tggaggtcgt caccgagcacc tgggtgctgg taggcggagt cctagcagct **NS4A**
 3601 ctggcccgct attgcctgac aacaggcagc gtgggtcattg tgggcaggat catcttctcc
 3661 ggaagcggt ccatcatcct cgacagggaa gtcctttacc gggagtccga tgagatggaa
 3721 gagtgcgcct cacacctccc ttacatcgaa cagggaatgc agctcgccga acaattcaaa **NS4B**
 3781 cagaaggcaa tccgggttgt gcaaacagcc accaagcaag cggaggotgc tgctcccgctg
 3841 gtggaatcca agtggcgagc catcgaaagcc ttctgggcga agcatatgtg gaatttcac
 3901 agcgggatac aatatttagc aggcttctcc actctgctg gcaaccocgc gatagatca
 3961 ctgatggcat tcacagctc tatcaccagc ccgctcacca cccaacatac cctcctgttt
 4021 aacatcctgg ggggatgggt ggcgcgcaa cttgctcctc ccagcgotgc ttctgcttcc
 4081 gtaggcgccg gcatcgctgg agcggctgtt ggcagcatag gccttgggaa ggtgcttctg
 4141 gatattttgg caggttatgg agcaggggtg gcagggcggc tctgtgctt taaggtcatg
 4201 agcggcgaga tgccctccac cgaggacctg gttaacctac tccctgctat cctctcccct
 4261 ggcgcccctag tctgctgggt cgtgtgcgca gcgatactgc gtcggcacg tgggcccaggg
 4321 gagggggctg tgcagtggat gaaccggctg atagcgttcg cttcggggg taaccacgctc
 4381 tccccacgc actatgtgct tgagagcgac gctgcagcac gtgtcaacta gatcctctc
 4441 agtcttaccg tcaactcagct gctgaagagg cttcaccagt ggatcaacga ggactgtctc **NS5A**
 4501 accccatgct ccggctcgtg gctaagagat gtttgggatt ggatatgcac ggtgttgact
 4561 gatttcaaga cctggctcca gtccaagctc ctgcccggat tgcccggagt ccccttcttc
 4621 tcatgtcaac gtgggtacaa gggagctctg cggggcgacg gcatcatgca aaccacctgc
 4681 ccatgtgtgg cacagatcac cggacatgtg aaaaacgggt ccatgaggat cgtgggctc
 4741 aggacctgta gtaaacgtg gtaacacgtg tccccatta acgctgacac cacgggcccc
 4801 tgcacgcct ccccgcgcc aaattattct agggcgctgt ggcggtggc tgcctgaggg
 4861 tacgtggagg ttacgcggtt gggggatttc cactactgta cgggcatgac cactgacgac
 4921 gtaagtgcc cgtgtcaggt tccggcccc gaattcttca cagaagtga tgggtgctg
 4981 ttgcacaggt acgctccagc gtgcaaaccc ctcctacggg aggaggtcac attcctggtc
 5041 gggctcaatc aatacctggt tgggtcacag ctcccagtc agcccgaacc ggatgtagca
 5101 gtgctcactt ccatgtctac cgacccctcc cacattacgg cggagacggc taagcgtagg
 5161 ctggccaggg gatctctccc ccccttggcc agctcatcag ctagccagct gctgctgctc
 5221 tccctgaaag caacatgcac taccctcat gactccccg acgctgacct catcgaggc
 5281 aacctcctgt ggcggcagga gatggggcgg aacatcacc gcgtggagtc agaaaataag
 5341 gtatgtaatt tggactctt cgagccgctc caagcggagg aggatgagag ggaagtatcc
 5401 gttccggcgg agatcctgag gaggctcagg aaattctctc gagcgtgac cataatggga
 5461 cgcccggatt acaaccctcc actgttagag tccctgaaag acccggacta cgtccctcca
 5521 gtgttacac ggtgtccatt gccgctgcc aaggccctc cgataccacc ttcacggagg
 5581 aagaggacgg ttgtcctgtc agaactctacc gtgtctctct ccttggcgga gctcgccaca
 5641 gagacctctg gcagctccga atcgtcggcc gtcgacagcg gcacggcaac ggcctctcct
 6001 gaccagcct cgacagcgg cgacgggga tccgacgttg tccgactctc agtcgactc
 6061 ccccttgagg gggagccgg ggatcccgat ctcagcgac ggtcttggtc taccgtaagc
 6121 gaggaggcta gtgaggcgt cgtctgctgc tccatgtcct acacatggac aggcgcctg **NS5B**
 6181 atcacgcat gcgctcgga ggaaccaag ctgcccatac atgcaactgag caactctttg
 6241 ctccgtcacc acaacttgg ctatgttaca acatctcgca ggcgaagcct gggcagaag
 6301 aaggctacct ttgacagact gcagctctg gacgaccact accgggacgt gctcaaggag
 6361 atgaaggcga aggcgtccac agttaaggct aaactctat ccgtggagga agcctgtaag
 6421 ctgacgcccc cacattcggc cagatctaaa tttggctatg gggcaagga cgtccggaac
 6481 ctatccagca aggcggttaa ccacatcgc tccgtgtgga aggacttgc ggaagacact
 6541 gagacaccaa ttgacaccac catcatggca aaaaaatgagg tttctgctg gctccagag
 6601 aagggggccc gcaagccagc tccgcttatc gtattcccag atttgggggt tctgtgtg
 6661 gagaaaaatg cctttacga tgtgtctccc accctcccctc aggcctgat gggctcttca
 6721 tacggattcc aatactctcc tggacagcgg gtcgagtctc tgggtgaaagc ctggaagc
 6781 aagaaatgccc ctatggctt ccgcatatgac acccgctgtt ttgactcaac ggtcactgag
 6841 atgacatccc gtgttgagga gtoaatctac caatgttgtg acttggcccc ogaagccaga
 6901 caggccataa ggtcgtccac agagcggctt tacatcgggg gcccccctgac taattctaaa
 6961 gggcagaact gcggtatcg ccggtgccc gcgagcgggt tactgaogac cagctgctg
 7021 aataccctca catgttactt gaagccgct gcgccctgtc gagctgcccga gctccaggac
 7081 tgcacgatgc tctgtatcgg agacgacctt gtcgttatct gtgaaagcgc ggggacccaa
 7141 gaggacgagg cgagcctacg ggccttccag gaggctatga ctagatactc tgccccctc
 7201 ggggaccgac ccaaacccaga atacgacttg gagttgataa catcatgctc ctccaatgtg
 7261 tcagtcgcgc acgatgcac tggcaaaagg gtgtactatc tcaccogtga ccccaccac
 7321 ccccttgcgc gggctgcgtg ggagacagct agacacactc cagtcaatc ctggctaggc
 7381 aacatcatca tgtatgcgcc caccttgtgg gcaaggatga tccctgatgac tcatttctc
 7441 tccatccttc tagctcagga acaactgaa aaagccctag attgtcagat ctacggggcc
 7501 tgttactcca ttgagcact tgacctacct cagatcttcc aacgactcca tggccttagc
 7561 gcattttcac tccatagtta ctctccaggt gagatcaata ggggtggctc atgctcagg
 7621 aaacttgggg taccgcccct gcgagctctg agacatcggg ccagaagtgt ccgctctagg
 7681 ctactgtccc agggggggag ggtgcccact tgtggcaagt acctcttcaa ctgggcagta
 7741 aggaccaagc tcaaacctac tccaatccc gctgcgtccc agttggatt atccaagtg
 7801 ttcgttctg gttacagcgg gggagacata tctcacagcc tgtctctgct cccgccccgc
 7861 tggttcatgt ggtgcctact cctactttct gtaggggtag gcatctatct actccccaac
 7921 cgtgaaacgg ggagctaaac actccaggcc aatagccat cctgtttttt tccctttttt
 7981 tttttctttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ctcttttttt tttctctttt
 8041 ttttcttttt ctttcttttt gttgctccat cttagcccta gtcacggcta gctgtgaaag
 8101 gtcctgtgac cgcttgactg cagagagtgc tgatactggc ctctctgacg atcaagtact

3' UTR

9. Abkürzungen

Ak	Antikörper
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
eIF	eucaryotic initiation factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FL	Firefly Luciferase
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HCC	Hepatozelluläres Carcinom
HuR	Human Antigen R
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
IRF	Interferon Regulatory Factor
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
IL	Interleukin
LB	Luria Broth
MACS	Magnetic Antibody Cell Sorting
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute
MOPS	3-(N-morpholino)pronsulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
NS5B	Nichtstrukturprotein 5B
OD	optische Dichte

ORF	Oping Reading Frame
PBS	Phosphat-buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PSMA7	Proteasome Alpha-Subunit 7
pSR	Plasmid Suppressor Retro
PTB	Polypyrimidine Tract Binding Protein
RL	Renilla Luciferase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribodesoxynuklease
RT	Reverse Transcription
Rz	Ribozym
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit (Einheit)
UTR	Untranslated Region
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Lebenslauf

Name:	Mortimer Korf
Geburtsdatum:	6. September 1967
Geburtsort:	Hannover
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
1974 – 1978	Grundschule Auf dem Loh, Hannover
1978 – 1980	Orientierungsstufe Büssingweg, Hannover
1980 – 1984	Geschwister-Scholl-Realschule, Hannover
1984 – 1989	Gymnasium Herschelschule, Hannover
Mai 1989	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
August 1989 – Januar 1992	Ausbildung zum Versicherungskaufmann bei der Magdeburger Versicherung AG
Januar 1992 – Juli 1992	Sachbearbeiter bei der Magdeburger Versicherung AG im Bereich HUK-Statistik (Datenverarbeitungsbeauftragter)
August 1992 – Oktober 1993	Zivildienst / bzw Ausbildung im Rettungsdienst beim Deutschen Roten Kreuz Hannover-Stadt
November 1993 – Sep 1995	Angestellter im Rettungsdienst beim Deutschen Roten Kreuz Hannover-Stadt
Oktober 1995 – April 2000	Studium an der Universität Hannover im Fachbereich Biologie/Diplom
April 2000	Diplomprüfung in den Prüfungsfächern Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Virologie
Mai 2000 – April 2001	Diplomarbeit mit dem Thema „ Die Rolle von Asp 417 im humanen C3a-Rezeptor für Liganden- und Antagonisten-bindung “ am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover bei Prof. Dr. Dr. Wilfried Bautsch
Mai 2001 – Dezember 2001	Angestellter im Rettungsdienst beim Deutschen Roten Kreuz Hannover-Stadt

- Seit Januar 2002 Wissenschaftlicher Angestellter in der Gastroenterologie/
Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen
Hochschule Hannover im Bereich der Hepatitis C Virus-
Forschung und Promotion zum Thema „**Inhibition der
Replikation und Translation eines subgenomischen
Hepatitis C Virus Replikons durch HCV RNA- und
Kofaktor-gerichtete Strategien**“)
09. Juni 2005 Disputation zur Erlangung des Grades „Doktor der
Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)“

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikationen: **Korf M., Jarczak D., Beger C., Manns M.P., Krüger M.** *Inhibition of Hepatitis C Virus translation and subgenomic replication by siRNAs against highly conserved HCV sequence and cellular HCV cofactors*, accepted, Journal of Hepatology (2005)

Tischendorf J.J.W., Beger C., Korf M., Manns M.P., Krüger M. *Polypyrimidine tract-binding protein (PTB) inhibits Hepatitis C virus internal ribosome entry site (HCV IRES)- mediated translation, but does not affect HCV replication*, Arch Virol. 2004 Oct;149(10):1955-70

Jarczak D., Korf M., Beger C., Manns M.P., Krüger M. *Hairpin ribozymes combined with siRNAs against highly conserved HCV sequence strongly inhibit RNA replication and protein translation from Hepatitis C Virus subgenomic replicons*, submitted, European journal of Biochemistry (2004)

Abstracts: **Korf M., Jarczak D., Manns M.P., Krüger M.** *Inhibition of Hepatitis C Virus translation and subgenomic replication by small interfering RNAs directed against cellular RNA binding proteins*, J Hepatol. 2004; suppl.1; 40(1):21(58).

Korf M., Jarczak D., Manns M.P., Krüger M. *Small interfering RNAs targeting highly conserved regions inhibit Hepatitis C Virus translation and replication*, J Hepatol. 2004, suppl.1; 40(1):119 (400).

Jarczak D., Korf M., Manns M.P., Krüger M. *Inhibition of Hepatitis C Virus subgenomic replication by constitutive Transport element (CTE)-linked ribozymes directed against the HCV internal ribosomal entry site (IRES) and the untranslated region (UTR)*, J Hepatol. 2004, suppl.1; 40(1):10 (28)

Korf M., Manns M.P., Krüger M. *Combined HCV cofactor directed siRNAs significantly enhance the inhibitory effect of single siRNAs on Hepatitis C Virus subgenomic replication and translation*, Journal of Hepatology 2005, suppl. 1; 42(1):160 (441)

Korf M., Jarczak D., Manns M.P., Krüger M. *Combinations of hairpin ribozymes and siRNAs targeting highly conserved regions strongly inhibit RNA replication and translation from subgenomic HCV replicons*, Journal of Hepatology 2005, suppl. 1; 42(1):161 (442)

Korf M., Jarczak D., Manns M.P., Krüger M. *Inhibition of HCV subgenomic replication by constitutive transport element (CTE)-linked ribozymes targeting highly conserved 5'- und 3'-untranslated regions*, GfV; Annual Meeting 2005, 475..

Korf M., Jarczak D., Manns M.P., Krüger M. *Hairpin ribozymes increase inhibitory effects of siRNAs on HCV subgenomic replication*, GfV, Annual Meeting 2005, 476.

Danksagungen

Zunächst möchte ich mich bei **PD Dr. Martin Krüger** für die Ermöglichung meiner Promotion in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie bedanken. Bedanken möchte ich mich dabei auch für ein jederzeit gutes Arbeitsklima und viel Humor. Bedanken möchte ich mich auch bei **Dr. Carmela Beger** für die vorübergehende Bereitstellung von 12 Monaten Forschungsgelder für meine BAT2a/2- Stelle, die die Fertigstellung meiner Dissertation garantierten.

Bedanken möchte ich mich vor allem auch bei **Dominik Jarczak**, der in der Zeit meiner Promotion ein guter Freund geworden ist. Durch den immerwährenden hohen Gute-Laune-Index und die fantastische Zusammenarbeit haben wir eine ganze Menge erreicht. Rückschläge, das Wort mit „S“ und etliche nervige Situationen konnten uns nie entmutigen, sondern haben uns immer wieder vorwärts getrieben.

Aus ganz tiefem Herzen bedanken möchte ich mich bei meiner geliebten **Danny, Daniela Klingebiel**, die mich während meiner Promotion immer unterstützt hat, immer an meiner Seite war und mir sehr viel Kraft und Liebe gegeben hat. Bedanken möchte ich mich dabei ebenso für lange erholsame Spaziergänge mit interessanten botanischen und zoologischen Entdeckungen und Erkenntnissen jenseits der Molekularbiologie.

Großer Dank und große Ehre gebührt meinen Eltern, **Marlies** und **Reinhard Prokesch**, die mich ebenfalls in jeder Hinsicht unterstützt haben, immer an mich geglaubt haben und durch die alles erst möglich geworden ist.....

Hannover, 01.12.2004

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „**Inhibition der Replikation und Translation eines subgenomischen Hepatitis C Virus Replikons durch HCV RNA- und Kofaktor-gerichtete Strategien**“ eigenständig angefertigt habe und keine außer den angegebenen Quellen als Hilfsmittel verwendet habe.

Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, den 01. Dezember 2004

Mortimer Korf