

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Institut für Biochemie und Biotechnologie



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

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Anika Penzel

geboren am 22.11.1984 in Schkeuditz

öffentlich verteidigt am 05.10.2015

Gutachter: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens
Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier
Prof. Dr. Gregor Meyers

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Hepatitis-C-Virus.....	1
1.1.1	Phylogenetische Einordnung des Hepatitis-C-Virus	1
1.1.2	Der flavivirale Lebenszyklus	2
1.1.3	Genomorganisation des HCV.....	4
1.1.4	Das HCV- Replikonsystem.....	5
1.2	Die Interferon-Antwort	6
1.3	Die Regulation der VEGF-A-Expression.....	8
1.4	Vorarbeiten	11
1.5	Zielstellung	13
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Kulturmedien und Antibiotika zur Kultivierung von Bakterien und humanen Zelllinien.....	15
2.1.2	Bakterienstämme und deren Kultivierung.....	16
2.1.3	Humane Zelllinien und deren Kultivierung	16
2.1.4	Längenstandards	17
2.1.5	Ribonukleosidtriphosphate und Desoxyribonukleosidtriphosphate	17
2.2	Methoden	18
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	18
2.2.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien mit TRIZOL	18
2.2.1.2	cDNA-Erststrangsynthese.....	18
2.2.1.3	<i>in vitro</i> Transkription.....	19
2.2.1.4	Reinigung von RNA aus Reaktionsansätzen	19
2.2.1.5	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	20
2.2.1.6	Restriktionshydrolyse von DNA	21
2.2.1.7	Dephosphorylierung von 5´Phosphatgruppen	21
2.2.1.8	Phosphorylierung von 5´Hydroxylgruppen.....	21
2.2.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten	21
2.2.1.10	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	21
2.2.1.11	Präparation von Plasmid-DNA	22
2.2.1.12	DNA-Sequenzierung	23
2.2.1.13	PCR (<i>polymerase chain reaction</i>) zur Amplifikation von DNA	23
2.2.1.13.1	Standard-PCR.....	23
2.2.1.13.2	Ortsgerichtete Mutagenese (<i>site directed mutagenesis</i>)	24
2.2.1.13.3	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	24
2.2.1.14	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	26
2.2.1.15	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	26
2.2.2	Arbeiten mit humanen Zellkulturen	27

2.2.2.1	Transfektion von humanen Zelllinien	27
2.2.2.1.1	Kationische Polymer-vermittelte Transfektion von siRNAs und Plasmid-DNA.....	27
2.2.2.1.2	Elektroporation von Luciferase-Reporter-RNA und viraler RNA.....	27
2.2.2.2	Actinomycin D-Assay und Actinomycin D-Endpunkt-Assay	28
2.2.2.3	Induktion von ER-Stress durch Tunicamycin	29
2.2.2.4	Hemmung der zellulären Translation durch Cycloheximid	29
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	30
2.2.3.1	Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten aus humanen Zelllinien	30
2.2.3.2	Herstellung von cytoplasmatischen Extrakten und Kernextrakten aus humanen Zelllinien	30
2.2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	32
2.2.3.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.2.3.5	Nachweis von Proteinen	32
2.2.3.5.1	Western-Blot	33
2.2.3.5.2	Indirekte Immunfluoreszenz.....	33
2.2.3.5.3	Nachweis der Translationseffizienz von Luciferase-Reporter-RNAs.....	34
2.2.4	Statistische Auswertung	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Verwendung von Replikonsystemen	36
3.2	Die Degradation der VEGF-A-mRNA kann mittels Actinomycin D-Assay analysiert werden.....	39
3.3	Untersuchung der zellulären und viralen Komponenten, welche an der HCV-induzierten Stabilisierung der VEGF-A-mRNA beteiligt sind.....	42
3.3.1	Die Proteine PKR und RIG I sind an der HCV-induzierten Stabilisierung der VEGF-A-mRNA beteiligt.....	42
3.3.2	Die transiente Replikation des HCV-Replikons induziert in Huh7-Zellen die Phosphorylierung von PKR und eIF2 α	45
3.3.3	Die simultane Transfektion des WNV- und des HCV-mut-Replikons induziert die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA.....	47
3.3.4	Die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA kann in Huh7-Zellen, in denen das WNV- Replikon transient repliziert, durch Tunicamycin induziert werden.....	51
3.3.5	Die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung kann in der persistenten HCV-Zelllinie durch Phosphorylierung von eIF2 α rekonstituiert werden.....	53
3.3.6	Die simultane Transfektion des WNV-Replikons und der HCV-IRES induziert die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA.....	57
3.3.7	Die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA ist kein HCV-spezifischer Effekt	60
3.3.8	Die IFN β -Antwort korreliert mit der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung	65
3.3.8.1	Induktion der IFN β -Antwort durch die Replikation des HCV- und WNV-Replikons.....	65
3.3.8.2	Die Überexpression von IFN β induziert die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA.....	67
3.3.8.3	Die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung wird durch JAK1 vermittelt.....	68
3.4	Funktion von TIA-1 bei der viral induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung	69
3.4.1	TIA-1 ist für die IFN β -induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung nicht essentiell..	70
3.4.2	TIA-1 ist in Huh7-Zellen, in welchen das HCV-Replikon transient repliziert, an der Induktion von IFN β beteiligt.....	72
3.4.3	TIA-1 ist Huh7-Zellen, in welchen das HCV-Replikon transient repliziert, an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt	73

3.4.3.1	Die Replikation des HCV-Replikons in Huh7-Zellen hat keinen Einfluss auf die I κ B- α -mRNA-Stabilität	78
3.4.3.2	TIA-1 hat keinen Einfluss auf die Degradation von I κ B- α	79
3.4.3.3	TIA-1 ist in transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Huh7-Zellen an der Inhibition der Translation der I κ B- α -mRNA beteiligt	81
4	Diskussion	84
4.1	Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung durch virale RNA	84
4.2	Abhängigkeit der HCV-induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung von PKR und RIG I	87
4.3	Die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA steht in Zusammenhang mit der Interferon β -Antwort	95
4.4	Die Rolle von TIA-1 für die HCV-induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung	101
4.5	Die Regulation der VEGF-A-Expression	105
4.6	Modell der HCV-induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung.....	106
5	Ausblick.....	109
6	Zusammenfassung	111
7	Literaturverzeichnis.....	114
8	Anhang	135
8.1	Verwendete Oligonukleotide und siRNAs	135
8.2	Verwendete Antikörper	137
8.3	Verwendete Plasmide und deren Konstruktion	137
8.4	VEGF-A-mRNA-Halbwertszeit.....	140
8.5	Nachweis von ER-Stress in Huh7-Zellen	142

Abkürzungsverzeichnis

Chemikalien (z.B. NaOH), Enzymbezeichnungen (z.B. Xhol), Maßeinheiten (z.B. min, g, m), die Nukleobasen (A, C, G, T), sowie Länder (z.B. D, USA) bzw. Bundesstaaten (z.B. CA, NY) sind nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt. Aus dem Englischen und Lateinischen übernommene Begriffe, sowie Gennamen werden in der vorliegenden Arbeit kursiv dargestellt. Komplexe zusammengesetzte Begriffe werden zur besseren Lesbarkeit durch einen Bindestrich getrennt.

<i>ad</i>	lat. „zu“
ARE	engl. <i>adenosine-uridine-rich element</i>
ATF-2/c-Jun	engl. <i>activating transcription factor-2/cellular v-jun homolog</i>
AUG	Translationsstartcodon
bp	Basenpaare
Bcl-xL	engl. <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i>
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe-Virus
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cap	m ⁷ GpppG am 5'Ende von RNA
CARD	engl. <i>caspase recruitment domain</i>
CAT-1	engl. <i>cationic amino acid transporter-1</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
cDNA	engl. <i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
c-fos	engl. <i>cellular FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
CHOP	engl. <i>C/EBP homologous protein</i>
CIAP1	engl. <i>cellular inhibitor of apoptosis 1</i>
CMV	Cytomegalovirus
cp	engl. <i>cytopathic</i>
c _t	engl. <i>cycle treshold</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
C-terminal	Carboxy-terminal
CTP	Cytidintriphosphat
Cyr61	engl. <i>cysteine-rich angiogenic inducer 61</i>
DAPI	4,2-Diamino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DR	engl. <i>downstream interferon receptor</i>
E	engl. <i>envelope</i>
<i>E. coli</i>	lat. <i>Escherichia coli</i>
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Reticulum

ERN1	engl. <i>endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1</i>
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i>
FCS	fetales Kälberserum
Flag-	Protein mit <i>Flag-tag</i>
Flag- <i>tag</i>	Aminosäuresequenz DYKDDDDK
G418	Geneticin
GADD34	engl. <i>growth arrest and damage-inducible protein 34</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCN2	engl. <i>general control non-derepressible kinase 2</i>
GFP	engl. <i>green fluorescent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
GLUT-1	engl. <i>glucose transporter-1</i>
GM-CSF	engl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GRP78	engl. <i>glucose-regulated protein 78</i>
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O _{dd}	Doppelt destilliertes, deionisiertes Wasser
H ₂ O _Σ	RNase-freies Wasser
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDV	Hepatitis-D-Virus
Hek	engl. <i>human embrionic kidney</i>
HeLa	Henrietta Lacks (Helen Lane)
HIF-1	engl. <i>hypoxia-inducible-factor-1</i>
HRI	engl. <i>heme-regulated inhibitor kinase</i>
HSR	engl. <i>hypoxia stability region</i>
Huh	engl. <i>human hepatocellular carcinoma</i>
HuR	engl. <i>human antigen R</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IFNAR	engl. <i>interferon alpha, beta and omega receptor</i>
IgG	Immunglobulin G
IκB	engl. <i>inhibitor of NF-κB</i>
IKK _i	engl. <i>IκB-kinase i</i>
IRES	engl. <i>internal ribosome entry site</i>
IRF	engl. <i>interferon regulatory factor</i>
ISRE	engl. <i>interferon-stimulated regulatory element</i>
IU	IκB-α-UTR
JAK	Janus-Kinase
JFH	engl. <i>Japanese fulminant hepatitis</i>
kb	kilo Basen
lat.	lateinisch
LB (-Medium)	engl. <i>lysogeny broth (-Medium)</i>
Luci	Luciferase
MAP-Kinase	engl. <i>mitogen activated protein kinase</i>
MAVS	engl. <i>mitochondrial anti-viral signaling protein</i>
MDA5	engl. <i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
mRNP	engl. <i>messenger ribonucleoprotein</i>
mta	engl. <i>material transfer agreement</i>
mut	Mutante
Mx	engl. <i>myxovirus resistance</i>
NEB	New England Biolabs
NEFM	engl. <i>neurofilament M</i>
Neo	Neomycin-Phosphotransferase II
NF-κB	engl. <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NIID	National Institute of Infectious Diseases

NRF	engl. <i>NF-κB repressing factor</i>
NS	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid(e)
N-Terminus	Amino-Terminus
N-terminal	Amino-terminal
OAS	2'-5'Oligoadenylat-Synthetasen
OD	optische Dichte
OD _x	optische Dichte bei x nm
ORF	engl. <i>open reading frame</i>
-P	phosphoryliert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	engl. <i>pathogen associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PERK	engl. <i>PKR-like endoplasmatic reticulum kinase</i>
Pim1	engl. <i>proto-oncogen serine/threonin-protein kinase 1</i>
PKR	engl. <i>protein kinase R</i>
PPP1R15B	engl. <i>phosphoprotein regulatory subunit 15B</i>
PR	engl. <i>prion related</i>
PRR	engl. <i>pattern recognition receptor</i>
<i>p.t.</i>	lat. <i>post transfectionem</i>
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptions-PCR
RBD	engl. <i>RNA binding domain</i>
RBP	engl. <i>RNA binding protein</i>
RdRP	engl. <i>RNA dependent RNA-polymerase</i>
RIG I	engl. <i>retinoic acid-inducible gene I</i>
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i>
RNAi	engl. <i>RNA interference</i>
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RRM	engl. <i>RNA recognition motifs</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SG	Stress Granula
SGR	engl. <i>subgenomic replicon</i>
sgRNA	subgenomischen RNA
Sin-Replikon	Sindbis-Replikon
siRNA	engl. <i>short interfering RNA</i>
SL	engl. <i>stem loop</i>
ss	engl. <i>single stranded</i>
STAT	engl. <i>signal transducers and activators of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TBK	engl. <i>TANK-binding kinase 1</i>
TIA-1	engl. <i>T-cell restricted intracellular antigen 1</i>
TIA-1vl	humanes TIA-1, Isoform 1 (kürzere Isoform)
TIA-1vlI	humanes TIA-1, Isoform 2 (längere Isoform)
TIAR	engl. <i>TIA-1-related protein</i>
tRNA	engl. <i>transfer RNA</i>
TYK2	engl. <i>tyrosine kinase 2</i>
U	engl. Unit(s)
u.a.	unter anderem
ÜE	Überexpression
UPR	engl. <i>unfolded protein response</i>
UR	engl. <i>upstream interferon receptor</i>
UTR	untranslatierte Region

UV	ultraviolett
VEGF-A	engl. <i>vascular endothelial growth factor-A</i>
VEGFR	engl. <i>VEGF-receptor</i>
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
VRS	engl. <i>VEGF regulatory segment</i>
v/v	engl. <i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w	engl. <i>weight</i> (Masse)
WHO	engl. <i>World Health Organization</i>
WNV	West-Nil-Virus
WT	Wildtyp
w/v	engl. <i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
XIAP	engl. <i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>
z.B.	zum Beispiel

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

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

1 Einleitung

Die Regulation der zellulären Genexpression ist ein vielschichtiger und komplexer Vorgang und umfasst verschiedene Prozesse wie die Transkription, die Prozessierung, den Transport und die Translation der mRNA. Sie unterscheidet sich nicht nur von Zelltyp zu Zelltyp, sondern muss auch zeitlich und situativ auf die jeweiligen Bedingungen der Zelle angepasst werden. Vor allem der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression wird in den vergangenen Jahren eine immer größere Bedeutung zugeschrieben. Sie trägt entscheidend zur Reaktionsfähigkeit einer Zelle auf veränderte Bedingungen bei, da sie häufig eine wesentlich schnellere Reaktion gestattet, als die Regulation der Transkription. Die Regulation der posttranskriptionellen Genexpression wird von RNA-bindenden Proteinen (RBPs) und kleinen RNAs (z.B. mikroRNAs) vermittelt und kann die Stabilität, subzelluläre Lokalisation und Translation von RNAs beeinflussen. Im Kontext viraler Infektionen tragen zur differenziellen Genexpression sowohl virale, als auch zelluläre Mechanismen bei. Dabei sind die viralen Veränderungen meist darauf ausgerichtet, die zellulären Prozesse zum eigenen Vorteil zu manipulieren, während die zellulären Veränderungen in der Regel der Induktion eines antiviralen Status dienen. Im Zuge der Evolution haben sich komplexe Wechselbeziehungen zwischen Viren und ihren Wirtszellen entwickelt, welche entscheidend für die Ausbildung und Pathogenese viraler Infektionen sind. Auch das Hepatitis-C-Virus (HCV), welches in dieser Arbeit von zentralem Interesse war, bewirkt umfassende Veränderungen der zellulären Genexpression in den Wirtszellen. Besonders unter Beachtung der Tatsache, dass das HCV zu meist persistierende Infektionen hervorruft, welche zu chronischer Hepatitis und der Entwicklung hepatozellulärer Karzinome führen können, ist das Verständnis der viral induzierten differentiellen Genexpression der Wirtszellen von entscheidender Bedeutung.

1.1 Das Hepatitis-C-Virus

1.1.1 Phylogenetische Einordnung des Hepatitis-C-Virus

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) ist ein Vertreter der Familie der *Flaviviridae*, welche den (+)-Strang-RNA-Viren zugeordnet wird. Phylogenetisch werden die *Flaviviridae* in die vier Genera *Pestivirus*, *Flavivirus*, *Hepacivirus*, sowie die erst kürzlich zugeordnete Gattung *Pegivirus* unterteilt (Calisher *et al.* 2003, Simmonds 2013, Stapleton *et al.* 2011). Dabei ist die Gattung *Flavivirus*, welche weiter in die beiden Kategorien *mosquito-borne* (von Stechmücken übertragen) und *tick-borne* (von Zecken übertragen) unterteilt wird, die größte der vier Gattungen. Sie umfasst auch wichtige humanpathogene Vertreter wie das Japanische Encephalitis-Virus, das Gelbfieber-Virus, das Dengue-Virus und das West-Nil-Virus (WNV). Zur Gattung

Pestivirus werden überwiegend tierpathogene Vertreter wie das *Border-disease-Virus*, das Virus der klassischen Schweinepest und das Virus der bovinen viralen Diarrhoe (BVDV) zugeordnet. Zur Gattung *Pegivirus* gehört unter anderem das Hepatitis-G-Virus. Die Typspezies der Gattung *Hepacivirus* stellt das HCV dar. Es ist aufgrund von ca. 130-150 Millionen chronisch infizierten Personen und etwa 350.000 - 500.000 jährlichen Todesfällen weltweit von großer Bedeutung (WHO, 2014). Das HCV wird aufgrund starker Polymorphismen in 6 Genotypen (1 - 6) mit über 80 Subtypen unterteilt (Simmonds *et al.* 2005).

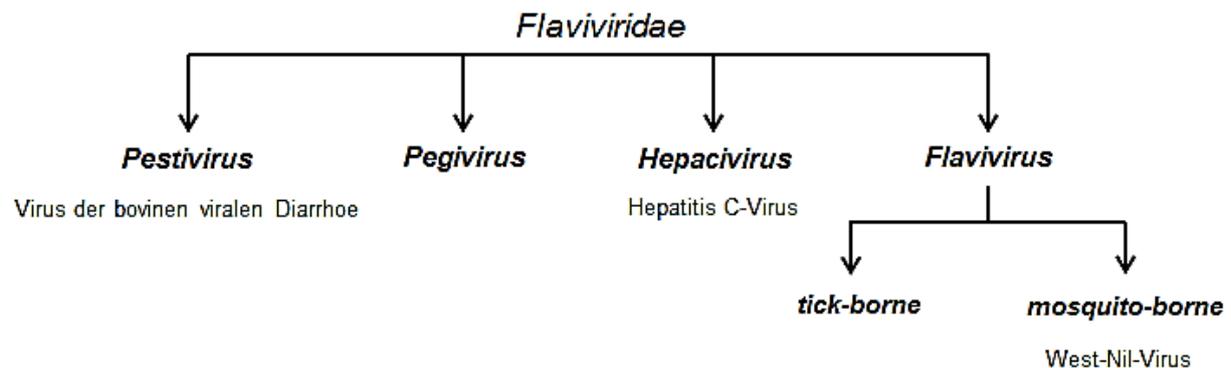


Abbildung 1.1: Die Virusfamilie der *Flaviviridae*. Die Virusfamilie der *Flaviviridae* wird phylogenetisch in die Genera *Pestivirus*, *Pegivirus*, *Hepacivirus* und *Flavivirus* unterteilt, wobei die Gattung *Flavivirus* weiterhin in die Kategorien *tick-borne* und *mosquito-borne* gegliedert wird. Beispielfhaft sind jene Vertreter aufgeführt, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Bedeutung waren (BVDV, HCV und WNV).

1.1.2 Der flavivirale Lebenszyklus

Die verschiedenen Vertreter der *Flaviviridae* sind gekennzeichnet durch zahlreiche gemeinsame Charakteristika. Sie vermehren sich im Cytoplasma der Wirtszelle innerhalb eines pH-Spektrums von 7 bis 9 und bilden Virionen mit einem Durchmesser von etwa 40 bis 60 nm. Das positiv orientierte einzelsträngige RNA-Genom ist von einem ikosaedrischen Kapsid umschlossen, welches wiederum von einer Lipid-Doppelmembran umgeben ist, in die verschiedene Glykoproteine eingelagert sind (Petersen *et al.* 2001). Nach Adsorption der Viruspartikel an die Oberfläche der Wirtszellen gelangen diese durch Rezeptor-vermittelte Endocytose in das Zellinnere (Blanchard *et al.* 2006) (Abbildung 1.2). Dabei interagieren die verschiedenen Vertreter der *Flaviviridae* mit spezifischen Zelloberflächen-Rezeptoren. Der niedrige pH-Wert in den endosomalen Vesikeln vermittelt die Freisetzung des Nukleokapsids in das Cytoplasma der Wirtszelle, woraufhin im Zuge des *uncoating* (Dissoziation von genomischer RNA und *core*-Protein) die virale RNA freigesetzt wird (Allison *et al.* 1995, Koutsoudakis *et al.* 2006, Tscherne *et al.* 2006).

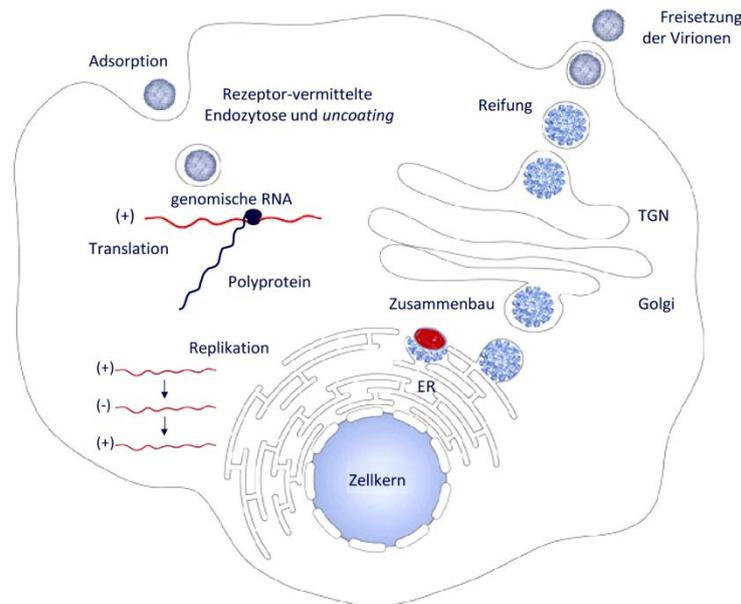


Abbildung 1.2: Der flavivirale Lebenszyklus. Nach Adsorption an die Zelloberfläche werden die Virionen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert. Die genomische (+)-Strang-RNA wird in das Cytoplasma der Wirtszelle freigesetzt und dient dort zum einen als Matrize für die Translation der viralen Proteine am ER und zum anderen als Template für die Synthese eines (-)-Strang-Intermediates während der viralen Replikation. Das virale Polyprotein wird durch zelluläre und virale Proteasen in einzelne Proteine gespalten, die für die Replikation der viralen RNA und die Assemblierung neuer Viruspartikel essentiell sind. Die neuen Virionen, welche im Lumen des ER formiert werden, werden über Exocytose aus der Wirtszelle freigesetzt. Abbildung aus (Friedrich 2014), modifiziert nach (Mukhopadhyay *et al.* 2005).

Aufgrund ihrer positiven Polarität erfüllt die virale RNA drei verschiedene Funktionen. So dient sie zum einen als Matrize für die Translation, welche an den Membranen des endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgt und in der Synthese eines einzelnen Polyproteins resultiert (Lindenbach 2007, Moradpour *et al.* 2004). Dieses wird co- und posttranslational durch virale und zelluläre Proteasen in die einzelnen viralen Proteine gespalten. Zum anderen wird die genomische RNA als Template für die Replikation der viralen RNA verwendet. Die Replikation der *Flaviviridae* erfolgt in membrangebundenen Replikationskomplexen (Lindenbach 2007). Es ist für zahlreiche Vertreter der *Flaviviridae* bereits gezeigt worden, dass im Zuge der viralen Infektion die zelluläre Membrankonstellation durch komplexe Prozesse verändert wird, in die verschiedene virale Proteine involviert sind (den Boon *et al.* 2010b, Egger *et al.* 2002, Gosert *et al.* 2003, Hugle *et al.* 2001, Miller *et al.* 2008). Die virale RdRP (*RNA-dependent RNA-polymerase*) synthetisiert innerhalb dieser Replikationskomplexe zunächst ein (-)-Strang-RNA-Intermediat, welches anschließend als Template für die Synthese neuer (+)-Strang-RNA-Moleküle dient. Neben den viralen Proteinen sind auch zelluläre Faktoren an der Replikation beteiligt (Lindenbach 2007, Moriishi *et al.* 2007). In ihrer dritten Funktion als genetisches Material wird die genomische RNA in neue Viruspartikel verpackt. Die im Lumen des ER assemblierten neuen Viruspartikel werden über Exocytose aus der Zelle freigesetzt (Lindenbach 2007).

1.1.3 Genomorganisation des HCV

Das HCV-Genom besteht, wie bereits erwähnt, aus einer einzelsträngigen (+)-Strang-RNA, welche einen einzigen ORF (*open reading frame*) enthält. Dieser wird am 5' und 3' Ende von nicht translatierten Regionen flankiert (UTR-*untranslated region*). Das Genom des HCV (Abbildung 1.3) umfasst etwa 9,6 kb, wobei die Länge bei verschiedenen Genotypen leicht variiert. Die 5'UTR ist hoch konserviert und enthält eine *internal ribosome entry site* (IRES), welche die cap-unabhängige Translations-Initiation an der HCV-RNA vermittelt (Brown *et al.* 1992, Wang *et al.* 1993, Wang *et al.* 1994). IRES-Elemente wurden sowohl in viralen als auch in zellulären RNAs identifiziert und können je nach RNA sowohl Translations-Initiationsfaktoren als auch direkt ribosomale Untereinheiten rekrutieren. Die HCV-3'UTR besteht aus einer variablen Region, einer Poly-U/UC-Sequenz und einer 98 nt langen hochkonservierten Region (3'X), welche für eine effiziente Replikation essentiell ist (Kolykhalov *et al.* 1996, Tanaka *et al.* 1996).

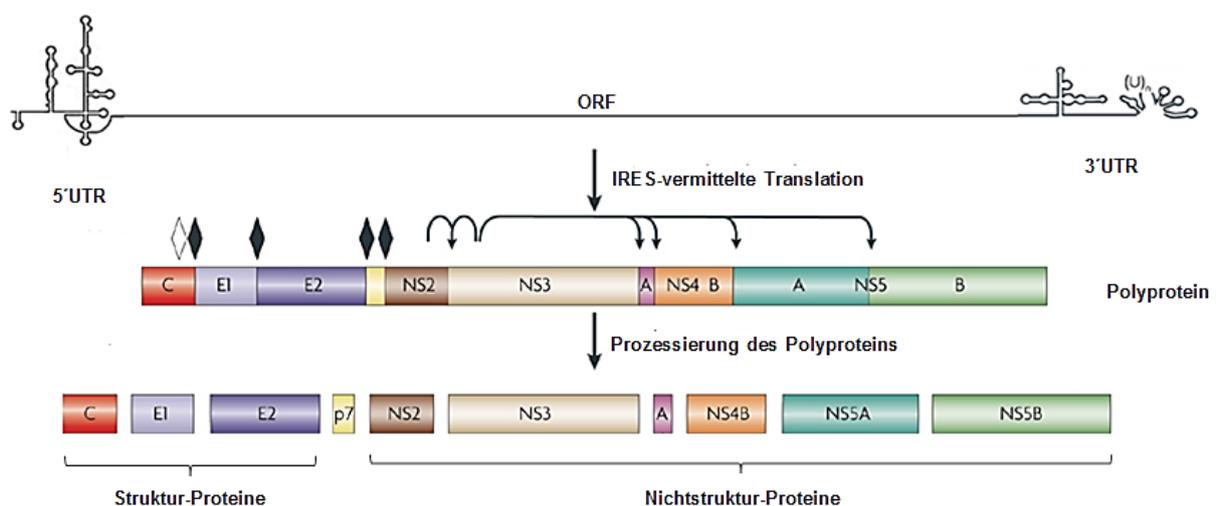


Abbildung 1.3: Genomorganisation des HCV. Das (+)-Strang-RNA-Genom des HCV (ca. 9,6 kb) besteht aus einem einzelnen ORF, welcher von einer 5'UTR und einer 3'UTR flankiert wird. Der ORF codiert für ein Polyprotein, welches co- und posttranslational durch zelluläre (gekennzeichnet durch Rauten) und virale Proteasen (gekennzeichnet durch Pfeile) in einzelne virale Proteine gespalten wird. Dabei entstehen die Struktur-Proteine (C, E1, E2), welche u.a. für die Assemblierung der Virionen essentiell sind und die Nichtstruktur-Proteine (NS2 bis NS5B) welche u.a. die Replikation der viralen RNA vermitteln. Die postulierte Sekundärstruktur der UTRs ist angedeutet (schwarze Linien). Abbildung modifiziert nach (Moradpour *et al.* 2007).

Das Genom codiert, wie bereits beschrieben, für ein Polyprotein, welches co- und posttranslational durch virale und zelluläre Proteasen gespalten wird. Dadurch entstehen zum einen die Struktur-Proteine, welche an der Assemblierung der viralen Partikel und am Viruseintritt in die Wirtszelle beteiligt sind (Basu *et al.* 2004, Lindenbach *et al.* 2005, Meyer *et al.* 2004). Allen Vertretern der *Flaviviridae* gemeinsam ist das *core*-Protein (C), welches das Nukleocapsid formiert und somit das Genom umschließt (Lindenbach *et al.* 2003, Lindenbach 2007). Beim HCV werden die weiteren Strukturproteine als E1 und E2 (E: *envelope*) bezeichnet (Basu *et al.* 2004, Lindenbach *et al.* 2005, Meyer *et al.* 2004). Des Weiteren codiert

der HCV-ORF für die Nichtstruktur-Proteine NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B, sowie für das nur 7 kDa große p7-Protein, welches selbstassemblierende selektive Kationenkanäle bildet (z.B. in der ER-Membran) (Griffin *et al.* 2003, Luik *et al.* 2009, OuYang *et al.* 2013, Pavlovic *et al.* 2003). Die Nichtstruktur-Proteine sind an zentralen Prozessen während des viralen Lebenszyklus beteiligt, wie der Replikation der viralen RNA, der Prozessierung des viralen Polyproteins und der Assemblierung der Virionen. Für die Prozessierung des viralen Polyproteins sind die Proteine NS2/NS3 und NS3 essentiell, wobei NS2/NS3 durch Autoproteolyse die Proteine NS2 und NS3 generiert (Grakoui *et al.* 1993a, Grakoui *et al.* 1993b, Grakoui *et al.* 1993c, Hijikata *et al.* 1993). Die Spaltung der NS2-NS3-Bindung ist für die Replikation und die Infektiosität des HCV von entscheidender Bedeutung (Kolykhalov *et al.* 2000, Welbourn *et al.* 2005). Das NS3-Protein, welches NS4A als Cofaktor benötigt (Pang *et al.* 2002), spaltet die Bindungen zwischen allen weiteren Nichtstruktur-Proteinen (NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A und NS5A-NS5B) (Bartenschlager *et al.* 1993, Bartenschlager *et al.* 1995, Bartenschlager *et al.* 2000, Eckart *et al.* 1993, Manabe *et al.* 1994). Des Weiteren ist NS3 an der viralen Replikation beteiligt (Pang *et al.* 2002). Es besitzt zusätzlich zu der N-terminal lokalisierten Serin-Proteinase-Domäne eine C-terminale Helikase-Domäne. NS5A ist ein für die Replikation essentieller Faktor und beeinflusst die Aktivität der RdRP NS5B. Des Weiteren stellt NS5A einen Schlüsselfaktor bei der Regulation der Wirtszell-Aktivität während der HCV-Infektion dar und inhibiert unter anderem die Typ I-Interferon-Antwort durch Inhibition der STAT1-Phosphorylierung, sowie der Expression Interferon-stimulierter Gene (vgl. Kapitel 1.2) (Gong *et al.* 2001, Kang *et al.* 2010, Kumthip *et al.* 2012, Lan *et al.* 2007). NS5B stellt die RdRP des HCV dar und ist in der Lage die Replikation der HCV-RNA *de novo* zu initiieren (Behrens *et al.* 1996, Ivashkina *et al.* 2002, Luo *et al.* 2000, Ranjith-Kumar *et al.* 2002). Das Fehlen einer Korrekturlese-Funktion resultiert in hohen Mutationsraten während der viralen Replikation, wodurch Quasispezies mit hoher genetischer Variabilität entstehen (Simmonds 1995). Dies erweist sich als vorteilhaft für das Virus, da es die Entwicklung von Resistenzen gegenüber der zellulären Immunantwort sowie antiviralen Medikamenten erleichtert (Domingo *et al.* 1985).

1.1.4 Das HCV- Replikonsystem

Die Untersuchung der Translation und Replikation von (+)-Strang-RNA-Viren ist durch die Entwicklung sogenannter Replikonsysteme stark erleichtert worden. Diese subgenomischen viralen RNA-Moleküle codieren für alle RNA-Sequenzen und viralen Proteine, die für eine autonome Replikation in der Wirtszelle notwendig sind. Da sie jedoch nicht für die zur Synthese neuer Viruspartikel notwendigen Strukturproteine codieren, sind Replikons nicht infektiös (Behrens *et al.* 1998, Khromykh *et al.* 1997). Sie stellen deshalb z.B. für Untersuchungen

der viralen Replikations- und Translationsmechanismen ein entscheidendes Werkzeug dar. Der Prototyp des HCV-Replikonsystems wurde aus einem HCV-1b-Isolat entwickelt (Lohmann *et al.* 1999). Mittlerweile stehen jedoch auch Replikonsysteme anderer HCV-Genotypen zur Verfügung, unter anderem auch des 2a-Genotyps (Kato *et al.* 2003). Das HCV-2a-Replikon, welches im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, basiert auf einem HCV-Genom, welches aus einem japanischen Patienten mit fulminanter Hepatitis-C isoliert wurde und deshalb als JFH1 (*japanese fulminant hepatitis-C 1*) bezeichnet wird. Das JFH1-Replikon repliziert sehr effizient in immortalisierten humanen Leberzelllinien, wie der Huh7-Zelllinie (*human hepatocellular carcinoma*) (Kato *et al.* 2003, Lohmann *et al.* 1999). Auf Grundlage dieses Isolats konnten erstmals auch infektiöse HCV-Gesamt-Genome generiert werden, mit welchen der komplette Lebenszyklus des HCV (inklusive der Bildung infektiöser Viruspartikel) in Zellkultur-Experimenten rekonstituiert werden kann (Wakita *et al.* 2005). Auch für andere Vertreter der Familie der *Flaviviridae* wurden Replikonsysteme etabliert, unter anderem für das WNV (Shi *et al.* 2002) und das BVDV (Behrens *et al.* 1998), welche beide im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Replikonsysteme kann den Kapiteln 3.1 und 3.3.7 entnommen werden.

1.2 Die Interferon-Antwort

Virale Infektionen induzieren die angeborene Immunantwort. Zu den zentralen Komponenten der angeborenen Immunantwort gehören die Interferone (IFN), welche erstmals im Jahre 1957 beschrieben wurden (Isaacs *et al.* 1957a, Isaacs *et al.* 1957b). Interferone gehören zu den Cytokinen und stellen multifunktionale Signalmoleküle dar, deren Wirkung zur Induktion eines antiviralen Status in den infizierten, sowie den umgebenden Zellen führen und/oder die Effektorzellen des Immunsystems beeinflussen kann. Dabei ist das IFN β von besonderer Bedeutung, da es als Reaktion auf die Erkennung von Pathogenen sehr schnell produziert wird und somit als die „*first line of defense*“ angesehen werden kann. Die viral induzierte IFN β -Synthese verläuft biphasisch, wobei in der frühen Phase zunächst die IFN β -Transkription induziert wird. Dabei werden anfangs nur geringe Mengen IFN β produziert und sekretiert. Anschließend bindet dieses IFN β an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche und induziert eine Signalkaskade. Die späte Phase ist durch eine positive Rückkopplung gekennzeichnet, da, ausgelöst durch die IFN β -induzierte Signalkaskade, Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, welche die IFN β -Transkription verstärken (Abbildung 1.4).

Bei der Induktion der zellulären Immunantwort wird die Präsenz sogenannter PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*, z.B. die bei viralen Infektionen vorkommende dsRNA) von molekularen Sensor-Proteinen (*pattern recognition receptors* - PRRs) erkannt. Diese

umfassen zum einen die membrangebundenen *toll like*-Rezeptoren (TLR) (Akira *et al.* 2006, Iwasaki *et al.* 2004) und zum anderen lösliche cytoplasmatische Rezeptoren, deren wichtigste Vertreter das *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG I) und das *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) sind (Kang *et al.* 2002, Silverman *et al.* 2003, Yoneyama *et al.* 2004, Yoneyama *et al.* 2007). Diese beiden miteinander verwandten Proteine besitzen eine C-terminale DexD/H-Box RNA-Helikase-Domäne, durch welche sie an doppelsträngige RNA (dsRNA) binden können, sowie zwei N-terminale CARD-Domänen (*caspase recruitment domain*), welche die Signaltransduktion durch Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren vermitteln (Kawai *et al.* 2005, Seth *et al.* 2005, Yoneyama *et al.* 2005). Die Erkennung der HCV-RNA durch RIG I erfolgt hauptsächlich durch zwei Eigenschaften, welche zelluläre RNAs nicht besitzen: die Triphosphat-Struktur am 5'Ende der viralen RNA, sowie längere poly-Uridin-Motive in der 3'UTR (Hornung *et al.* 2006, Pichlmair *et al.* 2006, Schmidt *et al.* 2009, Schnell *et al.* 2012, Yoneyama *et al.* 2004). Ein weiteres cytoplasmatisches Sensor-Protein stellt die Protein Kinase R (PKR) dar, welche durch Bindung an dsRNA aktiviert wird und ebenfalls an der Induktion von IFN β beteiligt ist (Diebold *et al.* 2003, McAllister *et al.* 2009, McAllister *et al.* 2012).

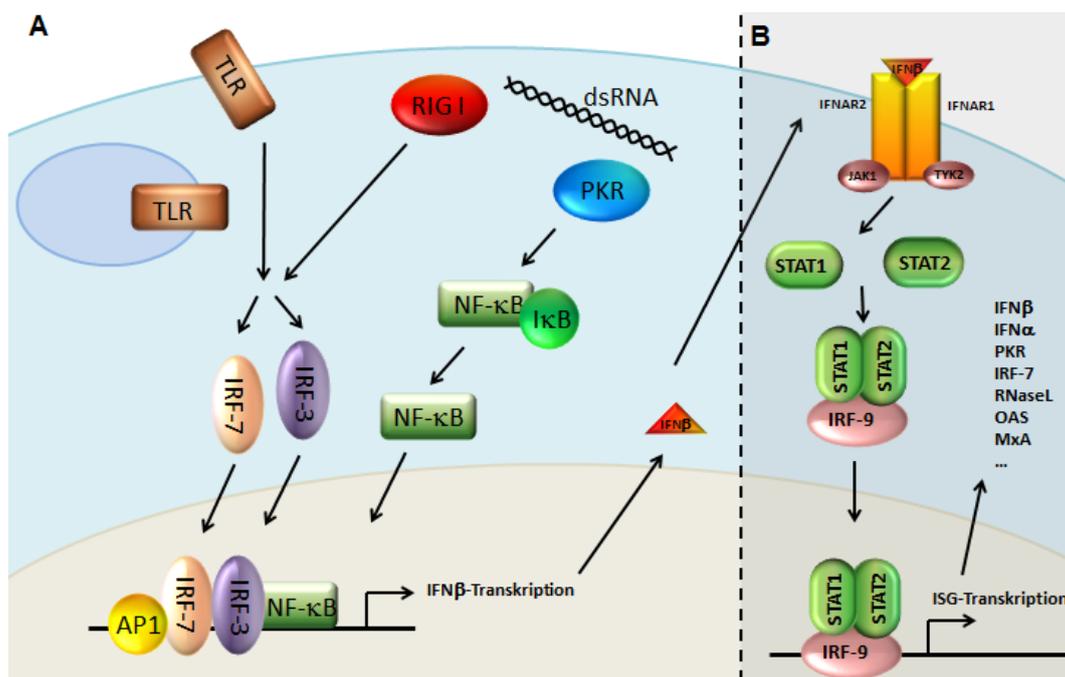


Abbildung 1.4: Der IFN β -Signalweg. Schematische Darstellung des biphasischen IFN β -Signalwegs. (A) Die Erkennung viraler PAMPs (z.B. dsRNA) durch PRRs (z.B. RIG I, TLRs, PKR) resultiert in der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (IRF-3, NF- κ B, AP1), welche kooperativ an den Promotor des *IFN β* -Gens binden und somit dessen Transkription induzieren. Synthetisiertes IFN β wird sekretiert und (B) kann anschließend an spezifische IFN-Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden. Die intrazellulären Domänen der Rezeptoren sind mit JAK-Kinasen assoziiert, welche die Signalweiterleitung durch Phosphorylierung der STATs vermitteln. Aktivierte STATs translozieren in den Zellkern und stimulieren die Transkription verschiedener ISGs.

Die Pathogen-Erkennung durch PRRs konvergiert bei der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren [IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*), NF- κ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*), ATF-2/c-Jun (*activating transcription factor-2/cellular v-jun homolog*)], welche Bestandteil des sogenannten IFN β -Enhanceosoms sind (Maniatis *et al.* 1998, Munshi *et al.* 1999). Dieser multimere Proteinkomplex bindet an den IFN β -Promotor und induziert die IFN β -Transkription. IFN β bindet an einen spezifischen heterodimeren Rezeptorkomplex, welcher aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 (*interferon alpha, beta and omega receptor 1 und 2*) besteht (de Weerd *et al.* 2007).

Der kanonische, von diesem Rezeptor ausgehende Signalweg soll im Folgenden näher erläutert werden (Abbildung 1.4 B). IFNAR1 und IFNAR2 besitzen im Gegensatz zu vielen anderen Rezeptoren keine intrinsische Kinase-Aktivität (de Weerd *et al.* 2007). Stattdessen sind ihre intrazellulären Domänen mit Tyrosin-Kinasen der Janus-Familie assoziiert (JAK). Die Bindung der Typ I-Interferone an den IFNAR resultiert in der gegenseitigen Aktivierung dieser JAK-Kinasen, welche im Folgenden STAT1 und STAT2 (*signal transducers and activators of transcription*) phosphorylieren und somit aktivieren. Im Komplex mit einem weiteren Transkriptionsfaktor (*interferon regulatory factor 9*, IRF-9) (Bluyssen *et al.* 1996, Darnell *et al.* 1994, Haque *et al.* 1994) translozieren die STATs in den Zellkern und können dort an spezifische DNA-Sequenzmotive (ISRE: *interferon-stimulated regulatory element*) binden und die Transkription induzieren (Kessler *et al.* 1990, Williams 1991). Es wurden bereits hunderte Gene identifiziert, die sich durch die Präsenz von ISREs in ihren Promotoren charakterisieren lassen. Es sollen hier jedoch nur einige wenige genannt werden, welche aufgrund ihrer antiviralen Wirkung von besonderem Interesse sind.

Zu den wesentlichen durch IFN induzierten Genen (*interferon stimulated genes*- ISG) gehört *IRF-7*, welches an den IFN β -Promotor binden und somit die IFN β -Transkription verstärken kann (Marie *et al.* 1998, Sato *et al.* 1998, Sato *et al.* 2000). Weitere typische ISGs stellen die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetasen (OAS), die Mx-Proteine (*myxovirus resistance*), sowie die bereits erwähnte PKR dar (Thomis *et al.* 1992). Die wohl wichtigste Funktion der PKR repräsentiert die Phosphorylierung von eIF2 α (*eukaryotic initiation factor 2 α*), wodurch die Translations-Initiation inhibiert wird (Hershey 1989, Hershey 1991, Sudhakar *et al.* 2000). Dies resultiert zum einen in der Inhibition der viralen Translation und kann zum anderen zur Apoptose-Induktion führen, wodurch die virale Ausbreitung eingeschränkt wird.

1.3 Die Regulation der VEGF-A-Expression

VEGF-A (*vascular endothelial growth factor-A*) repräsentiert das am besten charakterisierte Mitglied der Familie der VEGFs. Die VEGF-A-Expression wird durch eine große Bandbreite verschiedener Stimuli beeinflusst. So wird sie unter anderem durch Hypoxie, Hypoglykämie

und die Stimulation mit verschiedenen Cytokinen (z.B. IFN β) induziert (Cohen *et al.* 1996, Dolecki *et al.* 1991, Li *et al.* 1995, Pertovaara *et al.* 1994). Synthetisiertes VEGF-A wird sezerniert und bindet anschließend an verschiedene VEGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Dadurch können diverse Prozesse wie Neo-Vaskularisierung, sowie die Erhöhung der Permeabilität und Proliferation des Endothels induziert werden (Leung *et al.* 1989, Neufeld *et al.* 1994, Park *et al.* 1993, Zhang *et al.* 1995). Des Weiteren wirkt VEGF-A als antiapoptotisches Cytokin (Dias *et al.* 2002, Katoh *et al.* 1998, Katoh *et al.* 1995, Kuramoto *et al.* 2000). Neben seiner prominenten Funktion bei der Angiogenese und Vaskularisierung ist es auch in andere physiologische und pathologische Prozesse wie die Embryonalentwicklung, Wundheilung und Kanzerogenese involviert (Brown *et al.* 1992, Carmeliet *et al.* 1996, Giraudo *et al.* 1998, Hanahan *et al.* 1996, Hoeben *et al.* 2004, Ristimaki *et al.* 1998, Shweiki *et al.* 1992). Bei der Tumor-Entwicklung spielt die Angiogenese eine wesentliche Rolle. Da die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen nur über sehr kurze Distanzen gewährleistet ist, ist die Neubildung von Blutgefäßen während des Tumor-Wachstums unerlässlich (Ferrara *et al.* 1996, Hanahan *et al.* 1996). Eine erhöhte VEGF-Expression wurde bereits für zahlreiche Tumorarten nachgewiesen (z.B.: Lungenkrebs, Darmkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Brustkrebs) und korreliert häufig mit einer schlechteren Prognose für die betroffenen Patienten (Carmeliet 2005, Ellis *et al.* 2008, Gasparini 2000, Herbst *et al.* 2005, Kabbinavar *et al.* 2003, Kindler *et al.* 2005).

Das *VEGF-A*-Gen umfasst 7 Introns und 8 Exons. Durch alternatives Spleißen können zahlreiche Isoformen generiert werden, welche sich in ihrer Funktion und Rezeptorspezifität unterscheiden (Bates *et al.* 2002, Delcombel *et al.* 2013, Neufeld *et al.* 1999, Park *et al.* 1993, Poltorak *et al.* 1997). Ursprünglich wurde angenommen, dass die VEGF-Aktivität spezifisch auf Endothelzellen restringiert ist. Mittlerweile wurde jedoch nachgewiesen, dass auch viele andere Zelltypen VEGF-Rezeptoren exprimieren und somit durch VEGF beeinflusst werden können. Die Regulation der *VEGF-A*-Expression ist äußerst komplex und wird unter anderem durch die Regulation der Transkription, der mRNA-Stabilität, des Spleißens und der Translation vermittelt (Akiri *et al.* 1998, Levy *et al.* 1998, Onesto *et al.* 2004, Shih *et al.* 1999). Die Regulation der *VEGF-A*-Expression unter Hypoxie ist bereits eingehend untersucht worden und erscheint besonders interessant im Zusammenhang mit der Kanzerogenese. Unter hypoxischen Bedingungen, wie sie auch in Tumorgeweben vorkommen, wird der Transkriptionsfaktor HIF-1 (*hypoxia-inducible-factor 1*) aktiviert, welcher unter anderem die Transkription des *VEGF-A*-Gens induziert (Forsythe *et al.* 1996, Liu *et al.* 1995, Tsuzuki *et al.* 2000). Die erhöhte *VEGF-A*-Expression unter Hypoxie wird sowohl durch die Transkriptions-Induktion als auch durch eine erhöhte mRNA-Stabilität vermittelt (Arcondeguy *et al.* 2013, Claffey *et al.* 1998, Cohen *et al.* 1996, Dibbens *et al.* 1999, Levy *et al.* 1996, Levy 1998,

Shima *et al.* 1995). An den molekularen Mechanismen sind verschiedene RNA-bindende Proteine und auch miRNAs (*microRNAs*) beteiligt (Coles *et al.* 2004, Levy *et al.* 1998, Madanecki *et al.* 2013, Onesto *et al.* 2004, Shih *et al.* 1999, Vumbaca *et al.* 2008).

Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass auch das HCV einen Einfluss auf die *VEGF-A*-Expression ausübt (Abe *et al.* 2012, Nasimuzzaman *et al.* 2007, Ripoli *et al.* 2010). So beschrieben Nasimuzzaman und Kollogen, dass HCV-Infektionen durch Aktivierung verschiedener Signalwege den Transkriptionsfaktor HIF-1 aktivieren können, wodurch die Expression von *VEGF-A* erhöht wird (Nasimuzzaman *et al.* 2007). Dabei beeinflusst die HCV-Infektion die Calcium-Homöostase in den Wirtszellen, wodurch oxidativer Stress induziert wird (Nasimuzzaman *et al.* 2007). Dies wiederum führt zur Stabilisierung der α -Untereinheit von HIF-1, welche in naiven Zellen permanent proteosomally degradiert wird (Kallio *et al.* 1998, Kallio *et al.* 1999). Aufgrund der Stabilisierung von HIF-1 α kann dieses in den Zellkern translozieren, wo es mit der HIF-1- β -Untereinheit dimerisiert und anschließend als Transkriptionsfaktor agiert. Auch zentrale zelluläre Kinasen wie die Akt-Kinase (Protein-Kinase B) und die p42/44-MAP-Kinase (*mitogen activated protein kinase*), sowie die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT3 sind an der HCV-induzierten Stabilisierung von HIF-1 α , sowie der Stimulation der *VEGF-A*-Synthese beteiligt (Nasimuzzaman *et al.* 2007). Ähnliche Resultate wurden auch in anderen Studien erzielt (Abe *et al.* 2012, Hassan *et al.* 2009, Ripoli *et al.* 2010). So konnten Hassan *et al.* sowie Abe *et al.* zeigen, dass das HCV-*core*-Protein über verschiedene Signalkaskaden die *VEGF-A*-Synthese stimuliert (Hassan *et al.* 2009). Diese Autoren beschrieben weiterhin, dass HIF-1 α an diesem Prozess beteiligt ist. Der Einfluss des HCV auf die *VEGF-A*-Expression ist vor allem vor dem Hintergrund von Bedeutung, dass das HCV in der Regel zu chronischen Infektionen führt, welche die Entstehung hepatozellulärer Karzinome hervorrufen kann. Mehrere Studien belegen eine gesteigerte *VEGF*-Synthese in HCV-infizierten Patienten, welche mit einer erhöhten hepatischen Angiogenese einhergeht (Hassan *et al.* 2009, Helaly *et al.* 2006, Mee *et al.* 2010).

Interessanterweise scheint eine erhöhte *VEGF*-Expression die HCV-Transmission zu begünstigen (Mee *et al.* 2010). So konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte *VEGF*-Expression die Integrität von *tight junctions* stört und die hepatozelluläre Polarität reduziert (Mee *et al.* 2010). Diese Veränderungen begünstigen den Eintritt des HCV in die Wirtszellen. Durch Inhibieren des *VEGF*-Signalwegs in Hepatom-Zellen wird die hepatozelluläre Polarität hingegen begünstigt und die Permissivität für das HCV reduziert. Zudem beeinflusst *VEGF* die Lokalisierung und Phosphorylierung des Proteins Occludin (Harhaj *et al.* 2006, Kevil *et al.* 1998, Mee *et al.* 2010, Schmitt *et al.* 2004), welches als essentieller Faktor für das HCV-*entry* bekannt ist (Benedicto *et al.* 2009, Liu *et al.* 2009, Ploss *et al.* 2009). Es wurde postuliert, dass die erhöhte *VEGF*-Synthese HCV-infizierter Zellen neben der erhöhten Angioge-

nese auch eine erhöhte Permissivität der Hepatozyten für das HCV induziert (Mee *et al.* 2010). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten im Lebergewebe chronisch HCV-infizierter Patienten HCV-infizierte Foci nachgewiesen werden (Liang *et al.* 2009).

1.4 Vorarbeiten

Die vorliegende Arbeit stellt eine Fortsetzung der von Fr. Dipl. Biol. Eileen Winkler durchgeführten Studien dar. Zur besseren Verständlichkeit der vorliegenden Arbeit sollen deshalb zunächst die von ihr erarbeiteten Ergebnisse zusammengefasst werden.

Im Zuge ihrer Arbeit untersuchte Fr. Dipl. Biol. Winkler den Einfluss der Replikation des HCV-Replikons JFH1 (vgl. 1.1.4) auf die Expression ausgewählter zellulärer Gene in Huh7-Zellen. Dabei war das *VEGF-A*-Gen von besonderem Interesse, da bereits bekannt war, dass das HCV einen Einfluss auf dessen Expression ausübt (Abe *et al.* 2012, Hassan *et al.* 2009, Nasimuzzaman *et al.* 2007, Ripoli *et al.* 2010) (vgl. Kapitel 1.3). Fr. Dipl. Biol. Winkler konnte erstmals nachweisen, dass die Replikation des HCV-Replikons nach transienter (vorrübergehender) Transfektion in Huh7-Zellen zu einer verringerten Degradation der *VEGF-A*-mRNA führt. Diese Beobachtung indizierte einen bislang unbekanntem Mechanismus, welcher neben der von anderen Autoren beschriebenen verstärkten *VEGF*-Transkription (Abe *et al.* 2012, Nasimuzzaman *et al.* 2007, Ripoli *et al.* 2010) einen Einfluss auf die *VEGF*-Synthese haben könnte. Bei Induktion von oxidativem Stress in den Huh7-Zellen, sowie bei transienter Replikation eines WNV-Replikons konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Dies war eine entscheidende Beobachtung, da WNV und HCV hinsichtlich ihrer Genomorganisation ähnlich und bezüglich ihrer phylogenetischen Einordnung nahe verwandt sind. Deshalb wurde aus den Daten geschlossen, dass der Einfluss auf die Degradation der *VEGF-A*-mRNA einen für das HCV spezifischen Effekt darstellt. Eine erste Charakterisierung der Ursachen des posttranskriptionellen Effekts auf die *VEGF-A*-mRNA war zentraler Punkt der Arbeit von Fr. Dipl. Biol. Winkler.

Zunächst konnte Fr. Dipl. Biol. Winkler zeigen, dass die HCV-induzierte erhöhte Stabilität der *VEGF-A*-mRNA, im Gegensatz zu dem bereits beschriebenen Mechanismus der Hypoxie-induzierten *VEGF-A*-mRNA-Stabilisierung (Claffey *et al.* 1998, Dibbens *et al.* 1999, Levy *et al.* 1998, Shima *et al.* 1995), nicht durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 vermittelt wird.

Des Weiteren wurde die Bedeutung von SGs (Stress Granula) für die beobachtete posttranskriptionelle Regulation der *VEGF-A*-mRNA untersucht. Diese Granula können unter diversen Stress-induzierenden Bedingungen von Zellen gebildet werden und entstehen in der Regel korrelierend mit der Phosphorylierung des eIF2 α -Proteins. Die eIF2 α -Phosphorylierung limitiert die Verfügbarkeit des eIF2-GTP-tRNA^{Met}-Komplexes, wodurch die Translations-Initiation inhibiert wird. Infolgedessen werden Prä-Initiationskomplexe gebildet, denen essen-

tielle Translations-Initiationsfaktoren (eIF2, eIF5) fehlen. Die in den Prä-Initiationskomplexen enthaltenen Transkripte werden von verschiedenen RNA-bindenden Proteinen (RBP) wie TIA-1 (*T-cell restricted intracellular antigen 1*) und TIAR (*TIA-1-related protein*) gebunden, wodurch SGs formiert werden. Sobald die Stress induzierenden Bedingungen nicht mehr präsent sind, disaggregieren die SGs. Da SGs als Orte zur Zwischenspeicherung von mRNAs diskutiert werden (Kedersha *et al.* 2002a, Kedersha *et al.* 2000, Kedersha *et al.* 2005), untersuchte Fr. Dipl. Biol. Winkler im Rahmen ihrer Arbeit, ob die durch die Replikation des HCV-Replikons induzierte verringerte Degradation der VEGF-A-mRNA durch SGs vermittelt wird. Unter anderem wurden Studien mit einer Huh7-Zelllinie durchgeführt, in welcher das HCV-Replikon persistent repliziert (im Folgenden bezeichnet als persistente HCV-Zelllinie; siehe auch Kapitel 2.1.3 und 3.3.5). Dabei ermöglicht die von dem HCV-Replikon vermittelte Geneticin-Resistenz die Selektion Replikon-enthaltender Zellen, wodurch die permanente Replikation des HCV-Replikons in der persistenten HCV-Zelllinie gewährleistet ist. Trotz der dauerhaften Replikation des HCV-Replikons unterschied sich die Degradation der VEGF-A-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie nicht von der in naiven Huh7-Zellen. Es war somit von Interesse, warum die transiente Replikation des HCV-Replikons in Huh7-Zellen zu einer verringerten VEGF-A-mRNA-Degradation führt, nicht jedoch dessen persistente Replikation. Eine Beteiligung der SGs an der verringerten Degradation erschien zunächst plausibel, da bei transientser HCV-Replikation SGs detektierbar waren, nicht jedoch in der persistenten HCV-Zelllinie. Wurde jedoch durch oxidativen Stress in der persistenten HCV-Zelllinie die Formierung von SGs ausgelöst, konnte keine Änderung der VEGF-A-mRNA-Degradation beobachtet werden. Zur weiteren Untersuchung wurden drei wesentlich an der SG-Formierung beteiligte Proteine (TIA-1, TIAR und *GTPase 3 activating binding protein 1*-G3BP1) mittels RNAi in Huh7-Zellen depletiert und diese mit dem HCV-Replikon transient transfiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei Depletion des Proteins TIA-1 die Replikation des HCV-Replikons keinen Einfluss auf die VEGF-A-mRNA-Degradation ausübt. Bei Depletion der Proteine TIAR und G3BP1 konnte dies nicht beobachtet werden. Aufgrund dieser und weiterer Daten, wurde geschlussfolgert, dass nicht die SGs selbst, sondern das für die SG-Formierung bedeutsame Protein TIA-1 einen essentiellen Faktor für die HCV-induzierte verringerte Degradation der VEGF-A-mRNA darstellt. In Übereinstimmung mit diesen Resultaten, wurde auch in anderen Studien beschrieben, dass SGs entgegen der ursprünglichen Annahme von untergeordneter Bedeutung für die Regulation der mRNA-Translation und -Degradation sind (Bley *et al.* 2015, Buchan *et al.* 2009, Hofmann *et al.* 2012, Mokaš *et al.* 2009).

In humanen Zellen existieren zwei Isoformen von TIA-1, welche durch alternatives Spleißen generiert werden. Durch Überexpressionsstudien mit beiden TIA-1-Isoformen in Huh7-Zellen

und der persistenten HCV-Zelllinie konnte Fr. Dipl. Biol. Winkler zeigen, dass bei Überexpression (ÜE) der kürzeren Isoform von TIA-1 (TIA-1vI) in der persistenten HCV-Zelllinie eine temporäre Reduktion des VEGF-A-mRNA-Abbaus induziert werden kann. Die ÜE beider Isoformen in Huh7-Zellen, sowie die ÜE der längeren Isoform (TIA-1vII) in der persistenten HCV-Zelllinie hatte dagegen keinen Einfluss auf den Abbau der VEGF-A-mRNA. Somit scheint spezifisch die kürzere Isoform von TIA-1 an der HCV-induzierten verringerten Degradation beteiligt zu sein. Da die ÜE von TIA-1vI in Huh7-Zellen keinen Einfluss auf die Degradation der VEGF-A-mRNA zeigte, wurde geschlossen, dass zusätzlich die Replikation des HCV-Replikons für den beobachteten posttranskriptionellen Effekt essentiell ist.

Des Weiteren untersuchte Fr. Dipl. Biol. Winkler, welche viralen Komponenten den beobachteten posttranskriptionellen Effekt auf die VEGF-A-mRNA bedingen. Es erschien plausibel, dass die beobachtete HCV-vermittelte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA direkt oder indirekt die Folge der Präsenz eines der viralen Proteine in der Wirtszelle darstellt. Deshalb wurden die einzelnen Protein-codierenden Bereiche des HCV-Replikons in Huh7-Zellen überexprimiert. Es konnte jedoch für keines der Proteine ein Einfluss auf die Degradation der VEGF-A-mRNA detektiert werden. Somit blieb die Frage ungeklärt, welche viralen Determinanten zu der HCV-induzierten verringerten Degradation der VEGF-A-mRNA führen. Zudem konnten der zugrunde liegende Mechanismus des verringerten Abbaus, sowie die Bedeutung des TIA-1 für diesen posttranskriptionellen Effekt im Rahmen der Arbeit von Fr. Dipl. Biol. Winkler nicht aufgeklärt werden.

Zum Zeitpunkt der Einreichung der vorliegenden Arbeit befand sich die Dissertationsschrift von Fr. Dipl. Biol. Winkler noch in der Vorbereitung. Sämtliche Bezüge und Verweise auf die von ihr erarbeiteten Ergebnisse sind deshalb gesondert gekennzeichnet (¹).

1.5 Zielstellung

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Replikation des subgenomischen HCV-Replikons JFH1 in einer humanen Leberzelllinie die Degradation der VEGF-A-mRNA reduziert und dadurch die VEGF-A-Synthese erhöht (¹). Da das HCV im Zuge chronischer Infektionen hepatozelluläre Karzinome hervorrufen kann, erscheint das VEGF-A, welches den bedeutsamsten Faktor der Angiogenese repräsentiert, von besonderem Interesse.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die von Fr. Dipl. Biol. Winkler erarbeiteten Erkenntnisse vervollständigt werden. Dabei sollten zum einen die viralen Komponenten identifiziert werden, die den veränderten VEGF-A-mRNA-Abbau induzieren und zum anderen die zellulären Determinanten identifiziert werden, welche die Stabilisierung dieser mRNA vermit-

tein. Des Weiteren sollte die Rolle von TIA-1 für den beobachteten posttranskriptionellen Effekt identifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem (Darmstadt, D), Carl Roth (Karlsruhe, D), Diagonal (Münster, D), life Technologies (Carlsbad, USA) Merck (Darmstadt, D), Serva (Heidelberg, D), Sigma-Aldrich (St.Louis, USA), ThermoFisher Scientific (Waltham, USA) und Th. Geyer (Renningen, D) bezogen. Bei Verwendung kommerziell bezogener Reagenzien und Enzyme wurden, wenn nicht anders angegeben, die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet. Sämtliche verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind im Anhang zusammengefasst. Sonstige verwendete Puffer und Lösungen wurden nach Standardprotokollen (Sambrook 2001) hergestellt und bei Bedarf durch autoklavieren (121°C; 20 min; 1,2 bar) oder filtrieren (Rotilabo®-Spritzen-Filter; PVDF; steril; Carl Roth) sterilisiert.

2.1.1 Kulturmedien und Antibiotika zur Kultivierung von Bakterien und humanen Zelllinien

Zur Kultivierung der im Rahmen dieser Arbeit genutzten humanen Zelllinien wurde das *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit FCS (fetales Kälberserum), Biotin, Hypoxanthin, Penicillin und Streptomycin versetzt. Die entsprechenden Endkonzentrationen können Tabelle 2.1 entnommen werden.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Kulturmediums für humane Zelllinien

Bestandteil	Endkonzentration	Hersteller
FCS	10%	PAN Biotech (Aidenbach, D)
Biotin	0,1 µg/ml	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
Hypoxanthin	0,25 µg/ml	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
Penicillin	100 U/ml	GIBCO® life technologies™ (Carlsbad, CA, USA)
Streptomycin	100 µg/ml	GIBCO® life technologies™ (Carlsbad, CA, USA)

Die Herstellung des LB-Mediums zur Kultivierung von *E. coli* (*Escherichia coli*) erfolgte nach Sambrook und Russel (Sambrook 2001) in H₂O_{dd}. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 2.2 dargestellt. Zur Herstellung von LB-Platten wurde dem Medium zusätzlich 1,5% Agar hinzugefügt. Gegebenenfalls wurden dem verwendeten Medium entsprechende selektive Antibiotika zugesetzt. Die Endkonzentrationen sind in

Tabelle 2.3 zusammengefasst. Die Antibiotika wurden als Stammlösungen in H₂O_{dd} hergestellt und anschließend steril filtriert (Rotilabo®-Spritzenfilter; PVDF; steril; Carl Roth).

Tabelle 2.2: Zusammensetzung des Kulturmediums für *E. coli*

Kulturmedium	Bestandteil	Endkonzentration	Hersteller
LB-Medium	Bacto™ Trypton	1% (w/v)	BD-Biosciences (Heidelberg, D)
	Bacto™ Yeast Extract	0,5% (w/v)	BD-Biosciences (Heidelberg, D)
	NaCl	1% (w/v)	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe, D)
	NaOH	1 mM	Merck (Darmstadt, D)
LB-Agar-Medium	LB-Medium Bacto™ Agar	1,5% (w/v)	BD-Biosciences (Heidelberg, D)

Tabelle 2.3: Konzentrationsangaben der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe, D)
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe, D)
Geneticin (G418)	20 mg/ml	800 µg/ml	life technologies™ (Carlsbad, CA, USA)
Blasticidin	7,5 mg/ml	5 µg/ml	life technologies™ (Carlsbad, CA, USA)

2.1.2 Bakterienstämme und deren Kultivierung

E. coli (*Escherichia coli*) wurde aerob entweder unter Schütteln (250 rpm) in flüssigem LB-Medium (siehe Tabelle 2.2) oder auf LB-Agar-Platten (94 x 16 mm, Corning, Amsterdam, NL) kultiviert. Dabei wurde in der Regel der *E. coli*-Stamm TOP10 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) verwendet. Der Stamm HB101 wurde für sämtliche Arbeiten mit Plasmiden genutzt, welche für die BVDV-Replikons [BVDV bzw. DI9c und BVDV-mut bzw. DI9c-mut (vgl. 3.3.7 und 8.3) codieren. Die Anzucht erfolgte bei 37°C über Nacht.

Tabelle 2.4: Bezeichnung und Genotyp der verwendeten *E. coli*-Stämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
TOP10	$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi 80 lacZ \Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG \lambda^-$	life technologies™ (Carlsbad, CA, USA)
HB101	$F^- mcrB mrr hsdS20(r_B^- m_B^-) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm^R) glnV44 \lambda^-$	life technologies™ (Carlsbad, CA, USA)

2.1.3 Humane Zelllinien und deren Kultivierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die humanen Zelllinien Huh7 (*human hepatocellular carcinoma*, Prof. Dr. R. Bartenschlager, Universität Heidelberg, D), Huh7-JFH1 (=persistente HCV-Zelllinie, Dr. René Geißler, Mikrobielle Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, D), HeLa (Mikrobielle Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, D) und Hek293T-REx™ (*human embryonic kidney*, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) verwendet. Die Huh7-Zelllinie entstammt einem humanen hepatozellulären Karzinom und diente verschiedenen Untersuchungen mit viralen Replikons. Diese Zelllinie wurde zudem von Dr. René Geißler verwendet, um die persistente HCV-Zelllinie zu generie-

ren. Dabei wurden die Huh7-Zellen mit einem bicistronischen HCV-Replikon des Genotyps 2a (JFH1, vgl. 1.1.4 und 3.1) mittels Elektroporation transfiziert und anschließend in Geneticin-haltigem DMEM (vgl. 2.1.1) kultiviert. Das in den positiv transfizierten Huh7-Zellen replizierende HCV-Replikon vermittelt dabei die Geneticin-Resistenz, da es für die Neomycin-Phosphotransferase II codiert, welche das Antibiotikum inaktiviert. Durch Kultivieren transient transfizierter Zellen in Geneticin-haltigem Kulturmedium können somit die Replikon-enhaltenden Zellen selektiert werden, da Zellen ohne funktionales Replikon absterben. Bei der Hek293T-RExTM-Zelllinie handelt es sich um eine humane embryonale Nierenzelllinie, welche durch Transfektion mit Teilen des Adenovirus (Subtyp 5) generiert wurde und das SV40 *large T-Antigen* exprimiert. Die einem humanen Zervixkarzinom entstammenden HeLa-Zellen stellen die erste jemals etablierte permanente Zelllinie dar. Sie entstammen der Patientin Henrietta Lacks und waren ursprünglich mit dem humanen Papillomvirus 18 infiziert. Die humanen Zelllinien wurden im Allgemeinen in 100 mm x 25 mm-Kulturschalen (Corning, Amsterdam, NL) mit je 10 ml DMEM (inklusive Zusätze) bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ (CO₂- Inkubator CB-150, Binder GmbH, Tuttlingen, D) kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 90% wurden die Zellen mit 5 ml PBS (1,5 mM KH₂PO₄ pH 7,2; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 2,6 mM Na₂HPO₄) gewaschen und anschließend mit 0,25% Trypsin/1 mM EDTA benetzt. Nach 2 - 5 min wurden die Zellen in DMEM (inklusive Zusätze) resuspendiert und zur weiteren Kultivierung ausgesät. Dabei enthielt das Medium zur Selektion der persistenten HCV-Zelllinie zusätzlich 800 µg/ml Geneticin (vgl. 2.1.1) bzw. 5 µg/ml Blasticidin zur Selektion der Hek293T-RExTM-Zellen (vgl. 2.1.1).

2.1.4 Längenstandards

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Längenstandards sind in Tabelle 2.5 dargestellt.

Tabelle 2.5: verwendete Längenstandards

Längenstandard	Hersteller
GeneRuler 1 kb DNA ladder	} life technologies TM (Carlsbad, CA, USA)
GeneRuler 50 bp DNA Ladder	
Ribo Ruler TM High Range RNA ladder	
Ribo Ruler TM low Range RNA ladder	
Page Ruler, prestained protein ladder	

2.1.5 Ribonukleosidtriphosphate und Desoxyribonukleosidtriphosphate

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Nukleotide sind in Tabelle 2.6 dargestellt.

Tabelle 2.6: verwendete Nukleosidtriphosphate

Nukleosidtriphosphat	Hersteller
Desoxynucleoside Triphosphate Set	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Ribonucleoside Triphosphate Set	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
m7GpppG (cap-Analog)	Jena Bioscience (Jena, D)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien mit TRIZOL

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zellen erfolgte mittels der TRIZOL-Methode. Dazu wurden die Zellen auf der Kulturschale mit PBS (1,5 mM KH_2PO_4 pH 7,2; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 2,6 mM Na_2HPO_4) gewaschen, in 1 ml TRIZOL resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Phasentrennung wurden 200 μl Chloroform zugegeben und das Gemisch für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt (Schüttler, VIBRAX VXR basic, IKA® Staufen, D). Nach einer drei-minütigen Inkubationszeit wurde das Gemisch für 15 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert (Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D). Die RNA der wässrigen Phase wurde anschließend mittels Isopropanol gefällt (Endkonzentration 50%, 15 min, RT). Durch Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 13000 rpm wurde die RNA pelletiert und anschließend mit 500 μl 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde im Folgenden für 10 min getrocknet (RT) und in einem geeigneten Volumen an $\text{H}_2\text{O}_\Sigma$ (Nuklease-freies Wasser, Sigma-Aldrich St. Louis, USA) aufgenommen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C. Die isolierte RNA wurde anschließend für analytische Zwecke (z.B. PCR, qRT-PCR; vgl. 2.2.1.13) oder präparative Zwecke (z.B. Klonierung humaner Gene aus humanen Zellen, vgl. 2.2.1.2) verwendet.

TRIZOL

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

2.2.1.2 cDNA-Erststrangsynthese

Die cDNA-Erststrangsynthese (reverse Transkription) wurde zur Quantifizierung von Transkripten (vgl. 2.2.1.13.3) und zur Klonierung humaner Gene (vgl. 2.2.1.13.1) verwendet. Dabei wird die eingesetzte RNA (vgl. 2.2.1.1) mittels der reversen Transkriptase (RevertAid™, Thermo Scientific, Bonn, D) in cDNA umgeschrieben, welche anschließend mittels PCR oder qRT-PCR amplifiziert werden kann. Im Allgemeinen wurde ein Poly(A)-spezifischer oligo(dT)-Primer verwendet. Falls erforderlich, wurde stattdessen (oder zusätzlich) ein Transkript-spezifischer Primer eingesetzt. Die cDNA-Erststrangsynthese wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wurde 1 μg der RNA mit 10 pmol des/der Primer(s) in einem Volumen von 12,5 μl gemischt. Dieser Reaktionsansatz wurde zunächst für 5 min bei 80°C und für 5 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde der im Folgenden aufgeführte Reaktions-Mix zugesetzt und der Ansatz für 60 min bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der reversen

Transkriptase schloss sich eine 10-minütige Inkubation bei 70°C an. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C. Für den nachfolgenden Nachweis des IFN β -Transkripts wurde die isolierte Gesamt-RNA zunächst mit den Restriktionsenzymen BglIII, DpnI und EcoRI behandelt und vor der cDNA-Erststrangsynthese erneut gereinigt (siehe 2.2.1.4), um Kontaminationen mit genomischer DNA zu reduzieren.

Reaktions-Mix

4 μ l	5x Reaction Buffer for RT
2 μ l	10mM dNTP-Lösung
0,25 μ l	Ribolock (40 U/ μ l)
0,25 μ l	Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)
0,5 μ l	H ₂ O _s

2.2.1.3 *in vitro* Transkription

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit diente die *in vitro* Transkription zur Synthese von RNA-Molekülen für die Transfektion humaner Zellen. Alle Transkripte wurden in *run-off*-Transkriptionen synthetisiert, was bedeutet, dass die RNA-Polymerase nach erfolgter Transkription am 3'-Ende der DNA-Matrize von dieser dissoziiert. Deshalb wurde als Template für die *in vitro* Transkriptionen entsprechend linearisierte Plasmid-DNA eingesetzt. Im Folgenden ist repräsentativ ein Reaktionsansatz unter Verwendung der T7-Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) aufgeführt.

Reaktionsansatz

8 μ l	5x Transkriptions-Puffer
4 μ l	10mM rNTP-Lösung
0,4 μ l	1M DTT
0,5 μ l	Ribolock (40 U/ μ l)
1 μ l	T7 RNA-Polymerase (50 U/ μ l)
1 μ g	Plasmid-DNA (linearisiert)
ad 40 μ l	H ₂ O _s

Für *in vitro* Transkriptionen des WNV-, des WNV-mut- und des Sindbis-Replikons wurde zusätzlich ein cap-Analog (m⁷GpppG, Jena Bioscience, Jena, D) verwendet (Endkonzentration im Reaktionsansatz 0,8 mM). In diesem Fall wurde die Endkonzentration des rGTP auf 0,5 mM reduziert.

Der Reaktionsansatz wurde für 3 h bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 10 U DNaseI (Roche, Mannheim, D) die Template-DNA hydrolysiert (1 h, 37°C). Die Reinigung der *in vitro* Transkripte erfolgte wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben.

2.2.1.4 Reinigung von RNA aus Reaktionsansätzen

Die Reinigung von RNA aus Reaktionsansätzen erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Dazu wurde die RNA-Lösung mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; Phenol wassergesättigt, equilibriert) versetzt und für 5 min geschüttelt (Schüttler,

VIBRAX VXR basic, IKA® Staufen, D). Nach einer drei-minütigen Zentrifugation (Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D) wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol Chloroform gemischt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz erneut unter Schütteln inkubiert und zentrifugiert und die wässrige Phase wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Folgenden wurde die RNA durch Zugabe von 2,5 Vol 100%igem Ethanol und 0,1 Vol Ammoniumacetat (6 M) für 15 min bei RT gefällt und durch Zentrifugation (4°C, 13000 rpm, 15 min) pelletiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und 10 min bei RT getrocknet. Anschließend wurde die RNA in einem geeigneten Volumen H₂O_Σ aufgenommen und bei -80°C gelagert. Vor der weiteren Verwendung wurde die Konzentration der RNA bestimmt (vgl. 2.2.1.14). Die Qualität gereinigter *in vitro* Transkripte wurde auf einem Formaldehyd-Agarose-Gel überprüft (vgl. 2.2.1.15).

2.2.1.5 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Reaktionsansätzen erfolgte entweder unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Systems (GeneJet™ PCR Purification Kit, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D) oder durch Phenol-Chloroform-Extraktion. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; Phenol equilibriert, nicht stabilisiert) versetzt und für 5 min geschüttelt (Schüttler, VIBRAX VXR basic, IKA® Staufen, D). Nach drei-minütiger Zentrifugation (13000 rpm, RT; Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D) wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zwei Mal durch analoge Vorgehensweise mit Chloroform extrahiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 2,5 Vol 100%igem Ethanol und 0,1 Vol Natriumacetat (3 M; pH 5,3) für 30 min bei -20°C gefällt. Durch Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 15 min) wurde die DNA pelletiert und anschließend mit 500 µl einer 70%igen Ethanol-Lösung gewaschen. Im Folgenden wurde das Pellet bei RT für 10 min getrocknet und in einer geeigneten Menge sterilem H₂O_{dd} resuspendiert.

Falls erforderlich (z.B. aufgrund unerwünschter DNA-Spezies im Reaktionsansatz) erfolgte die Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 2.2.1.15) und anschließender Gelextraktion unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Systems (GeneJet™ Gel Extraktion Kit, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D) entsprechend der Angaben des Herstellers. DNA-Lösungen wurden bei -20°C gelagert. Vor der weiteren Verwendung wurde die Konzentration photometrisch bestimmt (vgl. 2.2.1.14) und die Qualität durch Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 2.2.1.15) überprüft.

2.2.1.6 Restriktionshydrolyse von DNA

Die spezifische Restriktionshydrolyse von DNA wurde für analytische Zwecke (Identifikation von korrekten Plasmiden bei Klonierungen) und für präparative Zwecke (Herstellung von DNA-Fragmenten und Plasmiden für die Ligation, Linearisierung von Plasmiden für anschließende *in vitro* Transkriptionen) verwendet. Die Restriktionsenzyme, sowie die entsprechenden Inkubationspuffer wurden von den Firmen Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D) und New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main, D) bezogen. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend der Angaben des Herstellers für das jeweilige Enzym gewählt. Im Allgemeinen wurden analytische Restriktionsansätze in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt, präparative hingegen in 200 µl.

2.2.1.7 Dephosphorylierung von 5'Phosphatgruppen

Die Dephosphorylierung von 5'Phosphatgruppen wurde verwendet, um die Religation von hydrolysierten Plasmid-DNA zu verhindern. Zu diesem Zweck wurde die DNA entsprechend der Angaben des Herstellers mit alkalischer Phosphatase inkubiert (FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D) und anschließend gereinigt (vgl. 2.2.1.5).

2.2.1.8 Phosphorylierung von 5'Hydroxylgruppen

Die Phosphorylierung von PCR-Fragmenten für nachfolgende Ligationen erfolgte durch die T4-Polynukleotidkinase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D) entsprechend der Angaben des Herstellers. Vor der weiteren Verwendung wurde die DNA gereinigt (vgl. 2.2.1.5).

2.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationsreaktionen wurden unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific, Bonn, D) in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Das molare Verhältnis von Vektor- zu Fragment-DNA betrug etwa 1:3. Die Reaktionen wurden entweder für 2 h bei 22°C oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.2.1.10 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden mittels der Rubidiumchlorid-Methode nach Sambrook *et al.* generiert (Sambrook 1989). Dazu wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des *E. coli*-Stamms TOP10 (vgl. Tabelle 2.4) beimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm (Universalschüttler SM 30 A, Hechingen, D) inkubiert. Am Folgetag wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft und die Zellen bei 37°C und 250 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entnom-

men, 10 Minuten auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation (3000 rpm, 10 min, 4°C; Rotina 38 R, Winkelrotor 6-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen) pelletiert. Das generierte Zellpellet wurde in 30 ml kalter TfbI-Lösung (30 mM KAc; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 15% v/v Glycerin; pH 5,8) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen erneut zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4°C) und das Zellpellet in 4 ml kalter TfbII-Lösung (10 mM MOPS pH 7,0; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl; 15% v/v Glycerin) resuspendiert. Anschließend wurde die Zelllösung aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur Transformation der chemisch kompetenten Zellen wurden 50 -100µl der Zellen auf Eis aufgetaut (10 min) und anschließend mit der zu transformierenden DNA (50 ng Plasmid-DNA bzw. 5 µl Ligationsansatz) für 20 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschock für 90 s bei 42°C, gefolgt von erneuter Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium (vgl. 2.1.1) wurden die Zellen für 30 - 90 min bei 37°C unter leichtem Schütteln (200 rpm) inkubiert und anschließend 50 µl (bei Plasmid-DNA) bzw. 100 µl (bei Ligationsansätzen) der Zellsuspension auf LB-Platten mit entsprechenden selektiven Antibiotika ausplattiert. Nach Inkubation der Zellen über Nacht bei 37°C wurden positive Klone mittels Kolonie-PCR (vgl. 2.2.1.13.1) oder spezifischer Restriktionshydrolyse (vgl. 2.2.1.6) identifiziert.

2.2.1.11 Präparation von Plasmid-DNA

Abhängig vom späteren Verwendungszweck wurde Plasmid-DNA entweder durch Plasmid-Minipräparation (z.B. für nachfolgende PCR-Reaktionen oder Restriktionsanalysen) gewonnen oder mittels kommerziell erhältlicher Systeme (z.B. für präparative Zwecke oder Sequenzierungsreaktionen). Zur Gewinnung geringer DNA-Mengen wurden 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden *E. coli*-Klon beimpft und über Nacht schüttelnd inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (Mikro 200, Hettich, Tuttlingen) und anschließend die DNA entweder unter Verwendung des Plasmid-Isolationskits von peqlab (Erlangen, D) entsprechend der Angaben des Herstellers oder durch Plasmid-Minipräparation isoliert. Hierzu wurden die pelletierten Zellen in 150 µl Lösung I [50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 0,1 mg/ml RNaseA] resuspendiert und anschließend mit 150 µl Lösung II (0,2 M NaOH; 1% w/v SDS) versetzt. Das Gemisch wurde mehrmals invertiert und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat; pH 5,5) wurde die Mischung abermals invertiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Es schloss sich eine 15-minütige Zentrifugation (13000 rpm, 4°C; Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D) an. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 2,5 Vol 100%igem Ethanol gefällt (5 min auf Eis). Durch Zentrifugation (13000 rpm, 15 min, 4°C) wurde die DNA pelletiert. Das Pellet wurde

mit 70%igem Ethanol gewaschen, 10 min bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen von sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ resuspendiert. Zur Präparation größerer DNA-Mengen wurden das PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega, Madison, USA), bzw. (für die Präparation der Plasmide, welche für das BVDV- und das BVDV-mut-Replikon codieren, vgl. 8.3) das Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen, Venlo, NL) entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind im Anhang (vgl. 8.3) zusammengefasst. Die zur Generierung der Plasmide verwendeten Oligonukleotide können Tabelle 8.1 entnommen werden.

2.2.1.12 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) durchgeführt.

2.2.1.13 PCR (*polymerase chain reaction*) zur Amplifikation von DNA

Die Sequenzen und Verwendungszwecke der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang zusammengefasst (vgl. 8.1). Sie wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) bezogen, in sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gelöst (Stammlösung 100 pmol/ μl) und bei -20°C gelagert.

2.2.1.13.1 Standard-PCR

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden PCR-Reaktionen für analytische Zwecke (z.B. Amplifikation von cDNAs, Identifizierung positiver Klone) und präparative Zwecke (z.B. Generierung von DNA-Fragmenten für die Konstruktion von Plasmiden) verwendet. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für präparative Zwecke wurde die Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes, Vantaa, Finnland) verwendet, die aufgrund ihrer 3'-5' Exonukleaseaktivität eine möglichst hohe Genauigkeit bei der Amplifikation gewährleistet. Für analytische Zwecke wurde die DreamTaq-Polymerase (Thermo Scientific, Bonn, D) verwendet.

Tabelle 2.7: PCR-Reaktionsansatz unter Verwendung der Phusion®-DNA-Polymerase

Komponente	eingesetztes Volumen	Endkonzentration
5x Phusion® Puffer	10 μl	1x
dNTPs (10 mM)	1 μl	200 μM
<i>forward</i> Primer (10 pmol/ μl)	2,5 μl	0,5 μM
<i>reverse</i> Primer (10 pmol/ μl)	2,5 μl	0,5 μM
Template-DNA	1-10 ng	0,2-20 ng/ μl
Phusion®-DNA-Polymerase	0,5 μl	0,02 U/ μl
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	ad 50 μl	

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und Parameter der PCR-Programme wurden dem Protokoll des Herstellers der jeweiligen Polymerase entnommen. Die PCR-Reaktionen wurden in einem MasterCycler® Thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, D) inkubiert. Tabelle 2.7 zeigt beispielhaft einen PCR-Reaktionsansatz unter Verwendung der Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase.

Die Reaktionstemperaturen und -Zeiten richteten sich nach der Sequenz der Primer und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Die Reaktionsschritte 2 - 4 wurden 24 - 34 Mal wiederholt (siehe Tabelle 2.8). Bei Verwendung der DreamTaq-Polymerase wurde die Denaturierung bei 95°C und das *annealing* bei einer Temperatur, welche 5°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer lag, durchgeführt. Die Elongationszeit wurde bei Verwendung der DreamTaq-Polymerase auf 1 min/kb erhöht.

Tabelle 2.8: PCR-Programm unter Verwendung der Phusion® DNA-Polymerase

Prozess	Temperatur	Zeit	
1 initiale Denaturierung	98°C	30 s	
2 Denaturierung	98°C	10 s	} 25-35 Zyklen
3 <i>Annealing</i>	Schmelztemperatur der Primer abzüglich 3°C	30 s	
4 Elongation	72°C	30 s/kb	
5 terminale Elongation	72°C	2 - 5 min	

2.2.1.13.2 Ortsgerichtete Mutagenese (*site directed mutagenesis*)

Mittels ortsgerichteter Mutagenese können gezielt Mutationen in dsDNA-Moleküle eingeführt werden. In dieser Arbeit wurde diese Methode zur Generierung einer phosphomimetischen Variante von eIF2 α verwendet. Es ist dabei entscheidend, dass die zu mutierende DNA in einem Vektor vorliegt, welcher aus einem *dam*⁺-*E. coli*-Stamm isoliert wurde. Die zu mutierende DNA wurde unter Verwendung der Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase und zwei zu einander komplementären Oligonukleotiden, welche die gewünschte Mutation tragen, in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Abweichend zu dem in Kapitel 2.2.1.13.1 aufgeführten Protokoll wurden nur 16 - 18 Zyklen durchlaufen. Anschließend wurde die parentale, *dam*-methylierte DNA durch Zugabe von 10 U Dpn I gespalten und der verbliebene mutierte Vektor in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (vgl. 2.2.1.10). Durch anschließende Sequenzierung wurde der Erfolg der Mutagenese überprüft (vgl. 2.2.1.12).

2.2.1.13.3 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR beruht auf den gleichen Prinzipien wie die herkömmliche PCR (Mullis *et al.* 1987), ermöglicht aber durch Verwendung eines mit der dsDNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes eine Quantifizierung der amplifizierten DNA. Dabei korreliert die Fluoreszenzintensität mit der Zunahme der neu synthetisierten DNA. Die Grundlage der Quantifizie-

Die Amplifikation stellt der c_t -Wert (*cycle threshold*) dar, welcher den PCR-Zyklus angibt, bei dem die Fluoreszenzintensität der gemessenen PCR-Reaktion über die Hintergrundfluoreszenz steigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden qRT-PCR-Messungen zur Untersuchung der zellulären Genexpression, zum Nachweis viraler Replikation und zur Analyse der Degradation zellulärer mRNAs (vgl. 2.2.2.2) verwendet. Für die Amplifikation wurden Primer verwendet, welche 17 - 31 nt lang waren und für die Synthese eines 70 - 150 nt langen Amplicons geeignet waren. Einen Überblick über die verwendeten Primer gibt Tabelle 8.1 (Anhang). Die qRT-Messungen erfolgten am LightCycler® 480 (Roche, Mannheim, D) unter Verwendung eines Reaktionsmixes (SG qPCR Master Mix, Roboklon, Berlin, D), welcher abgesehen von den spezifischen Primern und der zu messenden Probe bereits alle benötigten Komponenten enthält. Für die Reaktionen wurden 50 ng RNA-Äquivalent aus der cDNA-Erststrangsynthese (vgl. 2.2.1.2) und jeweils 5 pmol der beiden Primer in einem Gesamtvolumen von 10 μ l eingesetzt. In Tabelle 2.9 ist ein typischer Reaktionsansatz dargestellt.

Tabelle 2.9: repräsentativer qRT-PCR-Reaktionsansatz

eingesetztes Volumen	Komponente
5 μ l	Master Mix
0,5 μ l	<i>forward</i> Primer
0,5 μ l	<i>reverse</i> Primer
1 μ l	cDNA
3 μ l	H ₂ O _z

Die Amplifikation der cDNA erfolgte nach dem in Tabelle 2.10 aufgeführten Programm. Nach Ablauf der Reaktion wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der PCR zu überprüfen. Dabei wird die Temperatur kontinuierlich auf 95°C erhöht und simultan die Fluoreszenzintensität gemessen. Mit Erreichen der spezifischen Schmelztemperatur der dsDNA-Moleküle dissoziieren diese und der Fluoreszenzfarbstoff wird freigesetzt, wodurch die Fluoreszenzintensität abnimmt. Die spezifische Amplifikation eines einzelnen Produktes ist durch einen *peak* bei der Schmelzkurvenanalyse charakterisiert. Mehrere *peaks* oder Plateaus deuten auf Nebenprodukte oder Primerdimere hin.

Tabelle 2.10: Programm zur Durchführung der qRT-PCR

Prozess	Temperatur	Dauer
1 Initialer Aktivierungsschritt für die HotStarTaq™ DNA-Polymerase	95°C	15 min
2 Denaturierung	95°C	5 s
3 <i>annealing</i>	60°C	10 s
4 Elongation	72°C	15 s
Wiederholung der Schritte 2 – 4 (45 x)		
5 Schmelzkurvenanalyse		

Die Berechnung relativer Transkriptmengen erfolgte in dieser Arbeit mittels der Δc_t -Methode. Dazu werden der c_t -Wert des Zielgens (ZG) und der c_t -Wert eines Referenzgens (RG) be-

stimmt. Im Rahmen dieser Arbeit diente die Quantifizierung der mRNA der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als interne Kontrolle. Das *GAPDH*-Gen ist ein Haushaltsgen und wird häufig als Referenz verwendet (Watson *et al.*, 1972; Buehner *et al.*, 1973). Auch im Zuge dieser Arbeit erschien es als geeignete Kontrolle, da es sich unter den gewählten experimentellen Bedingungen als nicht differenziell reguliert erwies. Durch Subtrahieren des c_t -Werts des Referenzgens vom c_t -Wert des Zielgens können Variationen der eingesetzten Probenvolumina und -Qualität ausgeglichen werden. Anschließend wurden die so normalisierten Werte in die Gleichung $x = E^{-\Delta c_t}$ eingesetzt, wobei E die PCR-Effizienz angibt. Unter optimalen Bedingungen wird die DNA in jedem Zyklus verdoppelt, weshalb eine Effizienz von 2 angenommen wurde. Die so ermittelten Werte verschiedener Proben können nun miteinander verglichen bzw. in Relation zu einander gesetzt werden, um die relativen Transkriptmengen in den zu untersuchenden Proben zu bestimmen. Im Folgenden sind die für die Berechnung verwendeten Formeln zusammengefasst.

$$\Delta C_t (\text{Probe1}) = \Delta C_t (\text{ZG 1}) - \Delta C_t (\text{RG 1}); X_1 = 2^{-\Delta C_t (\text{Probe1})}, \text{ definiert als 100\% bzw. 1}$$

$$\Delta C_t (\text{Probe2}) = \Delta C_t (\text{ZG 2}) - \Delta C_t (\text{RG 2}); X_2 = 2^{-\Delta C_t (\text{Probe2})}, \text{ Berechnung als Relativwert bezogen auf Probe 1}$$

2.2.1.14 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung von RNA- und DNA-Konzentrationen erfolgte photometrisch mittels eines Photospektrometers (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, D) bei 260 nm. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein Extinktionswert von 1 einer DNA-Konzentration von 50 ng/μl bzw. einer RNA-Konzentration von 40 ng/μl. Des Weiteren wurde das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm betrachtet, da es Rückschlüsse auf die Qualität der Präparationen ermöglicht.

2.2.1.15 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von DNA wurden je nach Fragmentgröße 1 - 3%ige Agarosegele verwendet [in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA pH 8,0); 0,25 ng/ml Ethidiumbromid]. Der 1 x TAE-Puffer diente auch als Elektrophoresepuffer. Vor dem Beladen der Gele wurden die DNA-Lösungen mit 0,2 Vol 6x DNA-Ladepuffer (Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) versetzt. Die Auftrennung von RNA erfolgte unter Verwendung von 1,5%igen Agarose-Formaldehydgelen [1 x MOPS-Puffer (20 mM MOPS/NaOH pH 7,0; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA), 1% (v/v) Formaldehyd]. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x MOPS-Puffer verwendet. Vor dem Auftragen wurde die RNA mit 1 Vol 2 x RNA-Ladepuffer (95% Formamid; 0,025% SDS; 0,025% Bromphenolblau; 0,025% Xylencyanol FF; 0,025% Ethidiumbromid; 0,5 mM EDTA) gemischt, für 5 min bei 70°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte in Flachbett-Elektrophoresekammern (FisherScienti-

fic, Schwerte, D oder Sonderanfertigung) bei einer Spannung von 100 - 120 V (Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen, D). Nach der Elektrophorese erfolgte die Analyse mittels eines Geldokumentationssystems (Kodak EDAS 290, Rochester, USA) unter Anregung mit UV-Licht (UV-Transilluminator, UXT-30M-8E, 312 nm, Biostep GmbH, Jansdorf, D).

2.2.2 Arbeiten mit humanen Zellkulturen

2.2.2.1 Transfektion von humanen Zelllinien

Die Transfektion humaner Zelllinien (vgl. 2.1.3) erfolgte in Abhängigkeit von der zu transfizierenden Nukleinsäure kationisch Polymer-vermittelt unter Verwendung kommerziell erhältlicher Reagenzien oder durch Elektroporation. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion so ausgesät (vgl. 2.1.3), dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 70 - 80% besaßen (bei siRNA-Transfektion 50 - 70%).

Der Nachweis der erfolgreichen Transfektion erfolgte in Abhängigkeit von der transfizierten RNA bzw. DNA durch qRT-PCR (2.2.1.13.3), Western Blot (2.2.3.5.1), indirekte Immunfluoreszenz (2.2.3.5.2) oder Luciferase-Assay (2.2.3.5.3).

2.2.2.1.1 Kationische Polymer-vermittelte Transfektion von siRNAs und Plasmid-DNA

Zur Transfektion einer 100 mm x 25 mm Kulturschale humaner Zellen mit Plasmid-DNA wurden 20 µl Turbofect™ Transfektions-Reagenz (ThermoScientific, Bonn, D) mit 20 µg der Plasmid-DNA (vgl. 8.3) in 1 ml DMEM (ohne Zusätze) gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde vorsichtig auf den Zellen verteilt und diese je nach Anwendung nach 12 - 72 h geerntet. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind im Anhang (vgl. 8.3) zusammengefasst.

Für die Transfektion von siRNAs wurde Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) verwendet. Dabei wurden 1200 pmol der siRNA (vgl. 8.1) und 30 µl Lipofectamine™ RNAiMAX mit je 1,5 ml DMEM gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Vereinen der beiden Ansätze folgte eine weitere 15-minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurde der Ansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Sequenzen der verwendeten siRNAs können dem Anhang (vgl. 8.1) entnommen werden. Aus ökonomischen Gründen wurde darauf verzichtet, siRNA-vermittelte Depletionen mit mehreren verschiedenen siRNAs durchzuführen. Deshalb wurden siRNAs verwendet, welche bereits in anderen Studien getestet wurden.

2.2.2.1.2 Elektroporation von Luciferase-Reporter-RNA und viraler RNA

Zur Transfektion mittels Elektroporation wurden die Zellen einer 100 mm x 25 mm Kulturschale durch Trypsinieren (vgl. 2.1.3) von der Kulturschale gelöst, in Kulturmedium resuspendiert und durch Zentrifugation (5 min, 2000 rpm, RT; Rotina 38 R, Winkelrotor 6-fach,

Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D) pelletiert. Im Folgenden wurden die Zellen zweimal mit PBS (1,5 mM KH_2PO_4 pH 7,2; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 2,6 mM Na_2HPO_4) gewaschen und in 400 μl PBS resuspendiert. Nach Mischen der Zellen mit der zu transfizierenden RNA erfolgte die Transfektion durch Elektroporation. Die dabei verwendeten Parameter waren von der verwendeten Zelllinie abhängig und sind in Tabelle 2.11 zusammengefasst. Alle Elektroporationen wurden mit Elektroporationsküvetten (Gene Pulser® cuvette) und dem Gene Pulser® II von Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D) durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden 3 μg der zu transfizierenden RNA eingesetzt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen umgehend in Kulturmedium (DMEM mit Zusätzen) resuspendiert und unter den in Kapitel 2.1.3 beschriebenen Parametern bis zur weiteren Verwendung kultiviert.

Tabelle 2.11: Parameter zur Elektroporation humaner Zellen

Zelllinie	Zellmenge	U	R	C	b
Huh7	Zellen einer 100 mm x 25 mm Kulturschale (70% Konfluenz)	200 V	∞	950 μF	4 mm
Huh7.5	Zellen einer 100 mm x 25 mm Kulturschale (70% Konfluenz)	200 V	∞	950 μF	4 mm
HeLa	1 - 3 x 10 ⁶ Zellen	300 V	∞	975 μF	2 mm
Hek293T-REx™	Zellen einer 100 mm x 25 mm Kulturschale (70% Konfluenz)	180 V	∞	950 μF	2 mm

U=Spannung, R=Widerstand, C=Kapazität, b=Spaltbreite der Elektroporationsküvette

2.2.2.2 Actinomycin D-Assay und Actinomycin D-Endpunkt-Assay

Zur Analyse der Degradation zellulärer mRNAs (VEGF-A-mRNA, $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ -mRNA) wurden Actinomycin D-Assays und Actinomycin D-Endpunkt-Assays verwendet. Actinomycin D ist ein cytotoxisches Peptid-Antibiotikum, welches die zelluläre mRNA-Synthese inhibiert (Koba *et al.* 2005, Sobell 1985). Actinomycin D wurde in das Kulturmedium der humanen Zellen appliziert (Endkonzentration 1,6 μM) und zu verschiedenen Zeiten nach der Zugabe von Actinomycin D Proben entnommen. Die Quantifizierung ausgewählter Transkripte (Transkript von Interesse, Transkript der GAPDH als Referenz) erfolgte anschließend mittels qRT-PCR. Da die zelluläre *de novo* RNA-Synthese inhibiert ist, repräsentiert die dabei gemessene mRNA ausschließlich RNA-Moleküle, welche bereits vor der Zugabe von Actinomycin D synthetisiert wurden. Somit kann der zeitliche Verlauf der Degradation zellulärer mRNAs verfolgt werden. Dabei wurde die gemessene Menge der RNA zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Zugabe (0 min) als 100% definiert. Die relativen Transkriptmengen aller im weiteren zeitlichen Verlauf entnommenen Proben wurden in Bezug zu dieser Anfangs-mRNA-Menge gesetzt. Zur Berechnung von mRNA-Halbwertszeiten wurden über einen Zeitraum von 3 - 4 h nach jeweils 30 - 60 min Proben entnommen. Die relativen Transkriptmengen wurden halblogarithmisch gegen die Zeit nach Actinomycin D-Zugabe aufgetragen und die Halbwertszeit durch expo-

nentielle Regression bestimmt. Dabei erwies es sich als entscheidend, dass die untersuchte VEGF-A-mRNA unter *in vivo* Bedingungen nicht vollständig abgebaut wird. Stattdessen konnte beobachtet werden, dass nach etwa 180 min eine residuale Transkriptmenge verbleibt (*offset*), welche innerhalb des beobachteten Zeitrahmens offensichtlich keiner weiteren Degradation unterliegt. Die Berechnung von mRNA-Halbwertszeiten erfolgte unter der Annahme einer vollständigen Degradation (ohne Beachtung des *offsets*) mittels Excel (Version 2010, Microsoft, Redmond, USA) und unter Beachtung des *offsets* mittels KaleidaGraph™ (Synergy Software, Reading, USA). Neben dem geschilderten Actinomycin D-Assay wurde die Degradation der VEGF-A-mRNA in dieser Arbeit auch mittels Actinomycin D-Endpunkt Assay analysiert. Dabei wurden lediglich die relativen Transkriptmengen zu Beginn und 180 min nach Actinomycin D-Zugabe quantifiziert, da gezeigt werden konnte, dass ab diesem Zeitpunkt keine weitere Degradation mehr erfolgt (siehe Kapitel 3.2).

2.2.2.3 Induktion von ER-Stress durch Tunicamycin

Tunicamycin ist ein Nukleosid-Antibiotikum, welches die N-Glykosylierung von Proteinen im ER inhibiert. Die daraus resultierende Akkumulation von unvollständig oder fehl-gefalteten Proteinen induziert in der Zelle die *unfolded protein response* (UPR). Im Rahmen dieser Arbeit wurde Tunicamycin in das Zellkulturmedium appliziert (Endkonzentration 10 µg/ml). Der Nachweis der erfolgreichen ER-Stress-Induktion erfolgte durch Quantifizierung der Transkripte von GRP78 (*glucose-regulated protein 78*) und CHOP (*C/EBP homologous protein*) [zwei gängige Marker zum Nachweis von ER-Stress (Samali *et al.* 2010)] mittels qRT-PCR (vgl. 2.2.1.13.3), durch Analyse des Spleißens der XBP1-mRNA mittels PCR [ebenfalls eine häufig verwendete Methode zum ER-Stress-Nachweis; (Samali *et al.* 2010)] (siehe 2.2.1.13.1) und durch Nachweis der eIF2 α -Phosphorylierung mittels Western Blot (siehe 2.2.3.5.1). Je nach experimenteller Fragestellung wurden die Zellen 3 – 48 h nach der Tunicamycin-Zugabe geerntet.

2.2.2.4 Hemmung der zellulären Translation durch Cycloheximid

Cycloheximid ist ein Antibiotikum welches die Translation in Eukaryoten inhibiert. Die Inhibition der Translations-Initiation beruht darauf, dass es sowohl die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die Ribosomen, als auch den Transfer von Aminosäuren von der Aminoacyl-tRNA auf entstehende Peptide und die Freisetzung der deacylierten tRNA verhindert. Cycloheximid diente im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der Degradation des I κ B- α -Proteins. Durch Entnahme von Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandeln der Zellen mit Cycloheximid und anschließender Detektion des Proteins von Interesse mittels Western Blot (vgl. 2.2.3.5.1), kann dessen Degradation analysiert werden, da die *de novo*

Proteinsynthese durch Cycloheximid inhibiert ist. Cycloheximid wurde in das Zellkulturmedium appliziert (Endkonzentration 10 µg/ml) und die Zellen nach 2 - 12 h geerntet und entsprechend analysiert.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten aus humanen Zelllinien

Zur Präparation von Gesamtzell-Proteinextrakten wurden die Zellen zunächst durch Trypsinieren (vgl. 2.1.3) von den Zellkulturschalen gelöst und in Kulturmedium resuspendiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation (2000 rpm, RT, Rotina 38 R, Winkelrotor 6-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D) wurden die Zellen mit PBS (1,5 mM KH₂PO₄ pH 7,2; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 2,6 mM Na₂HPO₄) gewaschen und anschließend in einem geeigneten Volumen Zellysepuffer resuspendiert, welcher ggf. mit einem Protease-Inhibitor (*Protease Inhibitor Cocktail*; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D) komplettiert wurde. Durch eine Inkubation auf Eis für 15 min sollte eine möglichst vollständige Zellyse gewährleistet werden. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 4°C, Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D) wurden unlösliche Zellbestandteile abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lysate bei -80°C gelagert.

Zur Analyse der phosphorylierten Varianten von eIF2 α und PKR wurden die zu untersuchenden Zellen direkt in SDS-Probenpuffer (vgl. 2.2.3.4) resuspendiert, um die Dephosphorylierung und Degradation dieser Proteine zu verhindern. Resultierend aus dieser Methode der Zellernte konnten bei der anschließenden Analyse mittels Western Blot keine äquivalenten Proteinmengen verwendet werden, da eine Konzentrationsbestimmung aufgrund des SDS-Probenpuffers nicht möglich war. Deshalb wurden die SDS-Gele in diesem Fall mit äquivalenten Volumina beladen. Resultierende Unterschiede der aufgetragenen Proteinmenge wurden mittels der jeweiligen verwendeten Ladekontrolle quantifiziert und normalisiert.

Zellysepuffer

20 mM	HEPES pH 7,9
100 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂
1 mM	PMSF
1 % (v/v)	NP-40

2.2.3.2 Herstellung von cytoplasmatischen Extrakten und Kernextrakten aus humanen Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die separate Präparation von cytoplasmatischen Extrakten und Kernextrakten aus humanen Zellen zur Analyse des NF- κ B-Signalwegs verwendet, da diese Präparationsmethode durch anschließende Analyse mittels Western Blot (vgl.

2.2.3.5.1) die Quantifizierung ausgewählter Proteine unter Beachtung ihrer subzellulären Lokalisation erlaubt. Für die Präparation der Extrakte wurden die Zellen zunächst durch Trypsinieren (vgl. 2.1.3) oder unter Verwendung eines Zellschabers (Zellheber, Corning Incorporated, Tewksbury, MA, USA) geerntet und durch Zentrifugation (5 min, 380 x g, 4°C, Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D) pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (1,5 mM KH₂PO₄ pH 7,2; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 2,6 mM Na₂HPO₄) wurden die Zellen vorsichtig in hypotonischem Puffer resuspendiert und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Im Folgenden wurde die Lösung mit 0,5 % (v/v) NP-40 versetzt und für 10 s gründlich gemischt (Vortex Genius 3, IKA, Staufen, D). Durch Zentrifugation (10 min, 3000 x g, 4°C, Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D) wurden die unlöslichen Bestandteile pelletiert. Der resultierende Überstand repräsentiert die cytoplasmatische Fraktion und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde hingegen in Zell-Extraktionspuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Dabei wurden die Proben nach jeweils 10 min gründlich gemischt (Vortex Genius 3, IKA, Staufen, D). Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (30 min, 14000 x g, 4°C, Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D) wurden die unlöslichen Bestandteile abgetrennt. Der resultierende Überstand repräsentiert das Kernextrakt und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode (vgl. 2.2.3.3) wurden die cytoplasmatischen Extrakte und die Kernextrakte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Bei der anschließenden Detektion mittels Western-Blot (vgl. 2.2.3.5.1) wurden zusätzlich zu den Proteinen von Interesse auch die Proteine LaminA und GAPDH detektiert. Da die GAPDH ein cytoplasmatisch lokalisiertes und LaminA ein nukleär lokalisiertes Protein repräsentiert, konnten diese Proteine nicht nur zur internen Normalisierung verwendet werden, sondern auch um mögliche Kontaminationen der Extrakte mit Komponenten der jeweils anderen Fraktion auszuschließen.

Hypotonischer Puffer		Zell-Extraktionspuffer	
20 mM	Tris-HCl (pH 7,4)	100 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
10 mM	NaCl	2 mM	Na ₃ VO ₄
3 mM	MgCl ₂	100 mM	NaCl
		1% (v/v)	Triton X-100
		1 mM	EDTA
		10%	Glycerin
		1 mM	EGTA
		0,1%	SDS
		1 mM	NaF
		0,5%	Natriumdesoxycholat
		20 mM	Na ₄ P ₂ O ₇
		1 x	Protease-Inhibitor*

* Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D)

2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration von Zellextrakten erfolgte mittels der Methode nach Bradford (Bradford 1976) unter Verwendung des Bio-Rad Protein Assay Kits (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D). Dabei wurden die Lysate nach Zugabe des Assay-Reagenz für 10 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm mittels eines Photospektrometers (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, D) ermittelt. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde unter Verwendung einer BSA-Lösung (NEB, Ipswich, USA) eine Kalibriergerade erstellt.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts wurde ein diskontinuierliches System verwendet (Laemmli 1970). Wenn nicht anders angegeben (vgl. 2.2.3.1), wurden äquivalente Proteinmengen der zu vergleichenden Proben auf die Polyacrylamidgele (PAA-Gele) aufgetragen. Vor dem Beladen der PAA-Gele wurden die Proteinproben mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Trennung erfolgte in der Regel in 10%igen PAA-Gelen. Zur Konzentrierung und Vortrennung der Proteine wurden 4%ige Sammelgele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA und maximaler Spannung (Power Supply MP-300N, Biostep GmbH, Jahnsdorf, D). Die verwendeten Puffer sind im Folgenden aufgeführt.

Trenngel		Sammelgel	
10%	Acrylamid (Rotiphorese 30, Carl Roth, Karlsruhe, D)	4%	Acrylamid (Rotiphorese 30, Carl Roth, Karlsruhe, D)
0,1%(w/v)	SDS	0,05% (w/v)	SDS
0,125% (w/v)	APS	0,07% (w/v)	APS
0,25% (v/v)	TEMED	0,3% (v/v)	TEMED
375 mM	Tris-HCl, pH 8,8	62,5 mM	Tris-HCl, pH 6,8

Elektrophoresepuffer		SDS-Probenpuffer	
25 mM	Tris	20% (v/v)	Glycerin
192 mM	Glycin	10 mM	Tris pH 6,8
0,1% (w/v)	SDS	6% (w/v)	SDS
		0,01% (w/v)	Bromphenolblau
		5% (v/v)	β-Mercaptoethanol
		20% (v/v)	Glycerin

2.2.3.5 Nachweis von Proteinen

Die Detektion von spezifischen Proteinen erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz oder Western Blot. Beide Methoden beruhen auf der Verwendung spezifischer Antikörper. Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Antikörper können dem Anhang (Tabelle 8.2) entnommen werden.

2.2.3.5.1 Western-Blot

Zur Detektion von spezifischen Proteinen mittels Western Blot wurden die Proteine zunächst mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran (Odyssey Nitrocellulose Membrane, LI-COR, Lincoln, NE, USA) transferiert. Dazu wurden ein Whatman-Papier (Gel blotting Paper, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), die Nitrocellulose-Membran, das PAA-Gel und ein weiteres Whatman-Papier in einer Blot-Apparatur (Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad, Hercules, USA) luftblasenfrei übereinander gelegt. Zuvor wurden das Whatman-Papier und die Nitrocellulose-Membran für etwa 5 min bei RT in Transferpuffer [48 mM Tris-HCl; 39 mM Glycin; 1,3 mM SDS; 20% (v/v) Methanol] inkubiert. Der Protein-Transfer auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte bei maximaler Spannung und einer von der Größe des PAA-Gels abhängigen Stromstärke ($0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche). Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht in *blocking*-Lösung [TBST-Puffer (20 mM Tris-HCl; pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,05% (v/v) Tween® 20); 7,5 % Milchpulver (Sucofin, TSI GmbH & Co. KG, Zeven, D)] inkubiert, um unspezifische Interaktionen der Antikörper mit der Membran zu reduzieren. Es ist zu beachten, dass zum Nachweis von phosphorylierten Proteine keine Milchpulver-haltige *blocking*-Lösung verwendet werden konnte, da das enthaltene Casein ebenfalls ein Phosphoprotein darstellt und somit einen negativen Einfluss auf die Signalintensität ausübt. Als Alternative wurde BSA (TBST-Puffer, 3 % BSA) zum Blockieren unspezifischer Interaktionen eingesetzt. Im Folgenden wurde die Membran für 1 – 3 h bei RT oder bei 4°C über Nacht mit dem spezifischen primären Antikörper (vgl. 8.2) inkubiert, welcher entsprechend der Angaben des Herstellers in der verwendeten *blocking*-Lösung verdünnt wurde. Nach Waschen der Membran mit TBST-Puffer (RT, je 5 - 15 min) und zwei weiteren Waschschritten in TBS-Puffer (10 mM Tris-HCl; pH 7,5; 150 mM NaCl) folgte die Inkubation mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:5000 - 1:15000 in *blocking*-Lösung, vgl. 8.2). Vor der Detektion mittels Nahinfrarotscan (LI-COR Odyssey® 2-Kanal Infrarot Detektionsscanner) wurde die Membran erneut ein Mal mit TBST-Puffer und zwei Mal mit TBS-Puffer gewaschen. Die Quantifizierung der detektierten Signale erfolgte mittels der Odyssey Application Software (Version 2.1, Infrared Imaging System, LI-COR, Lincoln, USA). Bei der Analyse zellulärer Proteine mittels Western Blot wurde neben dem Protein von Interesse auch jeweils ein *housekeeping*-Genprodukt detektiert und quantifiziert. Dies ermöglichte es, Variationen der auf das PAA-Gel aufgetragenen Proteinmengen zu normalisieren.

2.2.3.5.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit virale Proteine innerhalb von humanen Zellen visualisiert, um die virale Replikation nachzuweisen. Dazu

wurden die Zellen auf sterilen Deckgläschen kultiviert und anschließend auf diesen durch Inkubation der Deckgläschen in Lösung I [4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS (1,5 mM KH_2PO_4 pH 7,2; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 2,6 mM Na_2HPO_4); 30 min, RT] fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen in Lösung II [0,05% N-Octylglycopyranosid in PBS (pH 7,2); 15 min, 4°C) permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen zur Reduktion unspezifischer Interaktionen in *blocking*-Lösung [5% (v/v) FCS; 0,05% (v/v) Tween® 20; PBS (pH 7,2); 15 min, RT] überführt. Die anschließende Inkubation mit dem spezifischen primären Antikörper, welcher entsprechend der Angaben des Herstellers in *blocking*-Lösung verdünnt wurde, erfolgte für 1 – 2 h bei 37°C unter leichtem Schwenken. Zum Entfernen ungebundener Antikörper-Moleküle wurden die Deckgläschen drei Mal mit PBST (PBS; 0,05% Tween® 20) gewaschen und anschließend mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundär-Antikörper (Verdünnung 1:500 in TBST) unter Lichtausschluss und leichtem Schwenken für 45 – 60 min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen (drei Mal mit PBST, zwei Mal mit PBS, zwei Mal mit H_2O) wurden die Deckgläschen in 100%igen Ethanol überführt und anschließend getrocknet. Unter Verwendung von *ProLong® Gold-Antifade Reagent with DAPI* (life technologies™, Carlsbad, CA, USA) wurden die Deckgläschen auf Objektträgern fixiert. Das bereits enthaltene 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher bei der Fluoreszenzmikroskopie zur Markierung von DNA eingesetzt wird. Nach Trocknen der mikroskopischen Präparate folgte die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie (Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena, D). Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz in transient oder persistent mit viralen Replikons transfizierten Zellen, wurde stichprobenartig in einigen Bildausschnitten das Verhältnis der Replikon-enhaltenden Zellen zur Gesamtanzahl der Zellen bestimmt.

2.2.3.5.3 Nachweis der Translationseffizienz von Luciferase-Reporter-RNAs

Im Rahmen dieser Arbeit diente diese Methode zur Analyse der Translationseffizienz von Reporterkonstrukten unter dem Einfluss viraler Replikation. Zu diesem Zweck wurde in einen geeigneten Vektor die für die *firefly*-Luciferase codierende Region kloniert, welche von der 5'UTR und 3'UTR des *I κ B- α* -Gens flankiert wurde. Somit wird die Translation der *firefly*-Luciferase durch die heterologen UTRs reguliert. Das Konstrukt diente als Template für die Synthese eines *in vitro* Transkripts, welches anschließend durch Elektroporation (siehe 2.2.2.1.2) in humane Zellen transfiziert wurde. Die Messung der Translationseffizienz erfolgte mittels des Luciferase Assay Systems (Promega GmbH, Mannheim, D) in einem Luminometer (Sirius, Titertek-Berthold, Pforzheim, D) entsprechend der Angaben des Herstellers. Dazu wurden die Zellen 90 min nach der Transfektion der Luciferase-RNA geerntet und gezählt (Bright-Line Hemacytometer, Hausser Scientific, Horsham, PA, USA). Im Folgenden wurden

äquivalente Zellzahlen für die Präparation von Zelllysaten verwendet. Diese wurden durch Resuspendieren und Inkubieren der Zellen in 50 µl Zell-Lysepuffer (2 - 5 min, RT; 5x Cell Culture Lysis Reagent, Promega, Madison, USA) und anschließender Zentrifugation (2 min, 13000 rpm, 4°C, Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D) generiert. Mittels Bradfordmessung wurde die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt, um die äquivalente Präparations-Effizienz der Lysate sicherzustellen, welche innerhalb eines Experiments miteinander verglichen wurden.

2.2.4 Statistische Auswertung

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle in dieser Arbeit präsentierten Experimente mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt. Dargestellte Datenpunkte bzw. Balken repräsentieren die Mittelwerte biologischer Replikate und deren Standardabweichungen (Fehlerbalken). Zur Normierung interexperimenteller Variabilität wurden die Kontrollwerte (z.B. unbehandelte Zellen oder 0-Werte bei zeitabhängigen Experimenten) als 100% oder 1 definiert. Somit entfällt jedoch die Varianz der Kontrollwerte, wodurch kein Test der statistischen Signifikanz in Bezug zu diesen Kontrollwerten möglich war. Daten, welche eine statistische Analyse erlaubten, wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. Beim Vergleich mehrerer Mittelwerte wurde die statistische Signifikanz unter Verwendung des Statistik-Programms SPSS (PASW Statistics 18, IBM, Magdeburg, D) mittels einfaktorieller ANOVA getestet.

3 Ergebnisse

3.1 Verwendung von Replikonsystemen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der viralen Replikation, insbesondere des HCV, auf die posttranskriptionelle Regulation der VEGF-A-mRNA näher untersucht werden. Als Modellsysteme für die virale Replikation wurden verschiedene Replikons verwendet. Zur Anwendung kamen vor allem das JFH1-Replikon (im Folgenden bezeichnet als HCV-Replikon), welches sich vom Genom des HCV (Genotyp 2a) ableitet (siehe Kapitel 1.1.4), sowie ein vom WNV-Genom abgeleitetes WNV-Replikon (im Folgenden bezeichnet als WNV-Replikon). Das WNV-Replikon basiert auf einem Virus, welches im Jahre 2000 aus einer Krähe isoliert wurde [NY2000-crow3356, (Shi *et al.* 2002)]. Zusätzlich wurde eine für jedes dieser Replikons korrespondierende Variante verwendet, welche aufgrund einer Punktmutation in der für die RNA-abhängige RNA-Polymerase codierenden Sequenz nicht replikationsfähig ist. Diese Varianten werden im Folgenden als HCV-mut und WNV-mut bezeichnet. Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, ist die strukturelle Organisation der viralen Genome des HCV und WNV, sowie der von diesen abgeleiteten Replikons, sehr ähnlich. Das verwendete HCV-Replikon stellt eine bicistronische RNA dar. Die codierende Region für die viralen Proteine C, E1, E2, p7 und NS2 wurde fast vollständig deletiert und durch die für den Selektionsmarker Neomycin-Phosphotransferase II (Neo), sowie die IRES des Encephalomyocarditis Virus (EMCV) codierenden Sequenzen substituiert. Die Translation der Neo-RNA wird dadurch von der HCV-5'-UTR vermittelt, die der Nichtstruktur-Proteine NS3-NS5B hingegen durch die EMCV-IRES. Das WNV-Replikon hingegen ist ein monocistronisches Replikon. Es besteht aus einem einzelnen ORF, welcher für die Nichtstruktur-Proteine NS1-NS5 codiert und von den authentischen WNV-UTRs flankiert wird. Analog zum HCV-Replikonsystem wurde die für die Strukturproteine codierende Region fast vollständig deletiert. Am 5'Ende befindet sich eine cap-Struktur, welche die Translations-Initiation vermittelt. Am 3'Ende beider Replikons befindet sich die authentische virale 3'UTR, deren 3'-Terminus mittels des stromabwärts gelegenen Ribozyms des Hepatitis-D-Virus (HDVr) generiert wird. Die transiente Transfektion von humanen Zellen mit den beschriebenen Replikons ist bereits in Vorarbeiten etabliert worden (Kato *et al.* 2003, Lohmann *et al.* 1999, Shi *et al.* 2002). Zur besseren Verständlichkeit der folgenden Experimente soll dennoch exemplarisch dargestellt werden, wie die Replikation der transfizierten viralen RNA nachgewiesen werden kann.

A: HCV-Genom**B: bicistronisches HCV-Replikon (JFH1)****C: WNV-Genom****D: monocistronisches WNV-Replikon**

Abbildung 3.1: Strukturelle Organisation der Genome und Replikons des HCV und WNV. Schematische Darstellung der viralen Genome, sowie der von diesen abgeleiteten Replikons. Die viralen und nicht-viralen (Neo) proteincodierenden Regionen sind eingerahmt, die nicht translatierten Bereiche sind als schwarze Linien gekennzeichnet. Die viralen Genome codieren jeweils für ein Polyprotein, welches co- und posttranslational durch zelluläre und virale Proteasen in die einzelnen Polypeptide gespalten wird. Der einzelne ORF der viralen Genome wird am 5' und 3' Ende von nicht translatierten Regionen (UTRs) flankiert. Das äußere 3' Ende der Replikons bildet ein Ribozym des Hepatitis-D-Virus (HDVr), welches die einheitliche Generierung des authentischen viralen 3' Endes katalysiert. (A) Strukturelle Organisation des HCV-Genoms (siehe Kapitel 1.1.3) und (B) des HCV-Replikons. Die Synthese der Neomycin-Phosphotransferase II wird durch die in der 5'UTR lokalisierte HCV-IRES gewährleistet und ermöglicht die Selektion Replikon-enthaltender Zellen. Die Translation der viralen Nicht-Strukturproteine NS3-NS5B wird an der heterologen IRES des EMCV initiiert. (C) Strukturelle Organisation des WNV-Genoms und (D) des WNV-Replikons. Die WNV-RNA trägt am 5' Ende eine cap-Struktur (cap) zur Initiation der Translation.

Zur Untersuchung des Einflusses der viralen Replikation auf die Expression zellulärer Gene wurde die jeweilige *in vitro* transkribierte Replikon-RNA mittels Elektroporation in humane Zellen transfiziert (im Folgenden als transiente Transfektion bezeichnet). Zum Nachweis der viralen Replikation können entweder die virale RNA oder die viralen Proteine detektiert werden. Durch Ernte der transfizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion kann der zeitliche Verlauf der viralen Replikation beobachtet werden. Die Quantifizierung der viralen RNA erfolgte mittels qRT-PCR, wobei die gemessene Replikon-RNA-Menge zum Zeitpunkt 0 h *post transfectionem* (nach der Transfektion, *p.t.*) als 100% bzw. 1 definiert wurde. Abbildung 3.2 zeigt exemplarisch den Verlauf der viralen Replikation. Bei transiente Transfektion des HCV- und des WNV-Replikons steigt die messbare Menge an viraler RNA bis 48 h *p.t.* kontinuierlich an und sinkt anschließend wieder ab. Die als Negativ-Kontrolle verwendeten, nicht replikationsfähigen Replikons HCV-mut und WNV-mut konnten zum Zeitpunkt 0 h *p.t.* in ähnlichen Quantitäten wie die korrespondierenden replikationsfähigen Replikons nachgewiesen werden. Somit kann garantiert werden, dass vergleichbare Ausgangsmengen an viraler RNA in die Zellen transfiziert wurden. Zu späteren Zeiten nimmt die detektierbare Menge der nicht replikationsfähigen Replikon-RNA aufgrund zellulärer Degradationsprozesse stetig ab.

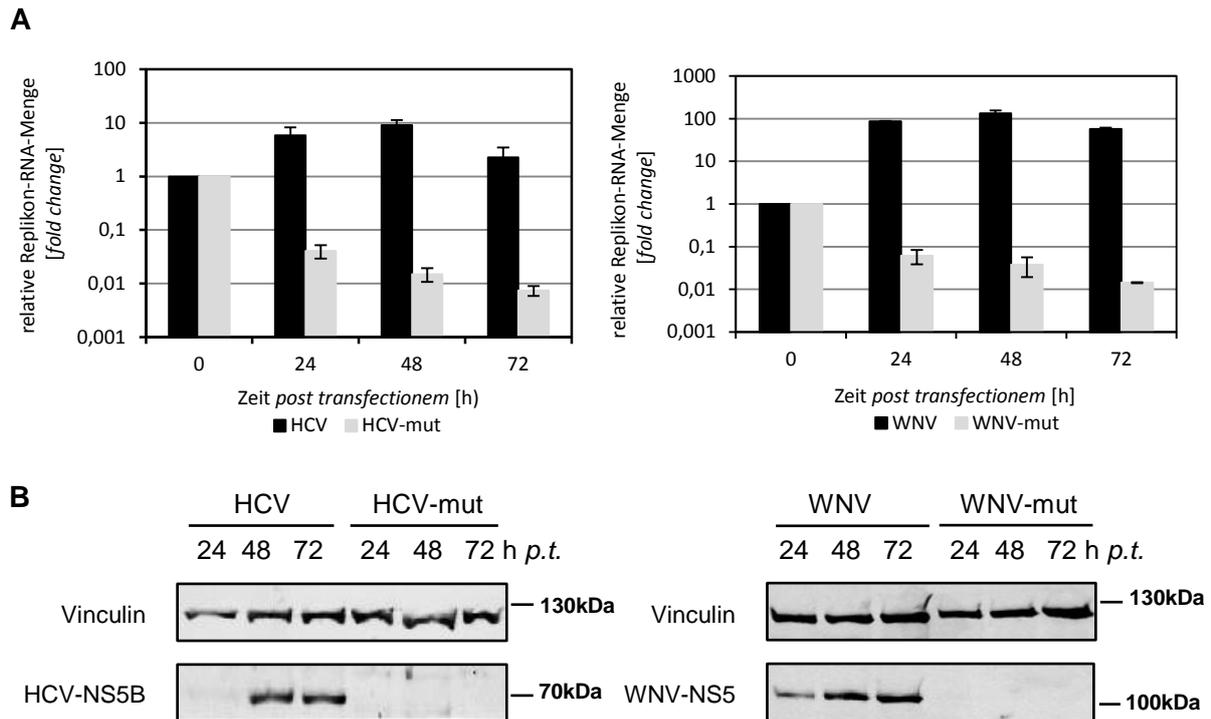


Abbildung 3.2: Nachweis der viralen Replikation in Huh7-Zellen. (A) Quantifizierung der relativen viralen RNA-Mengen 0 h, 24 h, 48 h, und 72 h nach transienter Transfektion von Huh7-Zellen mit dem HCV- und HCV-mut-Replikon bzw. mit dem WNV- und WNV-mut-Replikon mittels qRT-PCR. Die relativen Quantitäten an viraler RNA 24 h, 48 h und 72 h *p.t.* sind als x -fache Änderung (*fold change*) angegeben, wobei die gemessene HCV- bzw. WNV-RNA-Menge 0 h *p.t.* als 1 definiert wurde. (B) Repräsentative Western-Blots von HCV-NS5B bzw. WNV-NS5 im cytoplasmatischen Extrakt von Huh7-Zellen nach transienter Transfektion mit dem HCV- und dem HCV-mut-Replikon (Abbildung B links) bzw. mit dem WNV- und WNV-mut-Replikon (Abbildung B rechts). Die Ernte der Zellen erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transfektion. Der Nachweis von Vinculin diente als Ladekontrolle.

Der Nachweis der viralen Proteine kann entweder mittels Immunoblot oder mittels indirekter Immunfluoreszenz erfolgen und kann als Maß für die virale Replikation angesehen werden, da eine effiziente Translation der viralen Proteine nur bei Replikation der RNA gewährleistet und detektierbar ist. Beide Methoden beruhen auf der Verwendung spezifischer Antikörper, welche gegen bestimmte virale Proteine gerichtet sind (anti-HCV-NS5A oder anti-HCV-NS5B; anti-WNV-NS5). Die viralen Proteine HCV-NS5A bzw. HCV-NS5B, sowie WNV-NS5 konnten entsprechend ausschließlich in den Zellen nachgewiesen werden, welche mit den replikationsfähigen Replikon-RNAs transfiziert wurden (Abbildung 3.2 B).

Der Nachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz diente hauptsächlich der Bestimmung der Transfektionsrate. Zur Bestimmung der Transfektionsrate wurden die Präparate mikroskopisch betrachtet und stichprobenartig in einigen Bildausschnitten das Verhältnis der Anzahl positiv transfizierter Zellen zur Gesamtzahl der Zellen bestimmt. Die Transfektionsrate der Huh7-Zellen lag nach transienter Transfektion mit dem HCV-Replikon und dem WNV-Replikon jeweils bei ca. 70-75% (Daten nicht gezeigt).

Bei allen weiteren dargestellten Experimenten, bei denen eine Transfektion viraler Replikons erfolgte, wird der Nachweis der viralen Replikation mittels einer oder mehrerer der oben genannten Methoden vorausgesetzt.

3.2 Die Degradation der VEGF-A-mRNA kann mittels Actinomycin D-Assay analysiert werden

Wie in Kapitel 1.4 bereits erwähnt, konnte in Vorarbeiten bereits gezeigt werden, dass die Degradation der VEGF-A-mRNA in Huh7-Zellen, in welchen das HCV-Replikon transient repliziert, signifikant reduziert war (¹). Dabei konnte ein maximaler Einfluss zum Zeitpunkt der maximalen viralen Replikation detektiert werden (48 h *p.t.*, unveröffentlichte Daten Fr. Dipl. Biol. Winkler). Zur besseren Verständlichkeit der weiteren Ausführungen soll am Beispiel der VEGF-A-mRNA zunächst dargelegt werden, wie die Degradation zellulärer mRNAs *in cellulo* untersucht wurde.

Die Halbwertszeit von mRNAs variiert zwischen einigen Minuten und mehreren Tagen und stellt ein wichtiges Kriterium zur Regulation der Genexpression dar. Die Stabilität spezifischer mRNAs kann mittels der *RNA synthesis inhibitor-chase method* (Egyhazi 1974, Egyhazi 1976, Sehgal *et al.* 1978) bestimmt werden. Diese Methode basiert auf der Inhibition der zellulären Transkription durch Verwendung bestimmter Inhibitoren. In dieser Arbeit wurde Actinomycin D als Inhibitor eingesetzt, welcher die RNA-Synthese durch Interkalieren in die DNA blockiert. Dabei wurde Actinomycin D in das Zellkulturmedium appliziert und die Zellen nach den jeweils angegebenen Zeiten geerntet. Die Quantifizierung der Transkriptmengen erfolgte durch qRT-PCR. Die relativen VEGF-A-Transkriptmengen zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden als prozentuale Werte berechnet, bezogen auf die mRNA-Ausgangsmenge, welche als 100% definiert wurde. Durch halblogarithmisches Auftragen der Transkriptmengen gegen die Zeit nach erfolgter Actinomycin D-Zugabe kann die Halbwertszeit der RNA mittels exponentieller Regression bestimmt werden. Dabei entspricht die Halbwertszeit der RNA dem Zeitpunkt, zu dem noch 50% der Ausgangs-mRNA-Menge vorhanden sind. Im Folgenden wird diese Methodik als Actinomycin D-Assay bezeichnet.

In Abbildung 3.3 ist die VEGF-A-mRNA-Degradation in naiven, sowie in transient mit dem WNV-, dem HCV- bzw. dem HCV-mut-Replikon transfizierten Huh7-Zellen (48 h *p.t.*) über einen Zeitraum von 240 min nach Actinomycin D-Zugabe dargestellt. Eine signifikante Abnahme der Transkriptmenge kann nur im Zeitraum von 0 min bis etwa 180 min nach Zugabe von Actinomycin D detektiert werden. Eine fortgesetzte Degradation der residualen VEGF-A-mRNA-Menge, welche 180 min nach Zugabe von Actinomycin D detektierbar ist, kann im weiteren zeitlichen Verlauf nicht nachgewiesen werden.

Bei ausschließlicher Betrachtung der Daten innerhalb des Zeitraums, in dem eine kontinuierliche Degradation vorliegt (0 - 180 min nach Zugabe von Actinomycin D) und unter der Annahme, dass die VEGF-A-mRNA einer vollständigen Degradation unterliegt, wurde für diese mittels exponentieller Regression entsprechend der Formel

$$y = a * e^{b*x}$$

in Huh7-Zellen eine Halbwertszeit von 97 ± 9 min bestimmt. Während bei transients Transfektion mit dem HCV-mut-Replikon (102 ± 4 min) und dem WNV-Replikon (108 ± 15 min) kein Einfluss auf die Halbwertszeit der VEGF-A-mRNA detektiert werden konnte, führte die transiente Transfektion mit dem HCV-Replikon zu einer signifikanten Erhöhung der Halbwertszeit auf 228 ± 7 min.

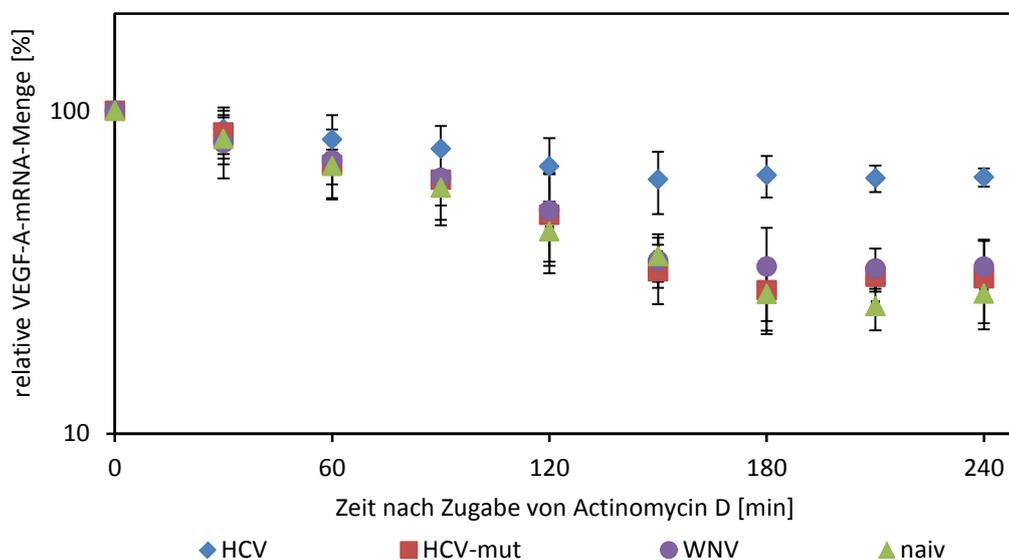


Abbildung 3.3: Analyse der Degradation der VEGF-A-mRNA in cellulo. Der Actinomycin D-Assay zur Untersuchung der VEGF-A-mRNA-Degradation in naiven, sowie in transient mit dem HCV-, dem HCV-mut bzw. dem WNV-Replikon transfizierten Zellen wurde 48 h *p.t.* durchgeführt. Dabei wurden über einen Zeitraum von 240 min Proben entnommen. Die Berechnung der Transkriptmengen erfolgte mittels qRT-PCR. Für jeden Probensatz wurde die gemessene VEGF-A-mRNA-Menge zum Zeitpunkt 0 min als 100% definiert. Die Transkriptmengen der übrigen Zeitwerte sind als Relativwerte, bezogen auf den 100%-Wert, angegeben. Zur Ermittlung der VEGF-A-mRNA-Halbwertszeit wurden die relativen Transkriptmengen halblogarithmisch gegen die Zeit nach Actinomycin D-Zugabe aufgetragen.

Wie aus Abbildung 3.3 jedoch deutlich hervorgeht, erfolgt keine vollständige Degradation der VEGF-A-mRNA. Dies ist von entscheidender Bedeutung für die Berechnung der mRNA-Halbwertszeit. Bei Betrachtung des gesamten Messzeitraumes (0 bis 240 min nach Zugabe von Actinomycin D) und unter Beachtung der unvollständigen Degradation wurde für die VEGF-A-mRNA entsprechend der Formel $y = a * e^{b*x} + c$ in Huh7-Zellen eine Halbwertszeit von 77 ± 10 min bestimmt. Die transiente Transfektion mit dem HCV-Replikon (71 ± 12 min), dem HCV-mut-Replikon (92 ± 11 min), sowie dem WNV-Replikon (95 ± 7 min) hat entsprechend dieser Berechnung keinen signifikanten Einfluss auf die Halbwertszeit der VEGF-A-mRNA. Es besteht jedoch ein signifikanter Unterschied bezüglich der residualen

VEGF-A-mRNA-Menge, welche 180 min nach Actinomycin D-Zugabe detektiert werden kann. Diese liegt bei naiven, sowie transient mit dem HCV-mut- und dem WNV-Replikon transfizierten Zellen bei etwa 25 - 30% und bei transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen bei ca. 60% der Ausgangs-mRNA-Menge. Dieser beobachtete Einfluss auf die Degradation der VEGF-A-mRNA wird in den weiteren Ausführungen als „Stabilisierung“ der VEGF-A-mRNA bezeichnet.

Da sich die Bestimmung der Halbwertszeit einer mRNA mittels des beschriebenen Verfahrens als sehr zeit- und vor allem kostenintensiv darstellt, wurde dies nur in ausgewählten Fällen durchgeführt. Bei der Mehrheit der Experimente wurden lediglich die mRNA-Menge vor der Actinomycin D-Behandlung und 180 min nach Actinomycin D-Zugabe bestimmt (im Folgenden bezeichnet als Actinomycin D-Endpunkt-Assay). Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da, wie bereits erwähnt, bei späteren Zeitwerten keine weitere Abnahme der relativen VEGF-A-mRNA-Menge zu verzeichnen war. Unterschiede der residualen VEGF-A-mRNA-Menge verschiedener Datensätze wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. Repräsentativ ist in Abbildung 3.4 ein Actinomycin D-Endpunkt-Assay zur Analyse des VEGF-A-mRNA-Abbaus in naiven, sowie in transient mit dem WNV-, dem HCV- bzw. dem HCV-mut-Replikon transfizierten Huh-Zellen (48 h *p.t.*) dargestellt. Die relativen VEGF-A-mRNA-Mengen 180 min nach Actinomycin D-Zugabe in naiven Huh7-Zellen sowie transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen (48 h *p.t.*) dienten bei weiteren Experimenten als Referenz.

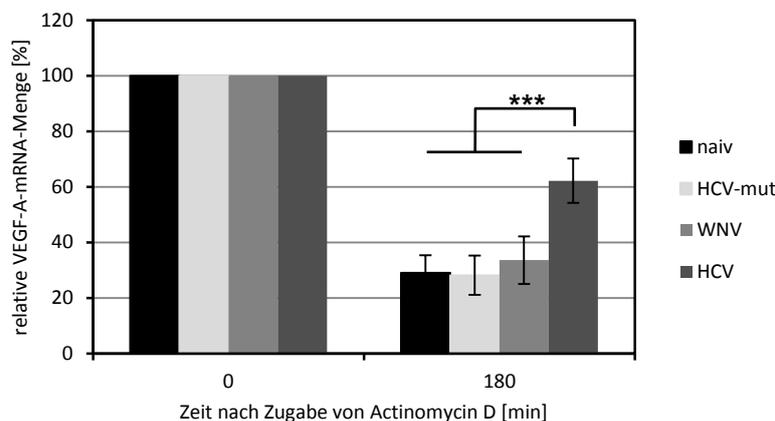


Abbildung 3.4: Actinomycin D-Endpunkt-Assay. Dargestellt ist ein Actinomycin D-Endpunkt-Assay zur Untersuchung der VEGF-A-mRNA-Degradation in naiven, sowie transient mit dem HCV-, dem HCV-mut- bzw. dem WNV-Replikon transfizierten Zellen (48 h *p.t.*). Für jeden Probensatz wurde die gemessene VEGF-A-mRNA-Menge zum Zeitpunkt 0 min als 100% definiert. Die gemessenen Transkriptmengen 180 min nach Actinomycin D-Zugabe sind als Relativwerte, bezogen auf den 100%-Wert, angegeben. Die jeweiligen Mittelwerte der residualen VEGF-A-mRNA-Menge der verschiedenen Datensätze zum Zeitpunkt 180 min wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (***) $P < 0,0001$

3.3 Untersuchung der zellulären und viralen Komponenten, welche an der HCV-induzierten Stabilisierung der VEGF-A-mRNA beteiligt sind

3.3.1 Die Proteine PKR und RIG I sind an der HCV-induzierten Stabilisierung der VEGF-A-mRNA beteiligt

In den Vorarbeiten konnten die zu Grunde liegenden Mechanismen, die zu dem beobachteten Einfluss der Replikation des HCV-Replikons auf die Degradation der VEGF-A-mRNA führen, nicht aufgeklärt werden (¹). Es war deshalb von Interesse, die viralen und zellulären Determinanten zu identifizieren, die an der HCV-induzierten Stabilisierung der VEGF-A-mRNA beteiligt sind. Wie in Kapitel 1.4 erwähnt, wurde in den Vorarbeiten zunächst angenommen, dass eines der viralen Proteine die virale Komponente darstellt, welche die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung initiiert. Dabei wäre sowohl ein direkter Einfluss, z.B. durch Binden eines viralen Proteins an die VEGF-A-mRNA, als auch ein indirekter Einfluss, z.B. durch Auslösen einer Signalkaskade, welche die Stabilisierung vermittelt, denkbar. Die ÜE der einzelnen proteincodierenden Bereiche des HCV-Replikons in Huh7-Zellen hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Degradation der VEGF-A-mRNA (¹). Obwohl nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die simultane Präsenz von zwei oder mehr der codierten Proteine als Auslöser des beobachteten Effektes wirken, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob nicht die viralen Proteine, sondern die virale RNA die entscheidende virale Komponente darstellt, die aufgrund bisher unbekannter Mechanismen zu der erhöhten Stabilität der VEGF-A-mRNA führt.

Die Präsenz viraler RNA wird innerhalb der Zelle durch sogenannte PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*) von verschiedenen Proteinen (*pattern recognition receptors* - PRR) erkannt und führt zur Aktivierung diverser Signalkaskaden. Es wurde postuliert, dass die beobachtete erhöhte VEGF-A-mRNA-Stabilität ein Resultat dieser zellulären Reaktion auf die Anwesenheit der viralen RNA darstellt. Die Signalwege, welche zur Erkennung der RNA des HCV führen und in der Aktivierung der angeborenen Immunantwort resultieren, sind bereits eingehend untersucht worden. Zwei Schlüsselkomponenten der Erkennung der viralen PAMPs stellen die Proteine *protein kinase R* (PKR) und *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG I) dar. Es sollte deshalb untersucht werden, ob diese beiden Proteine für den beobachteten Einfluss der Replikation des HCV-Replikons auf die Degradation der VEGF-A-mRNA essentielle Determinanten darstellen. Zu diesem Zweck wurden die Proteine PKR bzw. RIG I in Huh7-Zellen unter Verwendung spezifischer siRNAs depletiert (siPKR bzw. siRIG I). Die Funktionalität der siRNAs wurde 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion der siRNAs durch Western Blot von PKR und RIG I in Gesamtzellextrakten der depletierten Zellen überprüft (Abbildung 3.5 D, E). Als Negativkontrolle fungierten Zellen, welche mit einer siRNA

behandelt wurden, die spezifisch für die Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und somit in Huh7-Zellen nicht funktional ist (siGFP). Wie in Abbildung 3.5 E dargestellt, reduzierte die Behandlung der Zellen mit den spezifischen siRNAs signifikant die zelluläre Menge der PKR bzw. des RIG I, während die GAPDH-Menge nicht beeinträchtigt war. Somit konnte die Funktionalität beider siRNAs in Huh7-Zellen nachgewiesen werden.

Um den potentiellen Einfluss der Proteine PKR und RIG I auf den Abbau der VEGF-A-mRNA zu ermitteln, wurden die Zellen 24 h nach der siRNA-vermittelten Depletion transient mit der HCV-Replikon-RNA transfiziert und die Degradation der VEGF-A-mRNA mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay (48 h *p.t.*) analysiert (vgl. 3.2). Als Kontrolle wurde die Degradation der VEGF-A-mRNA in den Zellen betrachtet, welche mit der nicht funktionalen siRNA (siGFP) behandelt wurden. Wie in Abbildung 3.5 (A und B) dargestellt, induzierte die Replikation des HCV-Replikons in den Kontrollzellen (siGFP + HCV) die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA. In PKR- bzw. RIG I-depletierten Huh7-Zellen konnte dies hingegen nicht beobachtet werden. Die residuale VEGF-A-mRNA-Menge 180 min nach Zugabe von Actinomycin D entsprach in beiden Fällen in etwa der Transkriptmenge, die zum selben Zeitpunkt in naiven oder transient mit dem HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen nachweisbar war (vgl. Abb. 3.4). Dies deutet darauf hin, dass die Proteine PKR und RIG I essentielle Determinanten des beobachteten Einflusses der HCV-Replikation auf die Stabilität der VEGF-A-mRNA darstellen. Zusätzlich wurde eine detaillierte Analyse der VEGF-A-mRNA-Degradation in PKR- bzw. RIG I-depletierten und transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Huh7-Zellen 48 h *p.t.* mittels Actinomycin D-Assay durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Actinomycin D-Endpunkt-Assays entsprach dabei die VEGF-A-mRNA-Degradation jener in transient mit dem HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen (siehe Anhang 8.4).

Es war entscheidend zu überprüfen, ob die Depletion der Proteine PKR und RIG I einen Einfluss auf die Replikation der HCV-RNA ausübt. Zu diesem Zweck wurde die in den PKR- bzw. RIG I-depletierten Zellen vorhandene HCV-RNA-Menge 48 h *p.t.* mittels qRT-PCR quantifiziert und mit jener in den Kontrollzellen (siGFP) verglichen. Dabei konnte kein Einfluss auf die Replikation der viralen RNA detektiert werden (Abbildung 3.5 C).

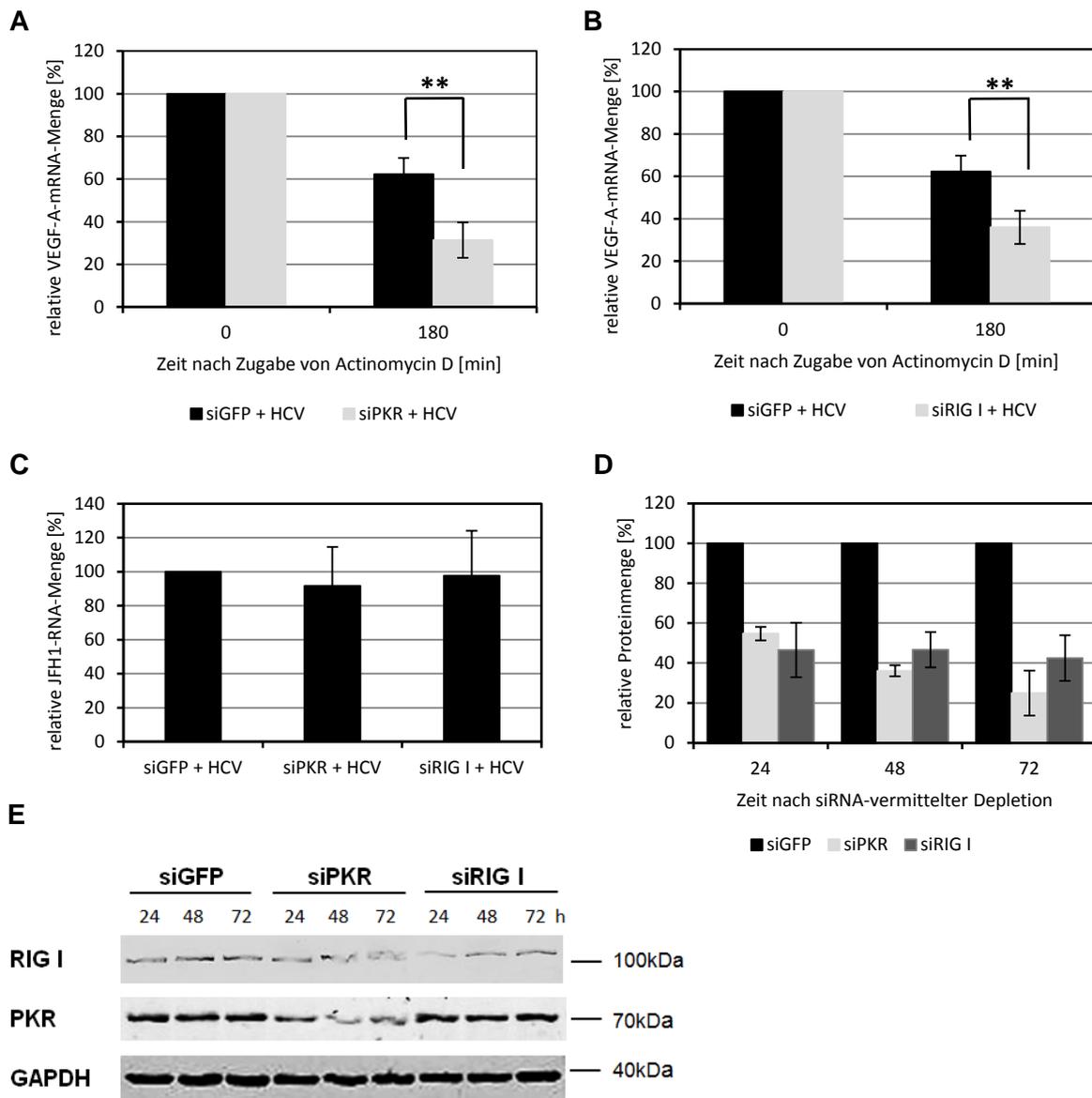


Abbildung 3.5: Die zellulären Proteine PKR und RIG I stellen essentielle Determinanten der HCV-induzierten Stabilisierung der VEGF-A-mRNA dar. (A,B) Huh7-Zellen wurden 24 h nach siRNA-vermittelter Depletion der zellulären Proteine PKR (A) bzw. RIG I (B) transient mit dem HCV-Replikon transfiziert und 48 h *p.t.* die VEGF-A-mRNA-Degradation mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay analysiert. Als Kontrolle dienten Huh7-Zellen, welche mit einer GFP-spezifischen siRNA behandelt und anschließend analog mit dem HCV-Replikon transfiziert wurden. Die jeweiligen Mittelwerte der residualen VEGF-A-mRNA-Menge zum Zeitpunkt 180 min der beiden Datensätze wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (**) $P < 0,001$. (C) Analyse der HCV-RNA-Menge in PKR- bzw. RIG I-depletierten Huh7-Zellen, sowie in Kontrollzellen (siGFP) 48 h nach der Transfektion mit dem HCV-Replikon mittels qRT-PCR. Die in den Kontrollzellen gemessene HCV-RNA-Menge wurde als 100% definiert. Die HCV-RNA-Mengen der PKR- bzw. RIG I-depletierten Zellen sind als Relativwerte, bezogen auf den 100%-Wert, angegeben. (D) Quantifizierung der mittels Western Blot detektierten PKR- bzw. RIG I-Mengen in Huh7-Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach siRNA-vermittelter Depletion von PKR (siPKR) bzw. RIG I (siRIG I). Die in den Kontrollzellen (siGFP) quantifizierten PKR- bzw. RIG I-Mengen dienten als Referenz. (E) Repräsentativer Western Blot zum Nachweis der siRNA-vermittelten Depletion der zellulären Proteine PKR und RIG I 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung der Zellen mit den entsprechenden siRNAs (siGFP, siPKR, siRIG I).

Des Weiteren wurden Experimente mit Huh7.5-Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie unterscheidet sich von den ansonsten verwendeten Huh7-Zellen durch eine zum Funktionsverlust führende Punktmutation im Gen für RIG I (Threonin zu Isoleucin an Aminosäure-Position 55), wodurch die auf RIG I basierende Signalkaskade inhibiert wird (Blight *et al.* 2002, Sumpter *et*

al. 2005, Tanner *et al.* 2001). Die Huh7.5-Zellen wurden analog zu den Experimenten mit Huh7-Zellen transient mit den Replikons HCV und HCV-mut transfiziert und 48 h *p.t.* mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay die Degradation der VEGF-A-mRNA untersucht. Dabei replizierte die HCV-RNA in den Huh7.5-Zellen genauso effizient, wie in den Huh7-Zellen (Abbildung 3.6 B, vgl. Abbildung 3.2 A).

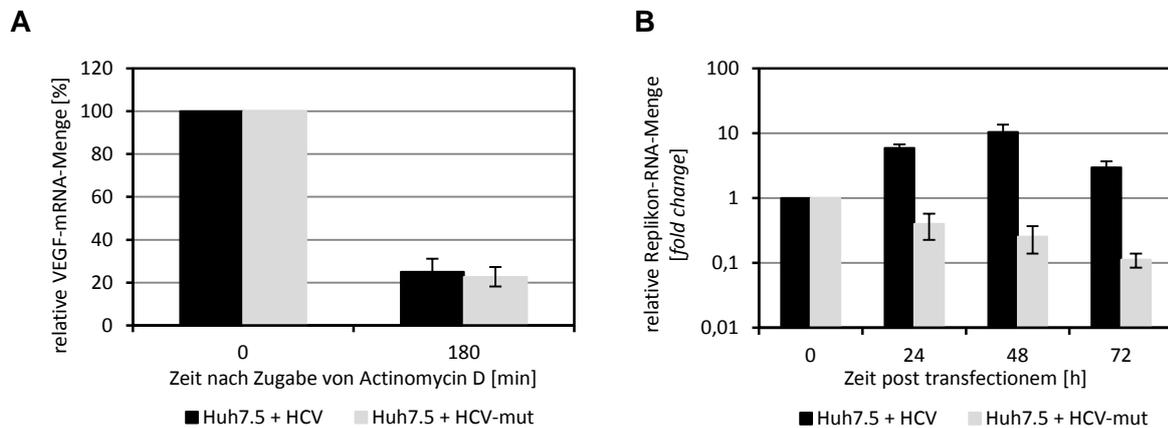


Abbildung 3.6: Die transiente Replikation des HCV-Replikons hat in Huh7.5-Zellen keinen Einfluss auf die VEGF-A-mRNA-Degradation. (A) Analyse der VEGF-A-mRNA-Degradation in Huh7.5-Zellen 48 h nach transienter Transfektion mit dem HCV- und dem HCV-mut-Replikon mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay. (B) Quantifizierung der relativen viralen RNA-Mengen 0 h, 24 h, 48 h, und 72 h nach transienter Transfektion von Huh7.5-Zellen mit dem HCV- und HCV-mut-Replikon mittels qRT-PCR. Die relativen viralen RNA-Mengen 24 h, 48 h und 72 h *p.t.* sind als prozentuale Werte angegeben, wobei die gemessene HCV-RNA-Menge 0 h *p.t.* als 1 definiert wurde.

Während in Huh7-Zellen als Folge der transienten Replikation des HCV-Replikons eine signifikante Erhöhung der VEGF-A-mRNA-Stabilität im Vergleich zu Kontrollzellen (transient mit dem HCV-mut-Replikon transfiziert) beobachtet wurde, ist dies in Huh7.5-Zellen nicht detektierbar (Abbildung 3.6 A). Dies bestätigt die Annahme, dass RIG I an der durch die Replikation des HCV-Replikons induzierten Stabilisierung der VEGF-A-mRNA beteiligt ist.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Proteine RIG I und PKR essentielle Faktoren für die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA sind. Auf welche Weise sie in diesen Prozess involviert sind, sollte im Weiteren näher untersucht werden.

3.3.2 Die transiente Replikation des HCV-Replikons induziert in Huh7-Zellen die Phosphorylierung von PKR und eIF2 α

Im Folgenden sollte die Rolle der PKR für den beobachteten Einfluss auf die VEGF-A-mRNA näher untersucht werden. Dabei ist von zentralem Interesse, dass die erhöhte Stabilität der VEGF-A-mRNA durch die Replikation des HCV-Replikons in Huh7-Zellen ausgelöst wird, nicht jedoch durch die Replikation des nahe verwandten WNV-Replikons. Es wurde vermutet, dass eine durch die Replikation des HCV-Replikons ausgelöste Signalkaskade, welche die verringerte Degradation der VEGF-A-mRNA bedingt, durch die Replikation des WNV-Replikons entweder nicht ausgelöst, oder aktiv inhibiert wird. Während bereits nachgewiesen

wurde, dass RIG I sowohl durch die Präsenz von HCV-RNA als auch von WNV-RNA aktiviert werden kann (Errett *et al.* 2013, Fredericksen *et al.* 2006, Fredericksen *et al.* 2008, Loo *et al.* 2011, Shipley *et al.* 2012), wird die Rolle der PKR als PRR der WNV-Replikation kontrovers diskutiert (Courtney *et al.* 2012, Elbahesh *et al.* 2011, Gilfoy *et al.* 2007). Es war deshalb von Interesse, ob die transiente Replikation des HCV- bzw. des WNV-Replikons in Huh7-Zellen die Aktivierung der PKR induziert. Es wird vermutet, dass die PKR nach Binden von dsRNA dimerisiert und anschließend aufgrund einer Autophosphorylierung aktiviert wird. Im aktiven Zustand kann die Kinase verschiedene Substrate phosphorylieren. Das wohl bedeutsamste dieser Substrate ist der eukaryotische Translations-Initiationsfaktor eIF2 α , dessen Phosphorylierung zur Inhibition der Translations-Initiation führt (Hershey 1989, Hershey 1991, Sudhakar *et al.* 2000). Als Reaktion auf die Detektion viraler RNA erscheint eine Translations-Inhibition für die Wirtszelle vorteilhaft, da dies auch die Synthese der viralen Proteine inhibiert, insofern deren Synthese von eIF2 α abhängig ist.

Um zu überprüfen, ob die Replikation von HCV- bzw. WNV-RNA in Huh7-Zellen eine Aktivierung der PKR auslöst, wurden die Zellen mit den Replikon-RNAs transient transfiziert und 12 h *p.t.*, sowie 48 h *p.t.* geerntet. Naive, sowie transient mit dem HCV-mut bzw. dem WNV-mut-Replikon transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Als Maß für die Aktivierung der PKR sollte die Phosphorylierung der PKR sowie die ihres Substrates eIF2 α mittels Western Blot überprüft werden. Es wurden deshalb Antikörper für die Detektion verwendet, welche spezifisch gegen die phosphorylierten Varianten von PKR (PKR-P) und eIF2 α (eIF2 α -P) gerichtet sind. Dabei konnte 12 h *p.t.* eine Phosphorylierung der Proteine PKR und eIF2 α in transient mit den Replikons HCV und HCV-mut transfizierten Zellen nachgewiesen werden, nicht jedoch in naiven, sowie in transient mit den Replikons WNV und WNV-mut transfizierten Zellen (Abbildung 3.7). Die detektierbare Menge an PKR-P und eIF2 α -P war in den Zellen mit dem transient replizierenden HCV-Replikon im Vergleich zu Zellen mit dem nicht-replizierenden HCV-mut-Replikon etwa um das 4-fache erhöht (Daten nicht gezeigt).

Es kann angenommen werden, dass die Aktivierung der PKR auf die Präsenz der HCV-RNA zurückzuführen ist. Die verstärkte Phosphorylierung von PKR und eIF2 α 12 h *p.t.* in den Zellen mit dem transient replizierenden HCV-Replikon im Vergleich zu Zellen mit dem nicht-replizierenden HCV-mut-Replikon könnte daraus resultieren, dass die virale RNA-Menge aufgrund der Replikation in den HCV-transfizierten Zellen erhöht ist. 48 h *p.t.* konnte die Phosphorylierung von PKR und eIF2 α ausschließlich in den Zellen detektiert werden, in denen das HCV-Replikon transient replizierte. In Zellen, welche mit dem WNV- und dem WNV-mut-Replikon transfiziert wurden, konnte zu keinem Zeitpunkt eine Phosphorylierung von PKR und eIF2 α beobachtet werden. Es kann geschlussfolgert werden, dass bei transientser Replikation des WNV-Replikons die PKR entweder durch Absenz essentieller Determinanten

nicht aktiviert wird, oder deren Aktivierung inhibiert wird. Unter der Annahme, dass die Aktivierung der PKR für das Auslösen der putativen Signalkaskade, welche zur Stabilisierung der VEGF-A-mRNA führt, essentiell ist, könnte dies erklären, warum die transiente Replikation des HCV-Replikons die Stabilität der VEGF-A-mRNA erhöht, nicht jedoch die transiente Replikation des WNV-Replikon. Es muss angemerkt werden, dass eIF2 α auch von anderen Kinasen phosphoryliert werden kann (Han *et al.* 2001, Harding *et al.* 2000, Kimball 1999, Lu *et al.* 2001). Die detektierte Phosphorylierung von eIF2 α könnte somit potentiell auch auf eine andere Kinase als die PKR zurückzuführen sein.

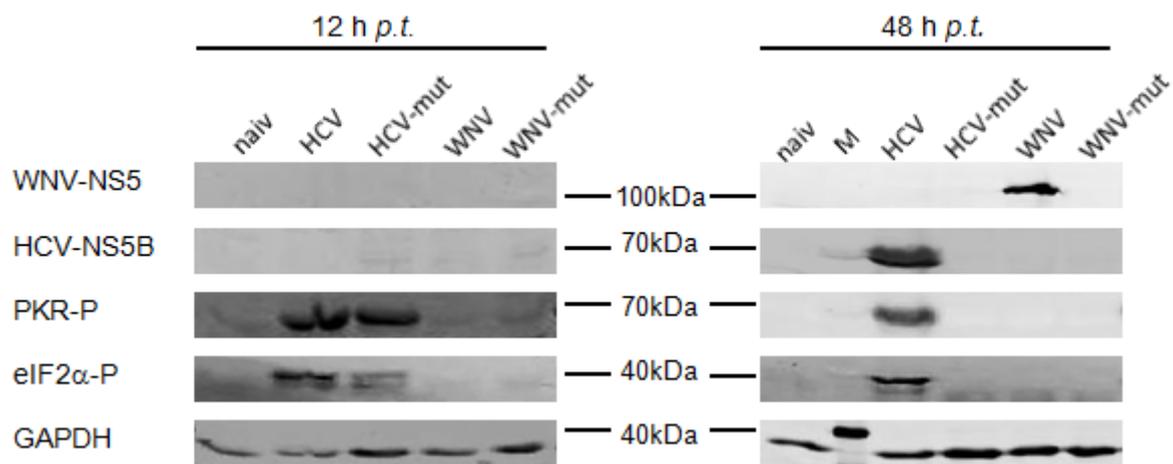


Abbildung 3.7: Aktivierung der PKR durch HCV-RNA. Western-Blot von eIF2 α -P, GAPDH und PKR-P in Gesamtzell-Proben von naiven Huh7-Zellen, sowie nach transienter Transfektion von Huh7-Zellen mit dem HCV-, dem HCV-mut-, dem WNV- und dem WNV-mut-Replikon 12 h *p.t.* (Abbildung links), sowie 48 h *p.t.* (Abbildung rechts). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Der Nachweis der viralen Proteine HCV-NS5B bzw. WNV-NS5. Das Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. M – Marker

Es kann zusammengefasst werden, dass die intrazelluläre Präsenz der HCV- und der HCV-mut-RNA zur Phosphorylierung von PKR und eIF2 α führt. Dabei induziert die replizierende HCV-RNA eine stärkere Phosphorylierung der beiden Proteine als die replikationsdefiziente HCV-mut-RNA. Im Gegensatz zur HCV-RNA, induzierten die WNV-, sowie die WNV-mut-RNA keine Phosphorylierung von PKR und eIF2 α .

3.3.3 Die simultane Transfektion des WNV- und des HCV-mut-Replikons induziert die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA

Wie bereits in Kapitel 3.3.2 angedeutet, kann spekuliert werden, dass die transiente Replikation des HCV-Replikons in Huh7-Zellen zelluläre Komponenten und/oder Signalkaskaden aktiviert, welche entweder durch die WNV-Replikation nicht aktiviert oder sogar inhibiert werden. In beiden Fällen wäre es denkbar, dass durch die simultane intrazelluläre Präsenz der replikationsdefizienten HCV-mut-RNA und der replizierenden WNV-RNA die notwendigen

Voraussetzungen gegeben sind, um diese Signalkaskade zu aktivieren und somit die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung zu induzieren.

Deshalb wurden Huh7-Zellen transient mit der *in vitro* transkribierten RNA der beiden Replikons WNV und HCV-mut simultan transfiziert und die Degradation der VEGF-A-mRNA mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay 48 h *p.t.* analysiert. Neben dieser Co-Transfektion wurden Transfektionen der einzelnen Replikons als Negativkontrolle mitgeführt. Wie in Abbildung 3.8 A dargestellt, entsprach die residuale VEGF-A-mRNA-Menge 180 min nach Actinomycin D-Zugabe in mit beiden RNAs simultan transfizierten Huh7-Zellen (mit ca. 67% der Ausgangs-Transkriptmenge) in etwa der Menge, welche bei transients Replikation des HCV-Replikons detektiert wurde (vgl. Kapitel 3.2). Die Transfektion der einzelnen Replikon-RNAs (WNV, HCV-mut) hatte wie erwartet keinen Einfluss auf die Degradation der VEGF-A-mRNA. Zudem wurde die Halbwertszeit der VEGF-A-mRNA in Huh7-Zellen 48 h nach simultaner Transfektion des WNV- und des HCV-mut-Replikons mittels Actinomycin D-Assay bestimmt. Unter Annahme einer vollständigen Degradation der VEGF-A-mRNA entsprach sie jener nach Transfektion der Huh7-Zellen mit dem HCV-Replikon (vgl. Anhang 8.4).

Unter der Annahme, dass die HCV-RNA den Auslöser des Prozesses darstellt, welcher zu der verringerten Degradation der VEGF-A-mRNA führt, erscheint es zunächst kontrovers, dass die transiente Transfektion von Huh7-Zellen mit der HCV-mut-RNA nicht zur Stabilisierung der VEGF-A-mRNA führt. Es muss jedoch beachtet werden, dass die virale RNA innerhalb der Wirtszelle Degradationsprozessen unterliegt, welche bei einer nicht replizierenden viralen RNA zum vollständigen Abbau führt. Es wäre somit denkbar, dass die beobachteten Unterschiede nach transients Transfektion von Huh7-Zellen mit dem HCV-Replikon und der HCV-mut-RNA darauf zurückzuführen sind, dass aufgrund der Replikation der HCV-RNA höhere virale RNA-Mengen innerhalb der Zelle vorliegen. Eine positive Korrelation zwischen der Quantität der viralen RNA innerhalb der Wirtszellen und der Stabilität der VEGF-A-mRNA erschien zunächst plausibel, da die maximale Stabilität der VEGF-A-mRNA 48 h nach transients Transfektion der Huh7-Zellen mit dem HCV-Replikon detektierbar ist, was dem Zeitpunkt der maximalen viralen Replikation entspricht.

Deshalb war es von entscheidender Bedeutung zu überprüfen, ob bei simultaner Transfektion der Replikons WNV und HCV-mut ein Einfluss auf die Quantität der HCV-mut-RNA im Vergleich zur alleinigen Transfektion mit HCV-mut-RNA festgestellt werden kann. Die simultane intrazelluläre Präsenz von WNV- und HCV-mut-RNA könnte zum einen aufgrund von Konkurrenz um die zelluläre Degradationsmaschinerie den Abbau der HCV-mut-RNA inhibieren, zum anderen musste ausgeschlossen werden, dass die durch die Translation des WNV-Replikons synthetisierten Proteine die HCV-mut-RNA *in trans* replizieren. Deshalb wurden Huh7-Zellen zum einen simultan mit den Replikons WNV und HCV-mut und zum anderen

nur mit dem HCV-mut-Replikon transient transfiziert. Im Zeitraum bis 48 h *p.t.* wurden zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils Proben entnommen und die HCV-mut-RNA-Quantitäten mittels qRT-PCR ermittelt. Die HCV-mut-RNA-Mengen, welche in den Zellen jeweils unmittelbar nach der Transfektion gemessen wurden (Zeitpunkt 0 h), wurden als 100% definiert und die RNA-Mengen der übrigen Zeitwerte auf diesen Anfangswert bezogen. Es ist anzumerken, dass zum Zeitpunkt 0 h in beiden Proben (HCV-mut transient, WNV + HCV-mut transient) ähnliche Quantitäten der HCV-mut-RNA detektiert wurden. Wie Abbildung 3.8 B entnommen werden kann, konnte durch simultane Transfektion mit dem WNV-Replikon kein Einfluss auf die Quantität der HCV-mut-RNA festgestellt werden. Die Degradation der nicht replizierenden HCV-mut-RNA verlief bei beiden Transfektionen analog. Die bei Co-Transfektion der Replikons WNV und HCV-mut beobachtete erhöhte Stabilität der VEGF-A-mRNA ist somit nicht auf unterschiedliche Quantitäten der HCV-mut-RNA in den Wirtszellen zurückzuführen.

Die PAMPs der HCV-RNA, welche zur Aktivierung der PRRs führen, sind bereits in früheren Studien identifiziert worden [RIG I: Triphosphat-Struktur am 5' Terminus, poly-U/UC-Motive in 3'UTR der viralen RNA (Hornung *et al.* 2006, Pichlmair *et al.* 2006, Schmidt *et al.* 2009, Schnell *et al.* 2012, Yoneyama *et al.* 2004); PKR: virale IRES (Arnaud *et al.* 2011, Shimoike *et al.* 2009, Toroney *et al.* 2010)]. Da die HCV-mut-RNA diese Elemente enthält, wurde vermutet, dass ihre intrazelluläre Präsenz die Aktivierung der PRRs induzieren kann, welche als essentielle Komponenten der HCV-induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung identifiziert wurden. Da die alleinige transiente Transfektion der HCV-mut-RNA jedoch keinen Einfluss auf die VEGF-A-mRNA-Degradation ausübt, wurde weiterhin spekuliert, dass neben der Präsenz viraler RNA, welche die entsprechenden PAMPs enthält, auch die virale Replikation für die Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung essentiell ist.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die transiente Transfektion der Huh7-Zellen mit dem HCV-Replikon in der Aktivierung der PKR resultiert, die mit dem WNV-Replikon hingegen nicht (vgl. Kapitel 3.3.2) und weiterhin bekannt war, dass die PKR für die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA essentiell ist (vgl. Kapitel 3.3.1), sollte im Folgenden untersucht werden, ob die simultane Transfektion von Huh7-Zellen mit den Replikons WNV und HCV-mut in der Aktivierung der PKR resultiert. Zu diesem Zweck wurde in analoger Vorgehensweise zu dem in Kapitel 3.3.2 erläuterten Experiment 12 h und 48 h nach der Co-Transfektion von Huh7-Zellen mit dem WNV- und dem HCV-mut-Replikon die Aktivierung der PKR mittels Western Blot überprüft. Als Kontrollen dienten naive Huh7-Zellen, sowie transient mit dem HCV-mut-, bzw. dem WNV-Replikon transfizierte Zellen. Wie in Abbildung 3.8 C dargestellt, konnte die Phosphorylierung der Proteine PKR und eIF2 α 12 h nach simultaner Transfektion der Replikons WNV und HCV-mut ebenso nachgewiesen werden, wie

nach transientscher Transfektion des HCV-mut-Replikons. In den Proben der naiven bzw. transient mit dem WNV-Replikon transfizierten Zellen konnten hingegen keine Signale für die phosphorylierten Varianten von PKR und eIF2 α detektiert werden. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit den in Kapitel 3.3.2 dargestellten Ergebnissen. Zum Zeitpunkt 48 h *p.t.* konnte in keiner der Proben eine Phosphorylierung dieser Proteine nachgewiesen werden. Es kann vermutet werden, dass dies auf die Degradation der HCV-mut-RNA zurückzuführen ist. Dass die simultane Transfektion von Huh7-Zellen mit dem WNV- und dem HCV-mut-Replikon zum Zeitpunkt 48 h *p.t.* dennoch in einer erhöhten Stabilität der VEGF-A-mRNA resultiert, deutet darauf hin, dass die Aktivierung der PKR zum Zeitpunkt 48 h *p.t.* nicht essentiell für die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA ist.

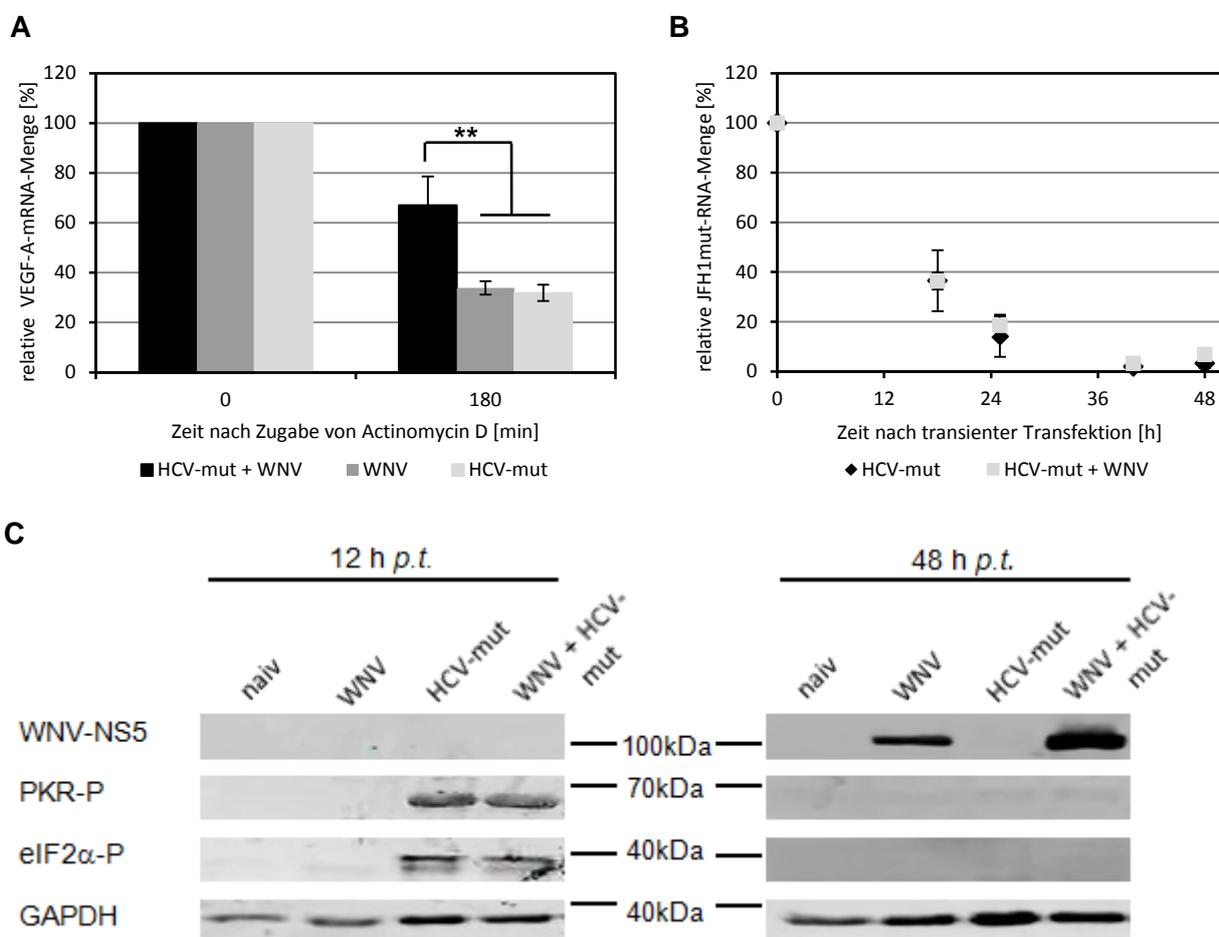


Abbildung 3.8: Die simultane Transfektion von Huh7-Zellen mit dem WNV- und dem HCV-mut-Replikon induziert die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA. (A) Analyse der VEGF-A-mRNA-Degradation in Huh7-Zellen 48 h nach transientscher Transfektion mit dem WNV-Replikon, dem HCV-mut-Replikon bzw. simultaner Transfektion beider Replikons durch Actinomycin D-Endpunkt-Assay. Die jeweilige gemessene VEGF-A-mRNA-Menge der transient transfizierten Zellen zu Beginn des Actinomycin D-Endpunkt-Assays wurde als 100% definiert (0 min). Die Mittelwerte wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf signifikante Abweichung hin geprüft. (**) $P < 0,001$ (B) Bestimmung der relativen HCV-mut-RNA-Menge nach transientscher Transfektion von Huh7-Zellen mit dem HCV-mut-Replikon bzw. simultaner Transfektion der Replikons WNV und HCV-mut mittels qRT-PCR. (C) Repräsentativer Western Blot der Proteine GAPDH, PKR-P und eIF2 α -P 12 h *p.t.* (Abbildung links), sowie 48 h *p.t.* (Abbildung rechts) in Gesamtzell-Proben von naiven Huh7-Zellen, sowie nach transientscher Transfektion von Huh7-Zellen mit dem WNV-, bzw. dem HCV-mut-Replikon und simultaner Transfektion mit beiden Replikons. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Der Nachweis der WNV-Replikation erfolgte durch Detektion der viralen Polymerase WNV-NS5. Das Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Es kann angenommen werden, dass die simultane Transfektion mit replizierender WNV-Replikon-RNA und nicht replizierender HCV-mut-RNA einen vergleichbaren Prozess aktiviert, wie die transiente Replikation des HCV-Replikons. In beiden Fällen sind sowohl eine replizierende virale RNA als auch die PAMPs der HCV-RNA in den Wirtszellen präsent. Es erscheint plausibel, dass bei simultaner Transfektion mit replizierender WNV-Replikon-RNA und nicht replizierender HCV-mut-RNA die Rolle der HCV-mut-RNA in der Aktivierung der PKR und der darauffolgenden Phosphorylierung von eIF2 α besteht.

3.3.4 Die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA kann in Huh7-Zellen, in denen das WNV-Replikon transient repliziert, durch Tunicamycin induziert werden

In Säugetierzellen sind bisher 4 Kinasen bekannt, welche als Reaktion auf verschiedene Arten von Stress, eIF2 α phosphorylieren können. Dazu gehören die bereits beschriebene PKR, welche durch dsRNA aktiviert wird und somit einen zentralen Faktor bei der Erkennung viraler Infektionen darstellt (Diebold *et al.* 2003, McAllister *et al.* 2009, McAllister *et al.* 2012, Williams 2001), sowie die *PKR-like endoplasmatic reticulum kinase* (PERK), welche als Konsequenz von ER-Stress aktiviert wird (Harding *et al.* 2000).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob bei Aktivierung der PERK (alternativ zur PKR) in Zellen, in denen das WNV-Replikon transient repliziert, ebenfalls ein Einfluss auf die Stabilität der VEGF-A-mRNA nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zweck wurde ER-Stress durch Applikation von Tunicamycin in das Zellkulturmedium induziert. Dieses Nukleosid-Antibiotikum hemmt die N-Glycosylierung von Proteinen im ER, wodurch die *unfolded protein response* (UPR) ausgelöst wird. Diese umfasst neben Änderungen der Genexpression auch die durch die PERK vermittelte Inhibition der Translation durch Phosphorylierung von eIF2 α (Harding *et al.* 2000). Die bei transienter Transfektion von Huh7-Zellen mit dem HCV-Replikon induzierte Phosphorylierung von eIF2 α , welche vermutlich durch die PKR vermittelt wird, kann somit durch Stimulation der Zellen mit Tunicamycin imitiert werden.

Zum Nachweis der ER-Stress-Induktion durch Tunicamycin wurden bereits mehrere Methoden etabliert (Samali *et al.* 2010). Dabei stellen die Transkripte von GRP78 und CHOP gängige Marker dar (siehe Anhang 8.5). Auch die Phosphorylierung von eIF2 α , sowie das Spleißen der *X box-binding protein 1* (XBP1)-mRNA können zum Nachweis der ER-Stress-Induktion untersucht werden. Die als Folge der UPR aktivierte Endonuklease ERN1 (*endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1*) spaltet die XBP1-mRNA, wodurch das anschließend translatierte Protein XBP1 als Transkriptionsfaktor agieren kann (Calfon *et al.* 2002, Lee *et al.* 2003). Mittels RT-PCR können unter Verwendung geeigneter Primer sowohl die gespleißte als auch die ungespleißte Variante dieses Transkripts nachgewiesen werden (Samali *et al.*

2010). In Vorversuchen wurden Huh7-Zellen mit Tunicamycin behandelt und die Induktion von ER-Stress mittels der beschriebenen Methoden überprüft. Dabei konnten die Phosphorylierung von eIF2 α , eine erhöhte GRP78- und CHOP-Transkriptmenge und die gespleißte XBP1-mRNA nachgewiesen werden (siehe Anhang 8.5). In den folgenden Experimenten erfolgte der Nachweis der ER-Stress-Induktion anhand des XBP1-mRNA-Spleißens. Dabei wurde der Zeitraum von 0 - 12 h nach Zugabe von Tunicamycin betrachtet, da in den Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass das charakteristische kürzere XBP1-Transkript bis 12 h nach der Behandlung der Zellen mit Tunicamycin nachweisbar ist.

Es war von Interesse, ob die Induktion von ER-Stress mittels Tunicamycin in Zellen, in denen das WNV-Replikon transient repliziert, in einer erhöhten Stabilität der VEGF-A-mRNA resultiert. Zu diesem Zweck wurden Huh7-Zellen zunächst analog zu den vorherigen Experimenten mit der WNV-RNA transfiziert und 0 h, 24 h oder 36 h *p.t.* durch Applizieren von Tunicamycin in das Zellkulturmedium ER-Stress induziert. Zum Nachweis der erfolgreichen ER-Stress-Induktion wurde das Spleißen der XBP1-mRNA 0 h, 4 h, 8 h und 12 h nach der Zugabe von Tunicamycin mittels RT-PCR untersucht. Dabei konnte in allen mit Tunicamycin stimulierten Zellen das charakteristische kürzere XBP1-Transkript nachgewiesen werden (Abbildung 3.9 B). Des Weiteren wurde die Degradation der VEGF-A-mRNA 48 h *p.t.* mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay untersucht. Wie in Abbildung 3.9 A dargestellt, konnte bei Stimulieren der Zellen mit Tunicamycin unmittelbar nach der Transfektion mit dem WNV-Replikon (0 h *p.t.*) eine erhöhte Stabilität der VEGF-A-mRNA detektiert werden. Bei Zugabe von Tunicamycin zu späteren Zeitpunkten nach der Transfektion (24 h, 36 h *p.t.*) war die Degradation der VEGF-A-mRNA hingegen unverändert. Als Referenz dienten dabei transient mit dem WNV-Replikon transfizierte Huh7-Zellen, welche nicht mit Tunicamycin stimuliert wurden. Somit scheint das Auftreten von ER-Stress zu frühen Zeitpunkten nach dem Eintritt der viralen RNA von entscheidender Bedeutung zu sein. Die Induktion von ER-Stress durch Tunicamycin in naiven Huh7-Zellen übte keinen Einfluss auf die VEGF-A-mRNA-Degradation aus (Daten nicht gezeigt). Es kann spekuliert werden, dass der erhöhten Stabilität der VEGF-A-mRNA in mit Tunicamycin behandelten Zellen, in denen das WNV-Replikon transient repliziert, die gleichen Mechanismen zu Grunde liegen, wie in transient mit dem HCV-Replikon oder simultan mit dem WNV- und dem HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen.

Dass sich weder die Präsenz nicht replizierender HCV-mut-RNA, noch die Induktion von ER-Stress in Huh7-Zellen mittels Tunicamycin als hinreichend erwies, um die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA zu induzieren, deutet darauf hin, dass weitere, bisher unbestimmte Faktoren essentiell sind, um die putative Signalkaskade auszulösen, welchen den Einfluss auf die VEGF-A-mRNA-Degradation bedingen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA in transient mit dem WNV-Replikon transfizierten Zellen durch

zusätzliche Stimuli induziert werden kann. Dabei erwies sich sowohl die Transfektion mit der HCV-mut-RNA, als auch die Behandlung der transfizierten Zellen mit Tunicamycin als hinreichender zusätzlicher Stimulus.

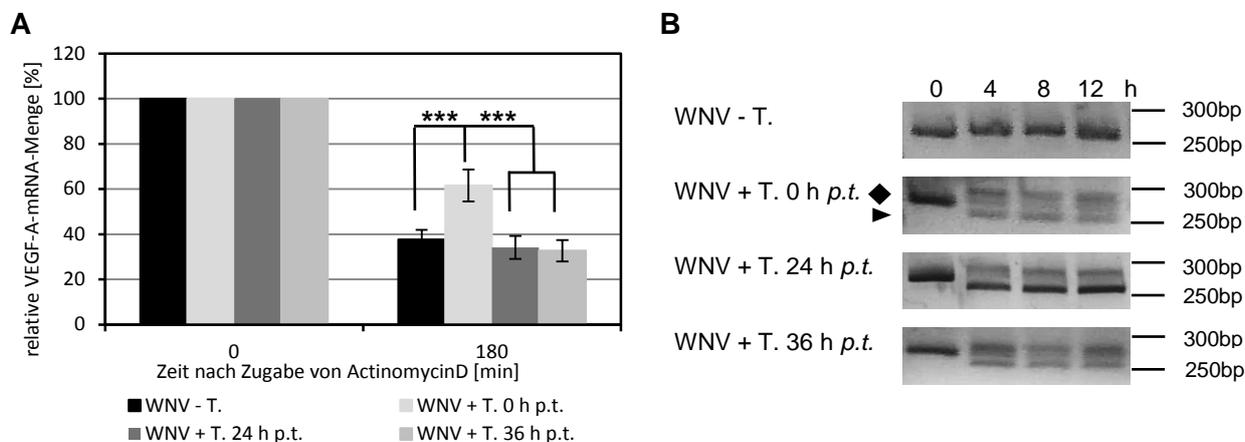


Abbildung 3.9: Induktion von ER-Stress durch Tunicamycin. Huh7-Zellen wurden transient mit dem WNV-Replikon transfiziert und 0 h, 24 h bzw. 36 h *p.t.* durch Applikation von Tunicamycin in das Zellkulturmedium ER-Stress induziert. Als Negativkontrolle dienten mit dem WNV-Replikon transfizierte Zellen, welche nicht mit Tunicamycin behandelt wurden (WNV-T.). (A) Analyse der VEGF-A-mRNA-Degradation 48 h *p.t.* mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay. Die Mittelwerte wurden mittels eines Studentschen T-Tests auf signifikante Abweichung hin geprüft. (***) $P < 0,0001$. (B) Analyse des Spleißens der XBP1-mRNA zum Nachweis der erfolgreichen Induktion von ER-Stress. Die Zellernte erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von Tunicamycin in das Zellkulturmedium (0 h, 4 h, 8 h und 12 h). Es ist zu beachten, dass die Proben der Negativkontrolle (WNV-T.) 0 h, 4 h, 8 h und 12 h nach der Transfektion geerntet wurden. Unter Verwendung geeigneter Primer können mittels RT-PCR sowohl die ungespleißte (angedeutet durch Raute) als auch die gespleißte Variante (angedeutet durch Pfeilspitze) des XBP1-Transkripts nachgewiesen werden. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid unter Anregung durch UV-Licht visualisiert.

3.3.5 Die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung kann in der persistenten HCV-Zelllinie durch Phosphorylierung von eIF2 α rekonstituiert werden

Wie bereits in Kapitel 1.4 erwähnt, kann das HCV-Replikon auch persistent in Huh7-Zellen replizieren. Im Gegensatz zur transienten Transfektion ist dies gekennzeichnet durch die dauerhafte Replikation der viralen RNA in den Wirtszellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die persistente HCV-Zelllinie Huh7/JFH1 verwendet (siehe 2.1.3). Wie ebenfalls in Kapitel 1.4 erwähnt, wurde in Vorarbeiten beobachtet, dass sich die VEGF-A-mRNA-Degradation in der persistenten HCV-Zelllinie nicht von der in naiven Huh7-Zellen unterscheidet (¹). Die Stabilisierung dieser mRNA kann also bei transienter, nicht jedoch bei persistenter Replikation des HCV-Replikons nachgewiesen werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung in der persistenten HCV-Zelllinie wiederhergestellt werden kann (durch ÜE von TIA1-vl) (¹). Es kann spekuliert werden, dass bezüglich der putativ durch die HCV-Replikation aktivierten Signalkaskade eine zelluläre Gegenregulation existiert, welche zur Deaktivierung dieser Kaskade führt. Es erscheint plausibel, dass in Folge der Deaktivierung der Signalkaskade die Degradation der VEGF-A-mRNA in persistent mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen wieder dem Ausgangszustand (naive Huh7-Zellen) entspricht.

Die in den Kapiteln 3.3.2, 3.3.3 und 3.3.4 dargestellten Daten deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung von eIF2 α z.B. durch die Kinasen PKR (aktiviert durch HCV- oder HCV-mut-RNA) oder PERK (aktiviert durch ER-Stress), an der Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung beteiligt ist. Daher war von Interesse, ob die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie durch Phosphorylierung von eIF2 α rekonstituiert werden kann. Deshalb wurde in der persistenten HCV-Zelllinie durch Zugabe von Tunicamycin in das Zellkulturmedium ER-Stress induziert. Nach 6 h, 9 h, 12 h und 18 h wurden die Phosphorylierung von eIF2 α mittels Western Blot (Abbildung 3.10 C) und die Degradation der VEGF-A-mRNA mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay untersucht (Abbildung 3.10 A). Unbehandelte Zellen der persistenten HCV-Zelllinie dienten dabei als Negativkontrolle. Es konnte gezeigt werden, dass die VEGF-A-mRNA 9 h und 12 h nach Tunicamycin-Zugabe eine erhöhte Stabilität aufweist. Nach 6 h und 18 h hingegen konnte keine Stabilisierung dieser mRNA nachgewiesen werden. Phosphoryliertes eIF2 α konnte 6 h, 9 h, 12 h und 18 h nach der Zugabe von Tunicamycin nachgewiesen werden. Interessanterweise wurden 9 h bzw. 12 h nach der ER-Stress-Induktion höhere eIF2 α -P-Quantitäten detektiert, als nach 6 h bzw. 18 h. Es kann zusammengefasst werden, dass in der persistenten HCV-Zelllinie die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung durch Behandlung mit Tunicamycin in einem begrenzten Zeitrahmen rekonstituiert werden kann. Es erscheint plausibel, dass zu späteren Zeitpunkten (>12 h nach Tunicamycin-Zugabe) die putative zelluläre Gegenregulation die Ursache für die wieder abnehmende VEGF-A-mRNA-Stabilität darstellt. Die Induktion von ER-Stress in naiven Huh7-Zellen mittels Tunicamycin hatte keinen Einfluss auf die Degradation der VEGF-A-mRNA (Daten nicht gezeigt).

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden Überexpressionsstudien mit PKR und eIF2 α in der persistenten HCV-Zelllinie durchgeführt. Dazu wurden zum einen Plasmide verwendet, welche die heterologe Expression der Wildtyp-Varianten von PKR und eIF2 α erlauben (siehe Anhang 8.3). Zum anderen wurden Plasmide generiert, die geeignet waren, um die Aktivierung der PKR *in vivo* zu imitieren. Die PKR kann strukturell in eine Kinase-Domäne und eine dsRNA-Bindedomäne (dsRBD) unterteilt werden. Entsprechend eines der derzeit gängigen Modelle der PKR-Aktivierung wird angenommen, dass intramolekulare Interaktionen zwischen der dsRBD und der Kinasedomäne aufgrund der resultierenden Proteinkonformation die Kinaseaktivität der PKR inhibieren. Durch Interaktion der dsRBD mit dsRNA wird die Proteinkonformation verändert und die PKR somit aktiviert. Die separate Translation der Kinasedomäne resultiert somit in einer konstitutiv aktiven PKR-Mutante, da der inhibierende Einfluss der dsRBD eliminiert wurde. Die Generierung und Funktionalität solcher PKR-Mutanten ist bereits beschrieben worden (Nanduri *et al.* 1998, Nanduri *et al.* 2000, Wu *et al.* 1997).

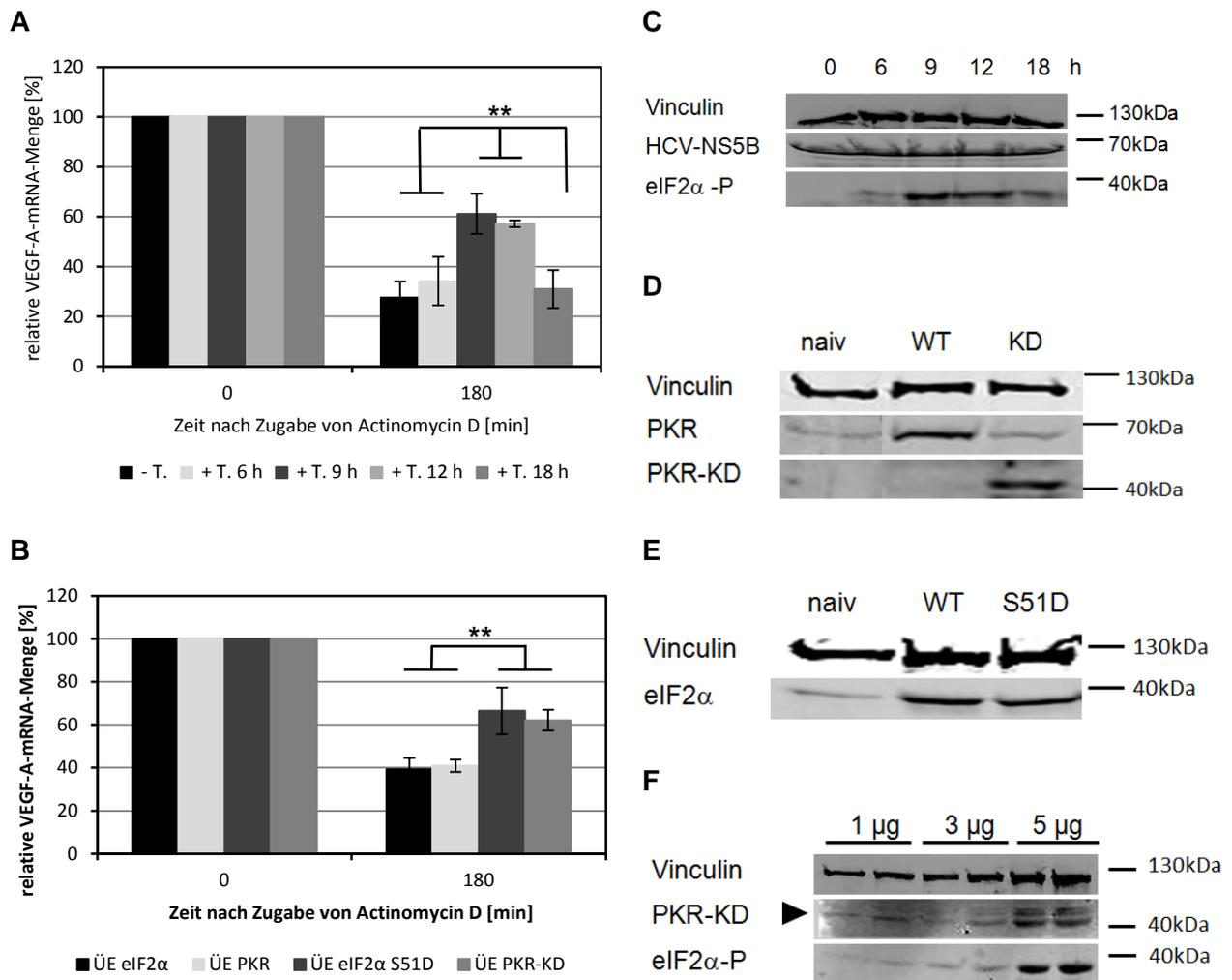


Abbildung 3.10: Die Phosphorylierung von eIF2 α in der persistenten HCV-Zelllinie rekonstituiert die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung. (A, B) Analyse der VEGF-A-mRNA-Degradation durch Actinomycin D-Endpunkt-Assay. Die jeweilige gemessene VEGF-A-mRNA-Menge zu Beginn des Actinomycin D-Endpunkt-Assays wurde als 100% definiert (0 min). Die Mittelwerte wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf signifikante Abweichung hin geprüft. (**) $P < 0,001$. (A, C) In der persistenten HCV-Zelllinie wurde durch Zugabe von Tunicamycin (T.) in das Zellkulturmedium ER-Stress induziert. (A) Der Actinomycin D-Endpunkt-Assay wurde 6 h, 9 h, 12 h oder 18 h nach Tunicamycin-Zugabe durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen der persistenten HCV-Zelllinie (-T.) (B) 24 h nach der ÜE der Wildtyp-Proteine eIF2 α und PKR, sowie der Varianten PKR-KD und eIF2 α S51D in Zellen der persistenten HCV-Zelllinie wurde ein Actinomycin D-Endpunkt-Assay durchgeführt. (C) Repräsentativer Western Blot von Vinculin und phosphoryliertem eIF2 α zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Behandlung der Zellen der persistenten HCV-Zelllinie mit Tunicamycin. (D, E) Repräsentative Western Blots zum Nachweis der Synthese der (D) PKR- und (E) eIF2 α -Varianten in Gesamtzell-Proben von unbehandelten Zellen der persistenten HCV-Zelllinie, sowie 24 h nach der Transfektion der Plasmide, welche für die Wildtyp-Varianten (WT), sowie die konstitutiv aktive PKR-Kinase-Domäne (KD) bzw. die pseudophosphorylierte eIF2 α -Variante (S51D) codieren. Aufgrund der Deletion der Aminosäuren 2-170 beträgt das Molekulargewicht der PKR-KD-Variante (KD) etwa 43 kDa (angedeutet durch Pfeilspitze). (F) Repräsentativer Western Blot von PKR, eIF2 α -P und Vinculin in Gesamtzell-Proben von Zellen der persistenten HCV-Zelllinie 24 h nach der Transfektion von 1 μ g (je Kavität einer 6-well-Platte), 3 μ g bzw. 5 μ g des für die konstitutiv aktive PKR-KD codierenden Plasmids. (C-F) Vinculin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Plasmid konstruiert, welches für eine PKR-Mutante codiert, bei der die dsRBD (Aminosäureposition 2-170) deletiert ist (im Folgenden als PKR-KD bezeichnet). Des Weiteren wurde eine phosphomimetische Variante von eIF2 α generiert (Austausch des Serins an Aminosäureposition 51 gegen Aspartat, im Folgenden als

eIF2 α S51D bezeichnet). Die generierten Plasmide wurden in Zellen der persistenten HCV-Zelllinie transfiziert und die Expression mittels Western Blot überprüft. Wie in Abbildung 3.10 D und E dargestellt, konnte die Synthese sowohl der Wildtyp-Proteine (PKR, eIF2 α), als auch der Mutanten (PKR-KD, eIF2 α S51D) in den entsprechend transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Hierbei wurde bei Transfektion der Zellen mit dem PKR-KD-Plasmid die Phosphorylierung von eIF2 α als Maß für die Funktionalität der PKR-KD betrachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Transfektion zunehmender Quantitäten des PKR-KD-Plasmids mit einer erhöhten Phosphorylierung von eIF2 α korreliert (Abbildung 3.10 F).

Im Folgenden wurde die VEGF-A-mRNA-Degradation in der persistenten HCV-Zelllinie 24 h nach der Transfektion der generierten Konstrukte mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay analysiert (Abbildung 3.10 B). Es ist anzumerken, dass nach längerfristiger ÜE der Varianten eIF2 α S51D und PKR-KD die Vitalität der Zellen eingeschränkt war und daher eine Analyse der VEGF-A-mRNA-Degradation zu späteren Zeitpunkten nicht durchgeführt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die ÜE der Varianten eIF2 α S51D und PKR-KD in der persistenten HCV-Zelllinie die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA rekonstituiert. Die ÜE der Wildtyp-Varianten (PKR, eIF2 α) hatte hingegen keinen Einfluss auf die VEGF-A-mRNA-Degradation. Bei Transfektion von Huh7-Zellen mit den generierten Plasmiden für die ÜE von eIF2 α , eIF2 α S51D, PKR und PKR-KD blieb die VEGF-A-mRNA-Stabilität unverändert (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt die bisherige Annahme, dass die Phosphorylierung von eIF2 α an der Stabilisierung der VEGF-A-mRNA beteiligt ist. Dabei erscheint es unerheblich, wodurch die Phosphorylierung induziert wird. Es wurde daher geschlossen, dass die Stabilisierung der VEGF-mRNA ein der eIF2 α -Phosphorylierung nachgeordnetes Ereignis darstellt.

Da bereits bekannt war, dass die Proteine PKR und RIG I für die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA essentiell sind, sollte zudem überprüft werden, ob diese beiden Proteine in der persistenten HCV-Zelllinie in ähnlichen Mengen vorhanden sind wie in Huh7-Zellen. Somit sollte ausgeschlossen werden, dass die fehlende Stabilisierung der VEGF-A-mRNA in den persistent transfizierten Zellen darauf zurückzuführen ist, dass die Expression von PKR und/oder RIG I in der persistenten HCV-Zelllinie herunterreguliert ist. Bei der Analyse von Gesamtzell-Extrakten von Huh7-Zellen und Zellen der persistenten HCV-Zelllinie mittels Western Blot konnten keine signifikanten Unterschiede der PKR- bzw. RIG I-Quantitäten detektiert werden (Abbildung 3.11). Es kann somit angenommen werden, dass die erhöhte VEGF-A-mRNA-Degradation bei persistenter Transfektion der Zellen mit dem HCV-Replikon im Vergleich zu transienter Transfektion nicht aus einer unterschiedlichen Expression von PKR und/oder RIG I resultiert.

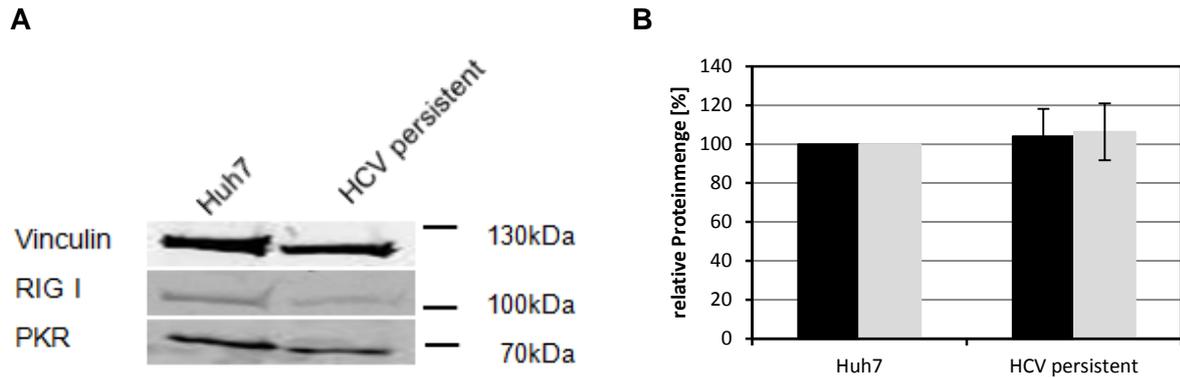


Abbildung 3.11: PKR und RIG I sind in Huh7-Zellen und der persistenten HCV-Zelllinie in ähnlichen Quantitäten vorhanden. (A) Repräsentativer Western Blot von PKR und RIG I im Gesamtzell-Extrakt von Huh7-Zellen und Zellen der persistenten HCV-Zelllinie. Der Nachweis von Vinculin diente als Ladekontrolle und wurde zur Normalisierung der detektierten PKR- und RIG I-Signale verwendet. (B) Quantifizierung der detektierten PKR- und RIG I-Mengen in Huh7-Zellen und Zellen der persistenten HCV-Zelllinie. Die jeweiligen in den Huh7-Zellen detektierten Proteinmengen wurden als 100% definiert.

3.3.6 Die simultane Transfektion des WNV-Replikons und der HCV-IRES induziert die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA

Es war von Interesse, ob bestimmte Sequenzbereiche der HCV-mut-RNA definiert werden können, welche bei simultaner Transfektion mit dem WNV-Replikon in Huh7-Zellen zur Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung führen. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine am 3'Ende verkürzte Transkriptvariante der HCV-mut-RNA generiert. Diese wurde in Kombination mit dem WNV-Replikon transient in Huh7-Zellen transfiziert. Die Analyse der VEGF-A-mRNA-Degradation erfolgte analog zu vorherigen Experimenten mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay 48 h *p.t.* Das verkürzte Transkript umfasst die ersten 626 nt des HCV-Genoms und erwies sich als hinreichend, um bei simultaner Transfektion mit dem WNV-Replikon die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA zu induzieren (Daten nicht gezeigt). Dieser hochstrukturierte Bereich repräsentiert hauptsächlich die virale IRES, welche 4 *stemloop*-Strukturen (SL I, SL II, SL III und SL IV) enthält. Deshalb wurden im Folgenden Konstrukte generiert, welche beginnend vom authentischen viralen 5'Ende entweder alle vier *stemloops* (SL1-4), die *stemloops* I, II und III (SL1-3) oder die *stemloops* I und II (SL1-2) enthielten (Abbildung 3.12) (siehe Anhang 8.1 und 8.3). Die ausgehend von diesen Konstrukten synthetisierten *in vitro* Transkripte wurden in Kombination mit dem WNV-Replikon transient in Huh7-Zellen transfiziert. Dabei wurden die Quantitäten der von der HCV-IRES abgeleiteten RNAs so gewählt, dass sie sich äquimolar zu den in anderen Experimenten verwendeten 3 µg der HCV-mut-RNA verhielten.

Als Kontrollen dienten die simultane Transfektion der Replikons WNV und HCV-mut, sowie die Transfektion des WNV-Replikons. 48 h nach der Transfektion wurde die virale Replikation mittels Western Blot überprüft (Abbildung 3.12 C). Analog zu den bisherigen Experimenten wurde anschließend die VEGF-A-mRNA-Degradation (48 h *p.t.*) mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay und anschließender Quantifizierung mittels qRT-PCR untersucht. Es konnte

gezeigt werden, dass bei transienter Transfektion der SL1-4-RNA in Kombination mit dem WNV-Replikon die VEGF-A-mRNA stabilisiert ist (Abbildung 3.12 B). Die VEGF-A-mRNA-Menge 180 min nach Zugabe von Actinomycin D war dabei vergleichbar mit der bei transienter Transfektion der Huh7-Zellen mit dem HCV-Replikon oder dem WNV-Replikon in Kombination mit der HCV-mut-RNA. Bei transienter Transfektion der stärker verkürzten Replikon-Varianten (SL1-2 und SL1-3) in Kombination mit dem WNV-Replikon konnte kein Einfluss auf die VEGF-A-mRNA-Degradation detektiert werden. Interessant erscheint in diesem Kontext, dass bereits beschrieben wurde, dass die PKR an die HCV-IRES bindet und dadurch aktiviert wird. Dabei werden sowohl die *stemloops* III und IV (Shimoike *et al.* 2009), als auch der *stemloop* II als aktivierende Determinanten diskutiert (Toroney *et al.* 2010).

Zusätzlich wurde eine detaillierte Analyse der VEGF-A-mRNA-Degradation mittels Actinomycin D-Assay durchgeführt. Die berechneten Halbwertszeiten können dem Anhang entnommen werden (vgl. Anhang 8.4). Es kann geschlussfolgert werden, dass bei einer Co-Transfektion mit dem WNV-Replikon entweder der *stemloop* 4 oder alle 4 *stemloops* der HCV-IRES essentiell sind, um die putative Signalkaskade auszulösen, welche zur Stabilisierung der VEGF-A-mRNA führt. Bei transienter Transfektion der Transkripte SL1-2, SL1-3 und SL1-4 in Huh7-Zellen ohne simultane Transfektion des WNV-Replikons war die Degradation der VEGF-A-mRNA unverändert (Daten nicht gezeigt).

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die Co-Transfektion der WNV-RNA mit den beschriebenen verkürzten HCV-RNAs (SL1-4, SL1-3) in der Phosphorylierung der Proteine PKR und eIF2 α resultiert. Analog zu den in Kapitel 3.3.3 dargelegten Experimenten wurden deshalb 12 h, sowie 48 h nach der simultanen Transfektion von Huh7-Zellen mit dem WNV-Replikon und der SL1-4- bzw. der SL1-3-RNA Proben entnommen und mittels Western Blot analysiert. Dabei wurden Zellen, in denen das WNV-Replikon transient replizierte, als Negativkontrolle verwendet. Als Positivkontrolle dienten mit dem HCV-mut-Replikon, sowie simultan mit dem WNV- und dem HCV-mut-Replikon transfizierte Zellen (vgl. Kapitel 3.3.3). Wie Abbildung 3.12 zu entnehmen ist, konnte 12 h *p.t.* eine Phosphorylierung der Proteine PKR und eIF2 α sowohl in den Positivkontrollen, als auch in den Zellen nachgewiesen werden, welche simultan mit dem WNV-Replikon und der SL1-4-RNA transfiziert wurden. In der Negativkontrolle, sowie nach simultaner Transfektion der Zellen mit dem WNV-Replikon und der SL1-3-RNA konnte jedoch keine Phosphorylierung der beiden Proteine detektiert werden. 48 h *p.t.* lagen die beiden Proteine in keiner der Proben phosphoryliert vor (Daten nicht gezeigt).

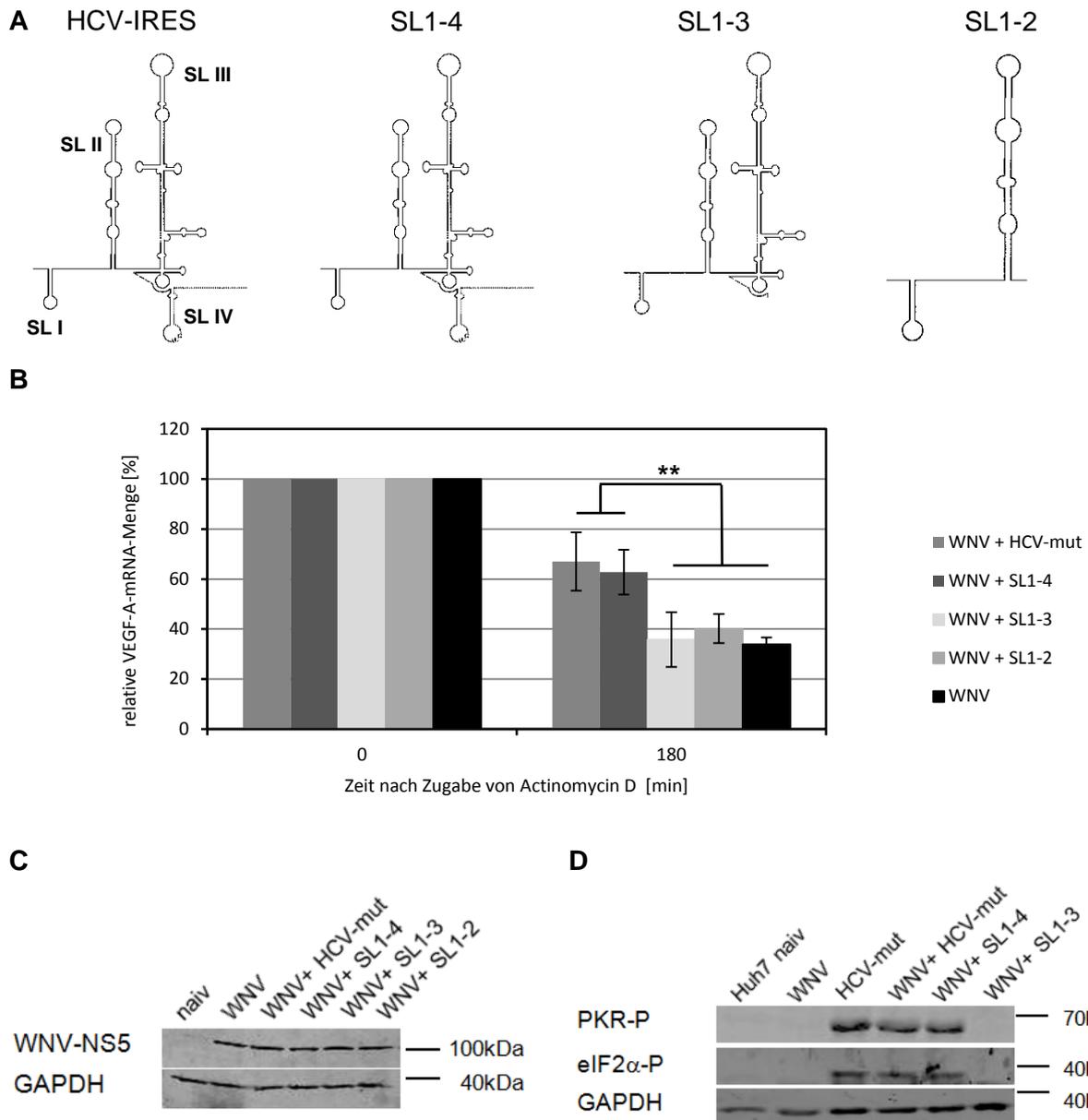


Abbildung 3.12: Die simultane Transfektion der SL1-4-RNA und des WNV-Replikons induziert die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA. (A) Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der HCV-IRES und der abgeleiteten RNAs (SL1-4, SL1-3, SL1-2). Abbildungen modifiziert nach (Laporte *et al.* 2003). (B) Analyse der VEGF-A-mRNA-Degradation in Huh7-Zellen 48 h nach transienter Transfektion mit dem WNV-Replikon sowie simultaner Transfektion des WNV-Replikons mit dem HCV-mut-Replikon bzw. den *in vitro* Transkripten SL1-2, SL1-3 und SL1-4 durch Actinomycin D-Endpunkt-Assay. Die jeweilige gemessene VEGF-A-mRNA-Menge der transient transfizierten Zellen zu Beginn des Actinomycin D-Endpunkt-Assays wurde als 100% definiert (0 min). Die Mittelwerte wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf signifikante Abweichung hin geprüft. (**) $P < 0,001$. (C) Repräsentativer Western Blot der Proteine WNV-NS5 und GAPDH (Ladekontrolle) in Gesamt-Zell-extrakten von naiven Huh7-Zellen, sowie 48 h nach der transienten Transfektion mit dem WNV-Replikon bzw. der simultanen Transfektion des WNV-Replikons mit der HCV-mut-, der SL1-4-, der SL1-3- und der SL1-2-RNA. (D) Repräsentativer Western Blot der Proteine PKR-P, eIF2 α -P und GAPDH (Ladekontrolle) in Gesamtzell-Extrakten von naiven Huh7-Zellen, sowie 12 h nach der transienten Transfektion mit dem WNV-Replikon, dem HCV-mut-Replikon bzw. der simultanen Transfektion des WNV- und des HCV-mut-Replikons, der SL1-4-RNA und der SL1-3-RNA. Das Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen deuten diese Daten darauf hin, dass die HCV-RNA, speziell die in der 5'UTR lokalisierte virale IRES die Aktivierung der PKR induziert. Des Weiteren korreliert die Aktivierung der PKR (zu frühen Zeitpunkten nach der Trans-

fektion) in simultan mit dem WNV-Replikon und der SL1-4-RNA transfizierten Zellen mit der Stabilisierung der VEGF-A-mRNA.

3.3.7 Die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA ist kein HCV-spezifischer Effekt

Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, wurde in den Vorarbeiten geschlussfolgert, dass die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA einen HCV-spezifischen Effekt darstellt, da die Replikation des nahe verwandten WNV-Replikons in Huh7-Zellen keinen Einfluss auf die Degradation dieser mRNA hatte (¹). Vor dem Hintergrund der zahlreichen Hinweise, dass die Phosphorylierung von eIF2 α , welche in der Inhibition der Translations-Initiation resultiert, an der Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung beteiligt ist, erschien eine erneute Betrachtung der verwendeten Replikonsysteme sinnvoll. Obwohl die zu Grunde liegenden Viren HCV und WNV in ihrer Genomorganisation sehr ähnlich und phylogenetisch nahe verwandt sind, weisen sie auch zahlreiche unterschiedliche Charakteristika auf. Ein entscheidender Unterschied besteht hinsichtlich der Translations-Initiation an der viralen RNA. Während die Translations-Initiation an der WNV-RNA von einer Typ I-cap-Struktur am 5' Terminus der viralen RNA abhängig ist, enthält die 5' UTR der HCV-RNA, wie bereits erwähnt, eine IRES, welche die direkte Assoziation an die 40S-Untereinheit der zellulären Ribosomen vermittelt. Es ist zudem für das HCV bereits beschrieben worden, dass neben der eIF2 α -vermittelten Translations-Initiation ein alternativer Mechanismus existiert, welcher unabhängig von eIF2 α ist (Khawaja *et al.* 2015, Kim *et al.* 2011, Terenin *et al.* 2008). Während somit die Translation der HCV-Proteine auch nach der Aktivierung der PKR und der resultierenden Inhibition der eIF2 α -abhängigen Translation weiterhin gewährleistet wäre, ist dies für WNV nicht der Fall.

Es war deshalb von Interesse, ob die Replikation anderer viraler RNAs, deren Translation entweder IRES-abhängig oder cap-abhängig verläuft, einen Einfluss auf die VEGF-A-mRNA-Degradation ausübt. Zu diesem Zweck wurden zwei weitere Replikon-Systeme ausgewählt: das vom BVDV-Genom (*bovine viral diarrhoea virus*) abgeleitete DI9c-Replikon (im Folgenden als BVDV-Replikon bezeichnet, siehe Anhang 8.3) (Behrens *et al.* 1998, Meyers *et al.* 1996), sowie ein vom Sindbis-Genom abgeleitetes Replikon (im Folgenden bezeichnet als Sin-Replikon). Das zu den Pestiviren gehörende BVDV ist mit dem HCV phylogenetisch nahe verwandt und weist mit diesem zahlreiche Gemeinsamkeiten auf. So weisen beide Viren eine ähnliche Genomorganisation auf und sind durch eine cap-unabhängige, IRES-vermittelte Translation charakterisiert. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete, monocistronische BVDV-Replikon stellt eine Modifikation des von Dr. C. W. Grassmann generierten Replikons dar (Behrens *et al.* 1998). Ein vom HDV abgeleitetes Ribozym bildet das äußere 3' Ende des Genoms (analog zu den verwendeten WNV- und HCV-Replikons) (Abbildung 3.13 A und B). Das Replikon codiert für die Autoprotease N^{pro}, sowie für alle zur Replikation der viralen RNA

benötigten Nicht-Strukturproteine (NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Es können jedoch keine Viruspartikel synthetisiert werden, da die vom BVDV-Genom codierten Strukturproteine C, E^{ms}, E1, E2 und p7 deletiert wurden. Neben dem BVDV-Replikon wurde analog zum HCV- und WNV-Replikon eine korrespondierende Replikon-Variante verwendet, welche aufgrund einer Mutation in der für die virale RdRP codierenden Sequenz replikationsdefizient ist (im Folgenden bezeichnet als BVDV-mut).

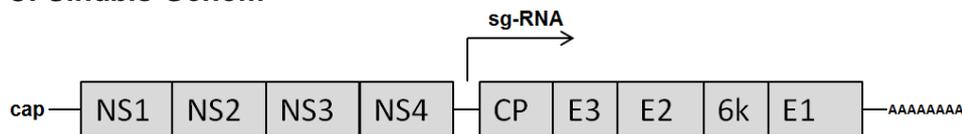
A: BVDV-Genom



B: monocistronisches BVDV-Replikon (BVDV)



C: Sindbis-Genom



D: Sindbis-Expressionssystem (Sin-Replikon)



Abbildung 3.13: Strukturelle Organisation der Genome und Replikons des Sindbis und BVDV. (A-D) Die viralen proteincodierenden Regionen sind eingerahmt, die nicht translatierten Bereiche sind als schwarze Linien gekennzeichnet. (A, B) Die BVDV-RNA codiert für ein Polyprotein, welches co- und posttranslational durch zelluläre und virale Proteasen in die einzelnen Proteine gespalten wird. Der einzelne ORF wird am 5' und 3' Ende von nicht translatierten Regionen (UTR) flankiert. Die Translation der viralen Proteine wird durch die in der 5'UTR lokalisierte IRES vermittelt. (B) Durch Deletion der Strukturproteine C, E^{ms}, E1, E2 und p7 können keine neuen Viruspartikel synthetisiert werden. Das äußere 3' Ende des Replikons bildet ein Ribozym des Hepatitis-D-Virus (HDVr), welches die einheitliche Generierung des authentischen viralen 3' Endes vermittelt. (C, D) Die Replikation der Sindbis-RNA wird durch die Nicht-Strukturproteine NS1-NS4 vermittelt. Die virale RNA wird flankiert von einem poly(A)-Schwanz am 3' Ende (gekennzeichnet als AAAAAAA) und einer cap-Struktur am 5' Ende (cap), welche die Translations-Initiation vermittelt. (C) Während der Replikation des Sindbis-Virus tritt neben dem vollständigen Genom eine subgenomische RNA-Spezies (sg-RNA) auf, welche die Translation der Strukturproteine vermittelt. (D) Das Sindbis-Expressionssystem ist dazu geeignet, eine durch Klonierung inserierte heterologe Sequenz zu exprimieren. Durch Deletion der für die Strukturproteine codierenden Region können keine viralen Partikel gebildet werden.

Das Genom des zu den Alphaviren zählenden Sindbis-Virus hingegen wird cap-abhängig translatiert und besitzt als einziges der in dieser Arbeit verwendeten Replikons einen poly(A)-Schwanz am 3' Ende der viralen RNA. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein kommerziell erhältliches Sindbis-System (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) verwendet, welches sich zur transienten Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen eignet. Im Wesentlichen wurden die von einer subgenomischen RNA codierten Strukturproteine (CP, E3, E2, 6k, E1) des Sindbis-Genoms (Abbildung 3.13 C) deletiert, welche für die Synthese neuer Viruspartikel essentiell sind. Die Sequenz codiert jedoch für alle für die Replikation der viralen RNA benötigten Nicht-Strukturproteine (NS1–NS4), welche zudem die Expression einer he-

terologen Sequenz ermöglichen (Abbildung 3.13 D). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieses System jedoch nicht zur Expression eines Fremd-Gens verwendet, sondern diente nur der Untersuchung der Sindbis-Replikation. Es ist anzumerken, dass im Falle des Sin-Replikons keine korrespondierende, replikationsdefiziente Variante zur Verfügung stand. Analog zu den verwendeten HCV- und WNV-Replikons (vgl. 3.1) wurden auch das BVDV- und das Sin-Replikon durch *in vitro* Transkription generiert und durch Elektroporation transient in Huh7-Zellen transfiziert. Durch Quantifizierung der viralen RNA-Menge zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion mittels qRT-PCR, konnte die Replikation beider Replikons in Huh7-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.14 A und B). Es ist anzumerken, dass die maximale virale Replikation des BVDV-Replikons 24 h und die des Sin-Replikons 12 bis 24 h nach der Transfektion detektierbar war. Deshalb wurden die im Folgenden aufgeführten Experimente mit dem BVDV- und dem Sin-Replikon 24 h nach der transienten Transfektion durchgeführt.

Nach dem erfolgreichen Nachweis der Replikation des BVDV- und des Sin-Replikons in Huh7-Zellen wurde die VEGF-A-mRNA-Degradation analog zu den Experimenten mit den WNV- und HCV-Replikons mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay 24 h *p.t.* untersucht (Abbildung 3.14 C). Es konnte gezeigt werden, dass die transiente Replikation des BVDV-Replikons in Huh7-Zellen die Stabilität der VEGF-A-mRNA erhöht. Die residuale VEGF-A-mRNA-Menge 180 min nach Actinomycin D-Zugabe entsprach mit ca. $63 \pm 2\%$ in etwa der, welche auch bei transienter Replikation des HCV-Replikons detektiert wurde (vgl. Kapitel 3.2). Die transiente Transfektion mit der replikations-defizienten BVDV-mut-RNA, sowie dem replizierenden Sin-Replikon hatte hingegen keinen Einfluss auf die VEGF-A-mRNA-Degradation (Abbildung 3.14 C). Interessanterweise resultierte auch die Co-Transfektion der BVDV-mut-RNA mit dem WNV-Replikon zum Zeitpunkt 48 h *p.t.* in der Stabilisierung der VEGF-A-mRNA (residuale VEGF-A-mRNA-Menge 180 min nach Zugabe von Actinomycin D: $66 \pm 11\%$ der VEGF-A-Ausgangs-mRNA-Menge) (Daten nicht gezeigt).

Es kann geschlossen werden, dass die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA keinen HCV-spezifischen Effekt darstellt. Es wird stattdessen spekuliert, dass der Modus der Translations-Initiation (cap-abhängig oder IRES-vermittelt) ein entscheidendes Kriterium bezüglich der Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung darstellt. Grundlage dieser Hypothese bildet die Beobachtung, dass die Replikation der beiden verwendeten Replikons, welche durch eine IRES-vermittelte Translation charakterisiert sind (HCV, BVDV), die Stabilität der VEGF-A-mRNA erhöhten, die Replikation der beiden verwendeten Replikons, deren Translation cap-abhängig verläuft (WNV, Sin), hingegen nicht.

In Übereinstimmung mit den in Kapitel 3.3.2 dargestellten Ergebnissen konnte zudem gezeigt werden, dass auch die transiente Transfektion von Huh7-Zellen mit dem BVDV- und

dem BVDV-mut-Replikon in der Aktivierung der PKR zum Zeitpunkt 12 h *p.t.* resultiert (Abbildung 3.14 D). Zum Zeitpunkt der maximalen viralen Replikation (24 h *p.t.*) konnte ausschließlich in den Zellen, in denen das BVDV-Replikon transient replizierte, eine Phosphorylierung der Proteine PKR und eIF2 α nachgewiesen werden. In Huh7-Zellen, in denen das Sin-Replikon transient replizierte, konnte die Phosphorylierung der beiden Proteine nicht nachgewiesen werden.

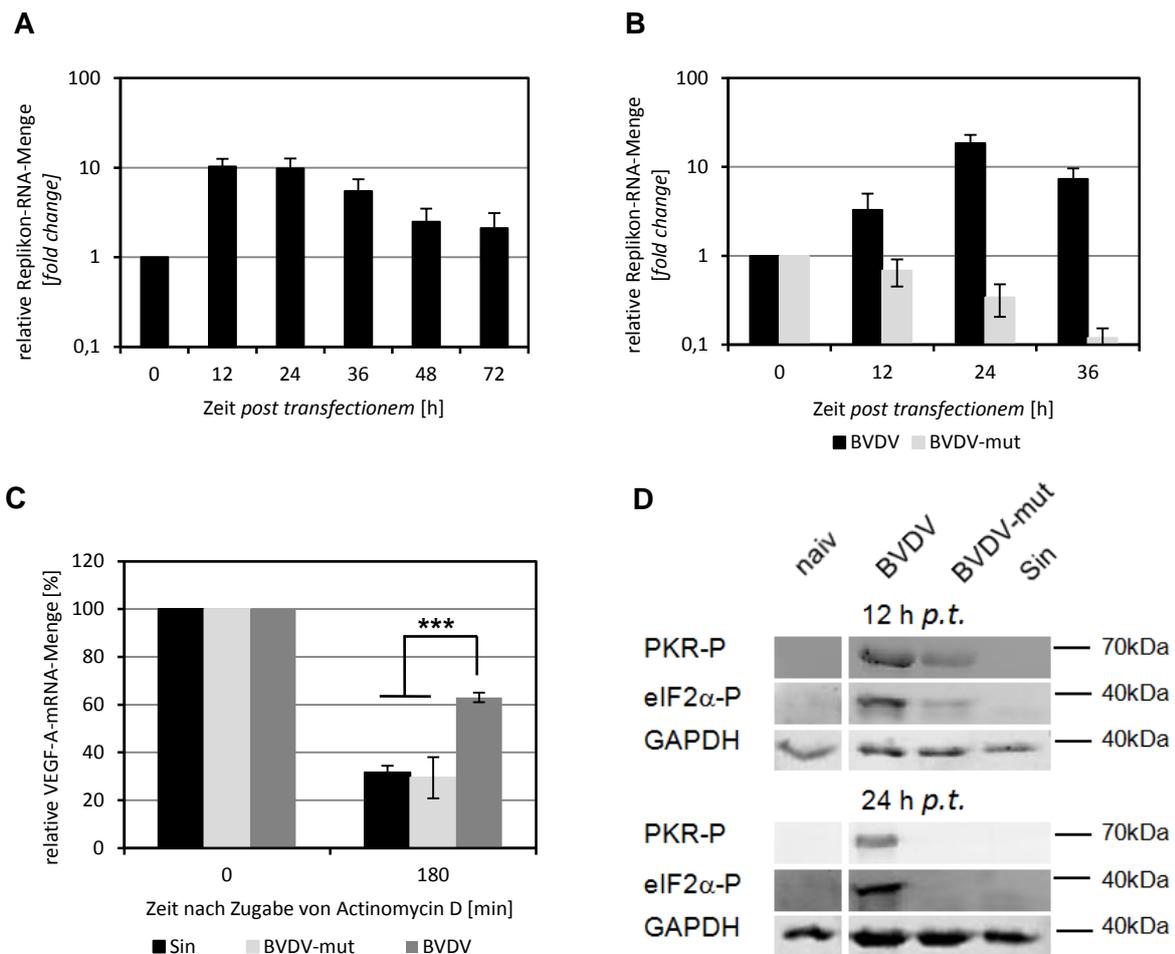


Abbildung 3.14: Die transiente Replikation des BVDV-Replikons in Huh7-Zellen induziert die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA. (A, B) Quantifizierung der relativen viralen RNA-Mengen nach transienter Transfektion von Huh7-Zellen mit dem (A) Sin-Replikon bzw. mit (B) dem BVDV- und dem BVDV-mut-Replikon mittels qRT-PCR. Die relativen viralen RNA-Mengen sind prozentual angegeben, wobei die gemessene Sin- bzw. BVDV-RNA-Menge 0 h *p.t.* als 1 definiert wurde. (C) Analyse der VEGF-A-mRNA-Degradation in Huh7-Zellen 24 h nach transienter Transfektion mit dem Sindbis-, dem replikations-defizienten BVDV-mut- und dem BVDV-Replikon durch Actinomycin D-Endpunkt-Assay. Die jeweilige gemessene VEGF-A-mRNA-Menge der transient transfizierten Zellen zu Beginn des Actinomycin D-Endpunkt-Assays wurde als 100% definiert (0 min). Die Mittelwerte wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf signifikante Abweichung hin geprüft. (***) $P < 0,0001$. (D) Repräsentativer Western Blot von PKR-P, eIF2 α -P und GAPDH (Ladekontrolle) im Gesamtzell-Extrakt von naiven Huh7-Zellen, sowie 12 h (Abbildung oben) bzw. 24 h (Abbildung unten) nach der transienten Transfektion von Huh7-Zellen mit dem BVDV-, dem BVDV-mut- sowie dem Sin-Replikon. Das Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Des Weiteren war von Interesse, ob die beobachtete Stabilisierung der VEGF-A-mRNA einen Zelltyp-spezifischen Effekt darstellt. Da das HCV jedoch vorwiegend in hepatischen Zellen repliziert und eine optimale Detektion der viralen Replikation in Hepatomzelllinien (z.B.

Huh7-Zellen) möglich ist, wurde die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA ausschließlich in Huh7-Zellen untersucht.

Nachdem jedoch nachgewiesen werden konnte, dass auch die Replikation des BVDV-Replikons die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA induziert, konnten entsprechende Experimente in anderen Zelllinien durchgeführt werden, da dieses Replikon in zahlreichen Zelllinien replikationsfähig ist. Deshalb wurden zum einen Hek293T-RExTM- und zum anderen HeLa-Zellen in analoger Vorgehensweise zu den vorherigen Experimenten transient mit den Replikons BVDV, BVDV-mut, WNV und WNV-mut transfiziert. Sowohl das BVDV- als auch das WNV-Replikon replizieren effizient in diesen Zelllinien. Der Nachweis der viralen Replikation erfolgte mittels Western Blot zum Zeitpunkt der maximalen viralen Replikation (BVDV: 24 h *p.t.*, WNV: 48 h *p.t.*) (Abbildung 3.15 C, D).

Zum selben Zeitpunkt wurde anschließend die VEGF-A-mRNA-Degradation mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay untersucht. Es wurde dabei nachgewiesen, dass die Replikation des BVDV-Replikons in beiden Zelltypen ebenfalls die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA induziert (Abbildung 3.15 A, B). Die residuale VEGF-A-mRNA-Menge 180 min nach Zugabe von Actinomycin D lag in HeLa-Zellen bei ca. $64 \pm 10\%$ und in Hek293T-RExTM-Zellen bei ca. $67 \pm 11\%$ der VEGF-A-Ausgangs-Transkriptmenge. Die transiente Transfektion beider Zelltypen mit dem BVDV-mut-, dem WNV- und dem WNV-mut-Replikon hatte keinen Einfluss auf die VEGF-A-mRNA-Degradation.

Analog zu den mit Huh7-Zellen durchgeführten Experimenten wurde auch in Hek293T-RExTM-Zellen untersucht, ob die transiente Replikation des BVDV-Replikons die Aktivierung der PKR induziert. Als Negativkontrolle dienten zum einen naive und zum anderen transient mit dem WNV-Replikon transfizierte Zellen. Zum Zeitpunkt der maximalen viralen Replikation (BVDV: 24 h *p.t.*, WNV: 48 h *p.t.*) wurden Proben entnommen und die Phosphorylierung von PKR und eIF2 α mittels Western Blot überprüft. Dabei konnte in den Zellen, in denen das BVDV-Replikon transient replizierte, eine Phosphorylierung der beiden Proteine nachgewiesen werden, nicht jedoch in den Negativkontrollen (Abbildung 3.15 E).

Es kann somit zusammengefasst werden, dass die viral induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung weder einen HCV-spezifischen, noch einen Zelltyp-spezifischen Effekt darstellt. Analog zu den Resultaten, welche unter Verwendung von Huh7-Zellen erzielt wurden, resultierte die transiente Replikation des BVDV-Replikons in Hek293T-RExTM-Zellen sowohl in der Phosphorylierung der Proteine PKR und eIF2 α , als auch in der Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung.

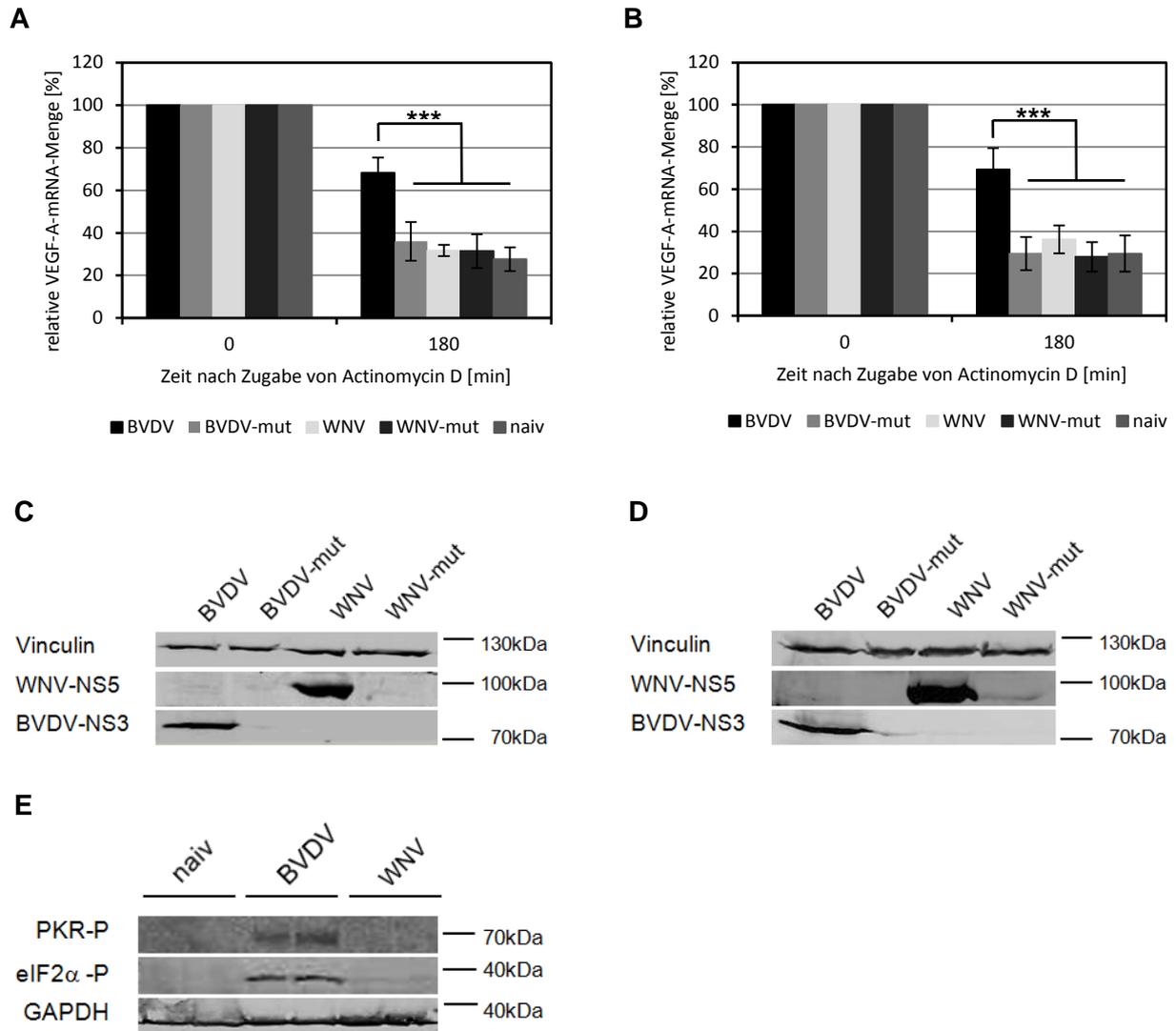


Abbildung 3.15: Die transiente Replikation des BVDV-Replikons induziert in HeLa- und Hek293T-RExTM-Zellen die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA. (A, B) Analyse der VEGF-A-mRNA-Degradation in naiven, sowie transient mit dem BVDV-, dem BVDV-mut-, dem WNV und dem WNV-mut-Replikon transfizierten (A) HeLa- und (B) Hek293T-RExTM-Zellen durch Actinomycin D-Endpunkt-Assay. Der Actinomycin D-Endpunkt-Assay wurde 24 h *p.t.* (BVDV-, BVDV-mut-Replikon) bzw. 48 h *p.t.* (WNV, WNV-mut-Replikon) durchgeführt. Die jeweilige gemessene VEGF-A-mRNA-Menge der transient transfizierten Zellen zu Beginn des Actinomycin D-Endpunkt-Assays wurde als 100% definiert (0 min). Die Mittelwerte wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf signifikante Abweichung hin geprüft. (***) $P < 0,0001$. (C, D) Repräsentative Western Blots von BVDV-NS3, WNV-NS5 und Vinculin im Gesamtzell-Extrakt von transient mit dem BVDV-, dem BVDV-mut-, dem WNV- bzw. dem WNV-mut-Replikon transfizierten HeLa-Zellen (C), sowie Hek293T-RExTM-Zellen (D). Die Probenahme erfolgte zum Zeitpunkt der maximalen viralen Replikation. (E) Repräsentativer Western Blot von PKR-P und eIF2 α -P in naiven, sowie transient mit dem BVDV-Replikon (24 h *p.t.*) bzw. dem WNV-Replikon (48 h *p.t.*) transfizierten Hek293T-RExTM-Zellen. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

3.3.8 Die IFN β -Antwort korreliert mit der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung

3.3.8.1 Induktion der IFN β -Antwort durch die Replikation des HCV- und WNV-Replikons

Die Erkennung viraler RNA initiiert eine antivirale Signalkaskade, in deren Verlauf die Synthese von IFN β induziert wird. Die cytoplasmatischen Rezeptoren PKR und RIG I sind dabei von entscheidender Bedeutung. Da bereits gezeigt werden konnte, dass diese beiden PRRs

für die beobachtete VEGF-A-mRNA-Stabilisierung essentiell sind, sollte im Folgenden eine mögliche Partizipation von $IFN\beta$ untersucht werden. Dabei wäre zum einen denkbar, dass die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA abhängig von der $IFN\beta$ -Synthese ist, zum anderen könnten die Induktion der $IFN\beta$ -Antwort und die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA voneinander unabhängige Ereignisse darstellen, welche jedoch beide durch die zellulären Komponenten PKR und RIG I vermittelt werden.

Deshalb sollte zunächst untersucht werden, ob die transiente Replikation des HCV- und des WNV-Replikons in Huh7-Zellen in der Transkriptions-Induktion von $IFN\beta$ resultiert. Zu diesem Zweck wurden Huh7-Zellen mit dem HCV-, dem HCV-mut, dem WNV- und dem WNV-mut-Replikon transfiziert und die Zellen 48 h *p.t.* geerntet. Die Quantifizierung der $IFN\beta$ -mRNA-Menge erfolgte mittels qRT-PCR. Dabei konnte gezeigt werden, dass die detektierbare $IFN\beta$ -mRNA-Menge in transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen im Vergleich zu transient mit dem HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen signifikant erhöht war. Dies ist vermutlich auf eine gesteigerte $IFN\beta$ -Transkription zurückzuführen. In WNV-transfizierten Zellen konnte hingegen keine Erhöhung der $IFN\beta$ -mRNA-Menge im Vergleich zu WNV-mut-transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Unter den verwendeten experimentellen Bedingungen scheint somit die Replikation des HCV-Replikons, nicht jedoch die des WNV-Replikons, einen positiven Einfluss auf die Transkription des $IFN\beta$ -Gens zu haben.

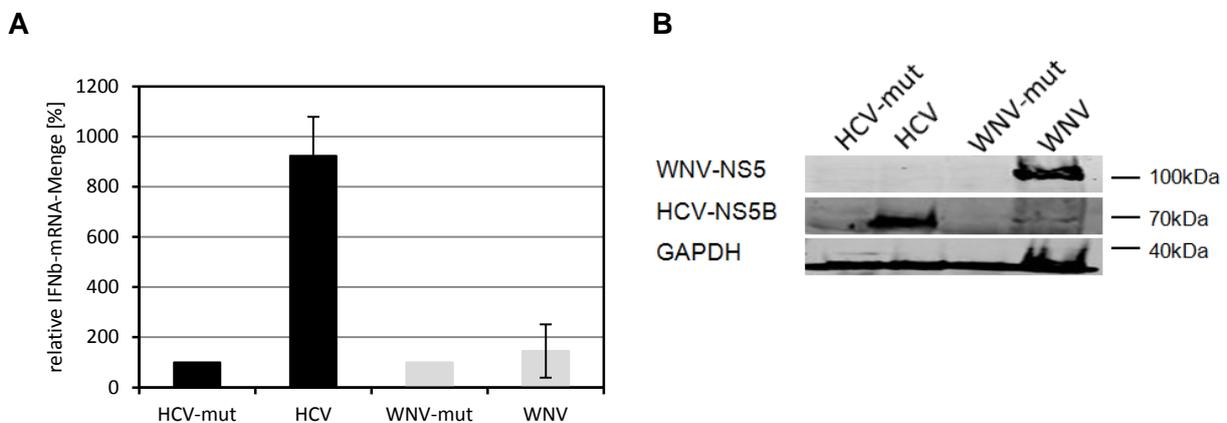


Abbildung 3.16: Die transiente Replikation des HCV-Replikons in Huh7-Zellen induziert die Transkription von $IFN\beta$. (A) Quantifizierung der relativen $IFN\beta$ -mRNA-Menge in Huh7-Zellen, in denen das HCV- bzw. das WNV-Replikon transient repliziert, (48 h *p.t.*) mittels qRT-PCR. Zellen, welche mit den jeweiligen replikationsdefizienten Replikons (HCV-mut, WNV-mut) transfiziert wurden, dienten dabei jeweils als Referenz. Die in diesen Zellen detektierte $IFN\beta$ -mRNA-Menge wurde als 100% definiert und die gemessene $IFN\beta$ -Transkript-Menge in mit dem HCV- bzw. dem WNV-Replikon transfizierten Zellen in Relation zu der jeweiligen Referenz gesetzt. (B) Repräsentativer Western Blot von WNV-NS5, HCV-NS5B und GAPDH (Ladekontrolle) zum Nachweis der viralen Replikation 48 h nach transienter Transfektion mit dem HCV-mut, dem HCV-, dem WNV-mut- und dem WNV-Replikon.

3.3.8.2 Die Überexpression von IFN β induziert die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA

Es war im Folgenden von Interesse, ob die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA durch IFN β induzierbar ist. Zu diesem Zweck wurde das humane IFN β durch Transfektion eines geeigneten Vektors (pcDNA5/TO-IFN β , siehe Anhang 8.3) sowohl in der persistenten HCV-Zelllinie, als auch Huh7-Zellen überexprimiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, welche mit dem pcDNA5-Vektor (ohne Insertion eines heterologen Gens) transfiziert wurden. 24 h nach der Plasmid-Transfektion wurde die VEGF-A-mRNA-Degradation mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay untersucht. Abbildung 3.17 verdeutlicht, dass durch ÜE von IFN β nicht nur in der persistenten HCV-Zelllinie, sondern auch in Huh7-Zellen die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA induziert werden kann. Die Transfektion der Zellen mit dem pcDNA5-Vektor (ohne Insertion eines heterologen Gens) hatte keinen Einfluss auf die Degradation der VEGF-A-mRNA. Die Transkription des *IFN β* -Gens wurde in den transfizierten Zellen mittels RT-PCR überprüft (Abbildung 3.17 C).

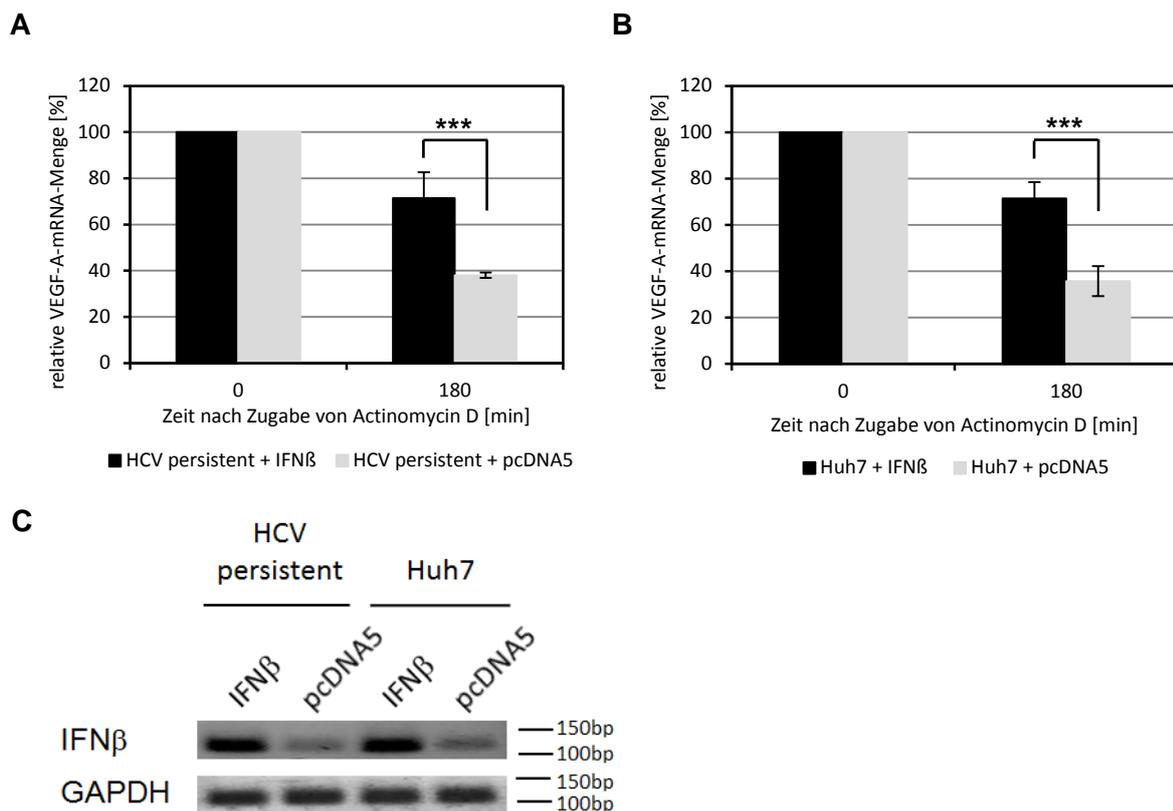


Abbildung 3.17: Die ÜE von IFN β induziert die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA in der persistenten HCV-Zelllinie und in Huh7-Zellen. (A, B) Analyse der VEGF-A-mRNA-Degradation (A) in der persistenten HCV-Zelllinie, sowie (B) in Huh7-Zellen 24 h nach der Transfektion des pcDNA5-Plasmids (pcDNA5) bzw. des für IFN β codierenden Plasmids (IFN β) durch Actinomycin D-Endpunkt-Assay. Die jeweilige gemessene VEGF-A-mRNA-Menge der transfizierten Zellen zu Beginn des Actinomycin D-Endpunkt-Assays wurde als 100% definiert (0 min). Die Mittelwerte wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf signifikante Abweichung hin geprüft. (***) $P < 0,0001$. (C) Repräsentatives 1%iges Agarosegel zum Nachweis der *IFN β* -Transkription 24 h nach der Transfektion von Zellen der persistenten HCV-Zelllinie und Huh7-Zellen mit dem für IFN β codierenden Plasmid bzw. dem pcDNA5-Vektor mittels RT-PCR. Neben dem cDNA-Analog des IFN β -Transkripts wurde auch das cDNA-Analog der GAPDH-mRNA (Kontrolle) detektiert. Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte mittels Ethidiumbromid unter Anregung durch UV-Licht.

Es kann zusammengefasst werden, dass die ÜE des *IFN β* -Gens sowohl in der persistenten HCV-Zelllinie als auch in Huh7-Zellen hinreichend ist, um die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA zu induzieren. Somit ist die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA auch unabhängig von der Replikation einer viralen RNA induzierbar.

3.3.8.3 Die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung wird durch JAK1 vermittelt

Die Typ I-Interferone binden an der Zelloberfläche an die Rezeptoren IFNAR1 und IFNAR2, welche mit Janus-Kinasen assoziiert sind. Dabei assoziiert IFNAR1 an die JAK-Kinasen TYK2 (*tyrosine kinase 2*) und IFNAR2 an die Janus-Kinase JAK1 (*janus kinase 1*) (Domanski *et al.* 1997, Yan *et al.* 1996). Die Bindung der Typ I-Interferone an die Rezeptoren resultiert in deren Dimerisierung, wodurch die Kinasen TYK2 und JAK1 phosphoryliert und damit aktiviert werden.

Es war von Interesse, ob die beobachtete Stabilisierung der VEGF-A-mRNA von diesem Signalweg vermittelt wird. Deshalb wurden Huh7-Zellen mit einer spezifischen siRNA behandelt, um JAK1 zu depletieren. 24 h nach der Depletion wurden die Zellen transient mit dem HCV-Replikon transfiziert und weitere 48 h später die VEGF-A-mRNA-Degradation mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay untersucht. Als Kontrolle dienten Huh7-Zellen, welche mit einer GFP-spezifischen siRNA behandelt und anschließend mit dem HCV-Replikon transfiziert wurden. Die Effizienz der siRNA-vermittelten Depletion wurde durch Quantifizierung der JAK1-Transkriptmenge zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion nachgewiesen, da kein geeigneter Antikörper zu Verfügung stand, um JAK1 mittels Western Blot zu detektieren. Die JAK1-mRNA-Menge war bei allen untersuchten Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle (0 h nach der siRNA-Transfektion) deutlich reduziert, was auf die Funktionalität der JAK1-spezifischen siRNA hindeutet (Abbildung 3.18 C). Wie in Abbildung 3.18 A dargestellt, konnte in den JAK1-depletierten Zellen, in denen das HCV-Replikon transient replizierte, keine Stabilisierung der VEGF-A-mRNA detektiert werden. Es war entscheidend zu überprüfen, ob die Depletion von JAK1 einen Einfluss auf die Replikation des HCV-Replikons ausübt. Deshalb wurde in den JAK1-depletierten Zellen 0 h, 24 h, 48 h und 72 h nach der transienten Transfektion des HCV-Replikons die HCV-RNA mittels qRT-PCR quantifiziert. Als Kontrolle dienten transient mit dem HCV-Replikon transfizierte Zellen, welche mit der GFP-spezifischen siRNA behandelt wurden. Analog zu den in Kapitel 3.1 dargestellten Daten wurde die jeweilige gemessene HCV-RNA-Menge unmittelbar nach der Transfektion als 100% definiert und die übrigen Werte in Relation zu dieser Ausgangsmenge gesetzt. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede der Replikationseffizienz detektierbar (Abbildung 3.18 B).

Es kann geschlussfolgert werden, dass der durch die HCV-Replikation induzierte Effekt auf die VEGF-A-mRNA-Degradation von JAK1 abhängig ist. Dies indiziert, dass der von den Typ I-Interferon-Rezeptoren ausgehende Signalweg an der Stabilisierung dieser mRNA beteiligt ist.

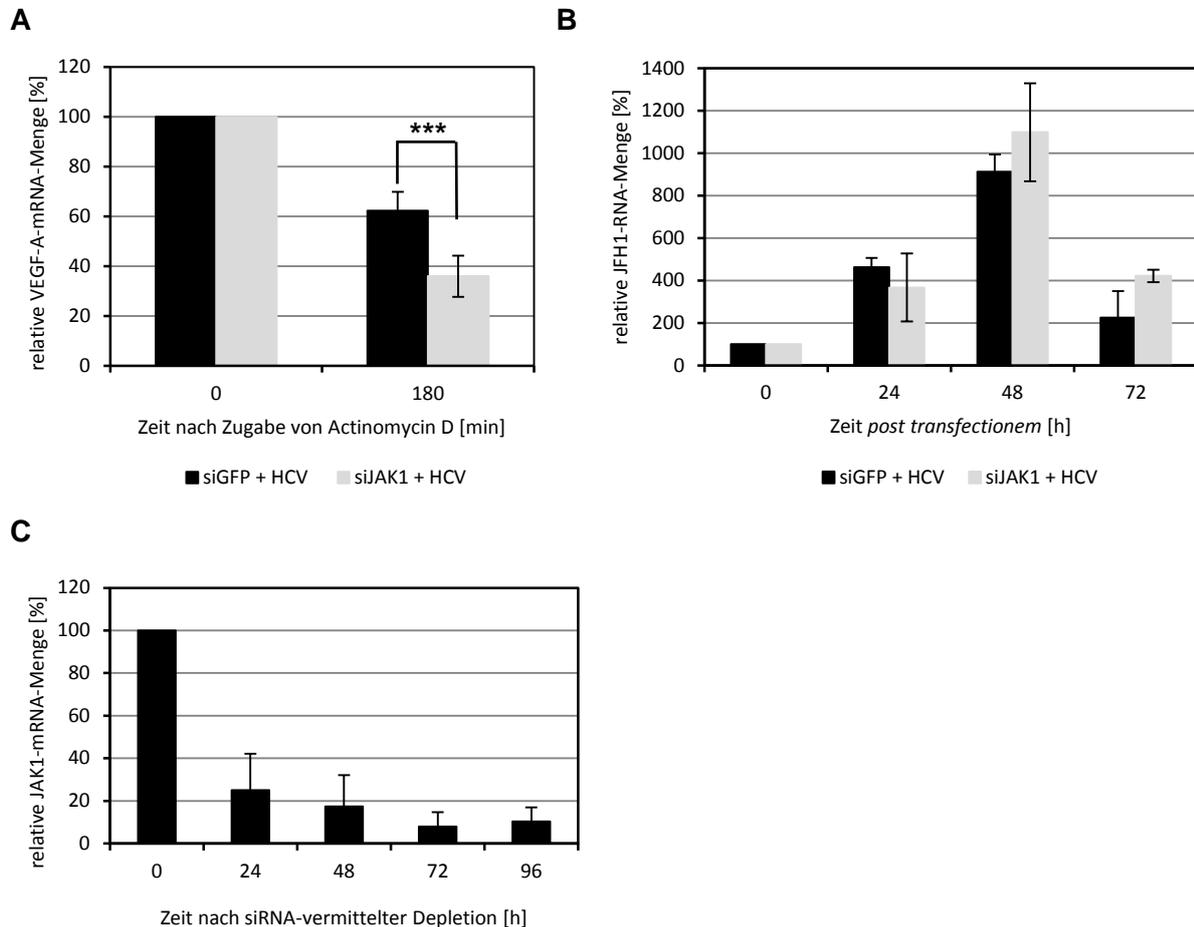


Abbildung 3.18: Die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung wird durch JAK1 vermittelt. Huh7-Zellen wurden 24 h nach siRNA-vermittelter Depletion von JAK1 transient mit dem HCV-Replikon transfiziert und 48 h *p.t.* die VEGF-A-mRNA-Degradation mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay analysiert. Als Kontrolle dienten Huh7-Zellen, welche mit einer Kontroll-siRNA behandelt und anschließend analog mit dem HCV-Replikon transfiziert wurden. Die jeweilige gemessene VEGF-A-mRNA-Menge zu Beginn des Actinomycin D-Endpunkt-Assays wurde als 100% definiert (0 min). Die jeweiligen Mittelwerte der residualen VEGF-A-mRNA-Menge zum Zeitpunkt 180 min wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. (***) $P < 0,001$. (B) Nachweis der viralen Replikation durch qRT-PCR-vermittelte Quantifizierung der HCV-RNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion des HCV-Replikons in Huh7-Zellen, welche 24 h vor der Transfektion mit einer JAK1-spezifischen bzw. einer GFP-spezifischen siRNA behandelt wurden. Die gemessene HCV-RNA-Menge zum Zeitpunkt 0 h *p.t.* wurde jeweils als 100% definiert und die übrigen Werte in Relation zu dieser Referenz gesetzt. Die jeweiligen Mittelwerte wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. Zu keinem der Zeitpunkte konnte ein statistisch signifikanter Unterschied der HCV-RNA-Mengen nachgewiesen werden. (C) Nachweis der Effizienz der siRNA-vermittelten JAK1-Depletion durch Quantifizierung der JAK1-mRNA-Menge mittels qRT-PCR zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion.

3.4 Funktion von TIA-1 bei der viral induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung

Wie bereits in Kapitel 1.4 erwähnt, wurde in den Vorarbeiten gezeigt, dass ein weiteres zelluläres Protein in die viral induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA involviert ist: das RNA

bindende Protein TIA-1 (¹). Dieses Protein wurde näher untersucht, da es ein charakteristischer Bestandteil von Stress Granula (SG) ist (siehe Kapitel 1.4). Im Rahmen ihrer Arbeit untersuchte Fr. Dipl. Biol. Winkler den Einfluss der siRNA-vermittelten Depletion verschiedener SG-Proteine auf die VEGF-A-mRNA-Degradation in Zellen, in welchen das HCV-Replikon transient replizierte. Dabei konnte in TIA-1-depletierten Huh7-Zellen unter dem Einfluss der transienten HCV-Replikation keine VEGF-A-mRNA-Stabilisierung detektiert werden (¹). Dieselben Resultate konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch siRNA-vermittelte Depletion von PKR, RIG I und JAK1 erzielt werden. Somit scheinen diesen drei Faktoren neben TIA-1 ebenfalls essentiell für die HCV-induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung zu sein. Des Weiteren wurden in den Vorarbeiten TIA-1-Überexpressionsstudien durchgeführt (¹). Wie in Kapitel 1.4 erwähnt, existieren in humanen Zellen zwei Isoformen dieses Proteins, welche durch alternatives Spleißen generiert werden. Beide Isoformen wurden sowohl in der persistenten HCV-Zelllinie, als auch in Huh7-Zellen überexprimiert und anschließend die VEGF-A-mRNA-Degradation untersucht. Dabei konnte die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung in der persistenten HCV-Zelllinie durch ÜE der kürzeren Isoform des TIA-1 (TIA-1vI) rekonstituiert werden, während die ÜE der längeren Variante (TIA-1vII) keinen Einfluss auf die VEGF-A-mRNA-Degradation ausübte. In Huh7-Zellen resultierte die ÜE beider Isoformen nicht in einer Veränderung der VEGF-A-mRNA-Degradation. Es wurde deshalb spekuliert, dass TIA-1, spezifischer TIA-1vI, möglicherweise durch direkte Interaktion mit der VEGF-A-mRNA deren erhöhte Stabilität unter entsprechenden Bedingungen bewirkt (¹). Dies schien jedoch nur in solchen Zellen der Fall zu sein, welche replizierende HCV-RNA enthielten. Allerdings konnten weder diese Spekulation, noch eine andere Funktion des TIA-1 für den beobachteten posttranskriptionellen Effekt im Rahmen der von Fr. Dipl. Biol. Winkler durchgeführten Studien bewiesen werden (¹). Daher sollte die Rolle von TIA-1 für die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert werden.

3.4.1 TIA-1 ist für die IFN β -induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung nicht essentiell

Die bei Detektion viraler RNA ausgelöste IFN β -Antwort soll zur besseren Verständlichkeit an dieser Stelle in zwei Phasen untergliedert werden. Dabei wird in der ersten Phase (im Folgenden bezeichnet als UR (*upstream interferon receptor*) die virale RNA als PAMP von zellulären PRRs erkannt und eine Signalkaskade initiiert, welche unter anderem in der Induktion der Transkription des *IFN β* -Gens resultiert. Nach Translation des IFN β wird dieses von den Zellen in das umgebende Medium sekretiert und kann anschließend auf der Zelloberfläche an die Rezeptoren IFNAR1 und IFNAR2 binden. In der zweiten Phase (im Folgenden bezeichnet als DR (*downstream interferon receptor*) initiiert die Bindung des IFN β an diese

Rezeptoren eine weitere Signalkaskade, welche durch die Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren und Änderungen der zellulären Genexpression charakterisiert ist (vgl. Kapitel 1.2). Um die Rolle von TIA-1 bei der viral induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung zu identifizieren, sollte zunächst untersucht werden, ob die Funktion des TIA-1 einer der beiden Phasen zugeordnet werden kann. Zum Verständnis des nachfolgend erläuterten Experiments sollte beachtet werden, dass zelluläre Faktoren, welche für die Induktion des IFN β essentiell sind und somit eine Funktion in der UR-Phase ausüben, bei ÜE von IFN β nicht essentiell für die Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung sein sollten. Faktoren, welche hingegen an der Signalkaskade in der DR-Phase beteiligt sind, sollten auch bei ÜE des IFN β die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung vermitteln. Deshalb wurde TIA-1 in Huh7-Zellen mittels einer spezifischen siRNA depletiert und 48 h später IFN β überexprimiert. Die Transkription des *IFN β* -Gens wurde 24 h nach der Plasmid-Transfektion mittels RT-PCR überprüft (Abbildung 3.19 B). Zum selben Zeitpunkt wurde die VEGF-A-mRNA-Degradation mittels Actinomycin D-Endpunkt-Assay untersucht. Als Kontrolle dienten zum einen Huh7-Zellen, in welchen die in der DR-Phase agierende Kinase JAK1 depletiert wurde. Da bei Abwesenheit von JAK1 die Signalweiterleitung an den Interferon-Rezeptoren inhibiert ist, wurde erwartet, dass bei Depletion von JAK1 in Huh7-Zellen die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA durch ÜE von IFN β nicht induziert werden kann. Zum anderen wurde das in der UR-Phase fungierende RIG I depletiert, von welchem angenommen werden kann, dass es bei der durch ÜE von IFN β induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung nicht essentiell ist. Die siRNA vermittelte Depletion von RIG I und TIA-1 wurde mittels Western Blot überprüft (Abbildung 3.19 B). Da für die Detektion von JAK1 kein geeigneter Antikörper zur Verfügung stand, wurde zum Nachweis der JAK1-Depletion die JAK1-mRNA-Menge in naiven, sowie JAK1-depletierten Huh7-Zellen (24 h nach der ÜE von IFN β) mittels qRT-PCR bestimmt (Abbildung 3.19 D).

Wie in Abbildung 3.19 A dargestellt, konnte wie erwartet in JAK1-depletierten Huh7-Zellen, im Gegensatz zu naiven Huh7-Zellen, keine Stabilisierung der VEGF-A-mRNA durch ÜE von IFN β detektiert werden. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die IFN β -induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung durch JAK1 vermittelt wird. Die Depletion von RIG I hatte hingegen keinen Einfluss auf die IFN β -vermittelte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung. Unter Einbeziehung der bereits publizierten Funktion von RIG I in der UR-Phase erscheint es plausibel, dass RIG I für die HCV-induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung essentiell ist, jedoch nicht für die IFN β -induzierte. Interessanterweise hatte auch die Depletion von TIA-1 keinen Einfluss auf die IFN β -induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung. Dies deutet darauf hin, dass TIA-1 Bestandteil der UR-Signalkaskade ist und damit in Zellen, in denen das HCV-Replikon transient repliziert, möglicherweise an der Induktion von IFN β beteiligt ist. Des Weiteren kann

geschlussfolgert werden, dass TIA-1 für die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung nicht generell essentiell ist.

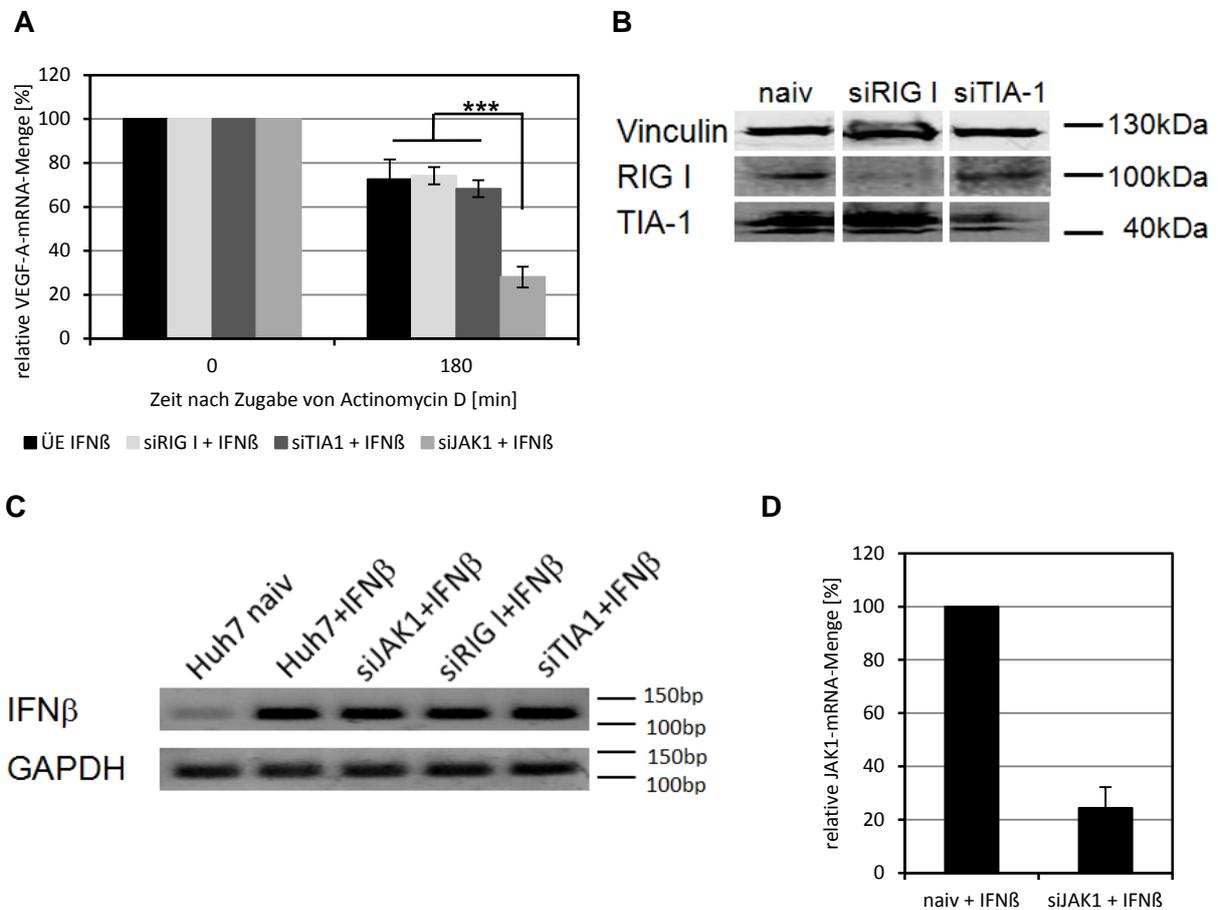


Abbildung 3.19: Die Depletion von TIA-1 in Huh7-Zellen hat keinen Einfluss auf die IFN β -induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung. Huh7-Zellen wurden mit spezifischen siRNAs behandelt (siJAK1, siRIG I, siTIA-1) und nach 48 h mit dem für IFN β codierenden Plasmid transfiziert. Als Kontrolle dienten naive Huh7-Zellen, welche mit dem für IFN β codierenden Plasmid transfiziert wurden. (A) 24 h nach der Plasmid-Transfektion wurde die VEGF-A-mRNA-Degradation durch Actinomycin D-Endpunkt-Assay analysiert. Die jeweilige gemessene VEGF-A-mRNA-Menge zu Beginn des Actinomycin D-Endpunkt-Assays wurde als 100% definiert (0 min). Die Mittelwerte wurden mittels eines Studentischen T-Tests auf signifikante Abweichung hin geprüft. (***) $P < 0,0001$. (B) Repräsentativer Western Blot von RIG I, TIA-1 und GAPDH zum Nachweis der siRNA-vermittelten Depletion von RIG I und TIA-1 72 h nach Transfektion der siRNAs. (C) Die *IFN β* -Transkription wurde in naiven Huh7-Zellen, sowie 24 h nach der Transfektion von naiven, sowie JAK1-, RIG I- bzw. TIA-1- depletieren Huh7-Zellen mit dem für IFN β codierenden Plasmid mittels RT-PCR überprüft. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid unter Anregung durch UV-Licht visualisiert. (D) Die JAK1-mRNA-Menge wurde 24 h nach der ÜE von IFN β in naiven bzw. JAK1-depletieren Huh7-Zellen mittels qRT-PCR quantifiziert.

3.4.2 TIA-1 ist in Huh7-Zellen, in welchen das HCV-Replikon transient repliziert, an der Induktion von IFN β beteiligt

Wie in Kapitel 3.4.1 angedeutet, existierten Hinweise darauf, dass TIA-1 bei der HCV-induzierten Stabilisierung der VEGF-A-mRNA *upstream* der Ereignisse am Interferon-Rezeptor fungiert. Es war deshalb im Folgenden von Interesse, ob TIA-1 möglicherweise an der Induktion der *IFN β* -Transkription beteiligt ist. Deshalb wurde TIA-1 in Huh7-Zellen depletiert (siRNA-vermittelt) und die Zellen anschließend mit dem HCV-Replikon transient trans-

fiziert. Zum Zeitpunkt der maximalen viralen Replikation (48 h *p.t.*) wurde die $IFN\beta$ -mRNA-Menge mittels qRT-PCR quantifiziert. Als Referenz wurden Huh7-Zellen verwendet, welche stattdessen mit einer GFP-spezifischen siRNA behandelt wurden. Des Weiteren wurden als Kontrollen PKR-, sowie RIG I-depletierte Huh7-Zellen betrachtet, in denen das HCV-Replikon transient replizierte, da für beide Komponenten bekannt ist, dass sie an der $IFN\beta$ -Induktion partizipieren.

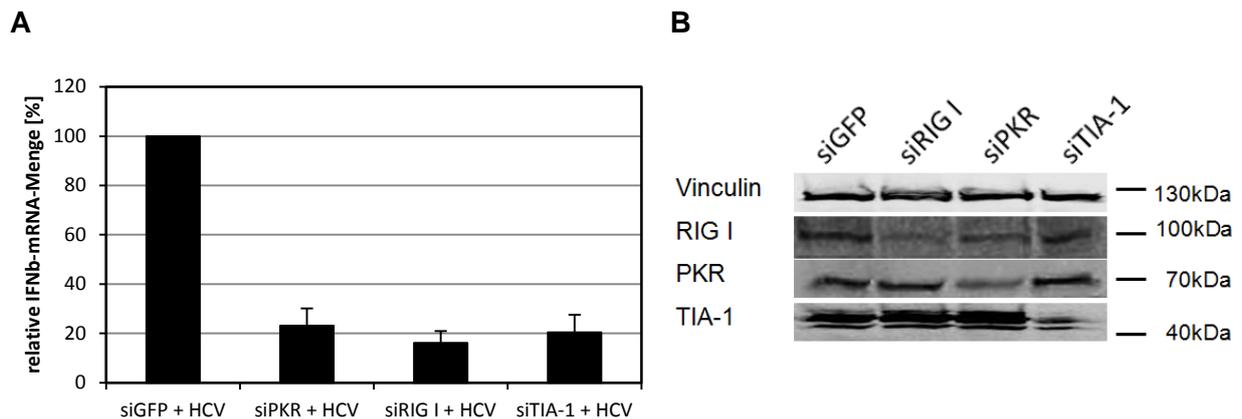


Abbildung 3.20: TIA-1, PKR und RIG I sind an der HCV-induzierten Induktion der $IFN\beta$ -Transkription beteiligt. Huh7-Zellen wurden mit spezifischen siRNAs behandelt (siGFP, siPKR, siRIG I, siTIA-1) und 24 h später transient mit dem HCV-Replikon transfiziert. (A) Nach weiteren 48 h wurde die $IFN\beta$ -mRNA-Menge mittels qRT-PCR quantifiziert. Dabei wurden die mit der siGFP-RNA behandelten Zellen als Referenz verwendet. (B) Repräsentativer Western Blot von RIG I, PKR, TIA-1 und Vinculin (Ladekontrolle) 48 h nach der Transfektion der Zellen mit dem HCV-Replikon.

Die in den mit der siGFP-RNA behandelten Zellen gemessene $IFN\beta$ -mRNA-Menge wurde als 100% definiert und die Quantitäten der anderen Proben in Relation zu dieser gesetzt. Dabei konnte sowohl in den Kontrollen (siPKR + HCV, siRIG I + HCV) als auch in den TIA-1-depletierten Huh7-Zellen (siTIA-1+HCV) im Vergleich zur Referenz (siGFP + HCV) eine signifikante Reduktion der $IFN\beta$ -mRNA-Menge detektiert werden. Somit scheint TIA-1 ebenso wie die Proteine PKR und RIG I in die HCV-induzierte $IFN\beta$ -Transkription involviert zu sein.

3.4.3 TIA-1 ist in Huh7-Zellen, in welchen das HCV-Replikon transient repliziert, an der Aktivierung von $NF-\kappa B$ beteiligt

Aus den Ergebnissen in Kapitel 3.4.2 ging hervor, dass TIA-1 in Huh7-Zellen, in welchen das HCV-Replikon transient repliziert, an der $IFN\beta$ -Induktion beteiligt ist. Im Folgenden sollte die Rolle des TIA-1 näher charakterisiert werden.

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, unterliegt die Transkription von $IFN\beta$ einer komplexen Kontrolle durch zahlreiche Mechanismen und Komponenten. Dabei kommt den Transkriptionsfaktoren ATF-2/c-jun, IRF-3 und $NF-\kappa B$ eine besondere Bedeutung zu. Jeder dieser Transkriptionsfaktoren kann eine basale $IFN\beta$ -Transkription induzieren. Bei deren gleichzeiti-

ger Bindung an den *IFN β* -Promotor wird die Genexpression jedoch überproportional gesteigert (siehe Kapitel 1.2). Hier war speziell der Transkriptionsfaktor NF- κ B von Interesse, da bereits gezeigt wurde, dass die PKR als Reaktion auf die Präsenz von dsRNA (welche z.B. im Rahmen viraler Infektionen auftritt) an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt ist (vgl. Kapitel 1.2). Die Aktivität der Mitglieder der NF- κ B-Protein-Familie wird durch Interaktion mit I κ B-Proteinen (*inhibitor of NF- κ B*) reguliert (Ghosh *et al.* 1995, Muller *et al.* 1995). Durch Bindung der I κ B- an die NF- κ B-Proteine wird das Kernlokalisierungs-Signal der NF- κ B-Proteine maskiert, wodurch die NF- κ B-Proteine im inaktiven Zustand im Cytoplasma lokalisieren (Huxford *et al.* 1998, Jacobs *et al.* 1998, Torgerson *et al.* 1998). Der kanonische Signalweg der NF- κ B-Aktivierung ist charakterisiert durch die Aktivierung spezifischer I κ B-Kinasen (IKK), welche die I κ B-Proteine phosphorylieren (Brockman *et al.* 1995, Brown *et al.* 1995). Diese Phosphorylierung markiert die I κ B-Proteine für die proteosomale Degradation. Es resultieren ungebundene NF- κ B-Proteine, welche in den Zellkern translozieren und dort als Transkriptionsfaktoren agieren. Das am besten untersuchte I κ B-Protein repräsentiert I κ B- α . McAllister und Kollegen konnten zeigen, dass die dsRNA-abhängige Aktivierung der PKR die intrazelluläre Menge von I κ B- α herunterreguliert (McAllister *et al.* 2012). Es ist anzumerken, dass dies nicht auf eine direkte Wirkung der PKR zurückzuführen ist, sondern auf die Translations-Inhibition, welche aus der Phosphorylierung von eIF2 α resultiert. So konnte in PKR-depletierten Zellen durch Stimulation mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid ebenfalls eine Reduktion von I κ B- α und eine Induktion von IFN β als Reaktion auf die Präsenz von dsRNA nachgewiesen werden (McAllister *et al.* 2012). Der molekulare Mechanismus, durch den die Translations-Inhibition die I κ B- α -Menge reduziert, ist jedoch nicht näher betrachtet worden. Des Weiteren ist bekannt, dass die Phosphorylierung von eIF2 α in der Rekrutierung verschiedener RBPs (*RNA-binding proteins*) resultiert (siehe Kapitel 1.4). Eines dieser Proteine ist TIA-1. Es sollte deshalb untersucht werden, ob TIA-1 an der PKR-vermittelten Reduktion von I κ B- α beteiligt ist. Dies würde auch die Rolle von TIA-1 bei der IFN β -Induktion erklären.

Zunächst wurde untersucht, ob die Aktivierung von NF- κ B in Zellen nachgewiesen werden kann, in denen das HCV-Replikon transient repliziert. Dabei wurden transient mit dem HCV-mut-Replikon transfizierte Huh7-Zellen als Referenz verwendet. Des Weiteren wurden analog auch mit dem WNV- und dem WNV-mut-Replikon transfizierte Zellen betrachtet. Als Maß für die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges wurden 48 h nach der Transfektion die cytoplasmatische Menge von I κ B- α und die nukleäre Menge an NF- κ B mittels Western Blot quantifiziert. Durch Detektion des cytoplasmatisch lokalisierten Proteins GAPDH in den Kernextrakten, sowie des nukleär lokalisierten Proteins LaminA in den cytoplasmatischen Extrakten

wurde sichergestellt, dass die Extrakte nicht mit Komponenten der jeweils anderen Fraktion kontaminiert sind. Dabei wurde beobachtet, dass im cytoplasmatischen Extrakt von Zellen, in denen das HCV-Replikon transient repliziert, im Vergleich zur Referenz (HCV-mut-Replikon) die I κ B- α -Menge auf etwa die Hälfte reduziert ist (Abbildung 3.21 A, C). Dies korrelierte mit einer Erhöhung der nukleären NF- κ B-Menge auf etwa das Doppelte (Abbildung 3.21 B, C), was auf eine reduzierte Interaktion zwischen NF- κ B und I κ B- α zurückgeführt werden kann. Ungebundenes NF- κ B kann somit in den Nucleus translozieren und als Transkriptionsfaktor agieren. In den Extrakten der Zellen, in denen das WNV-Replikon transient repliziert, konnten im Vergleich zu den Extrakten der mit dem WNV-mut-Replikon transfizierten Zellen keine Unterschiede der cytoplasmatischen I κ B- α -, sowie der nukleären NF- κ B-Menge detektiert werden (Abbildung 3.21 A, B, C). Es kann somit angenommen werden, dass der NF- κ B-Signalweg als Folge der Replikation des HCV-Replikons, nicht jedoch als Folge der Replikation des WNV-Replikons aktiviert wurde.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die Proteine PKR und TIA-1 an der HCV-induzierten NF- κ B-Aktivierung beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden in PKR- und TIA-1-depletierten Huh7-Zellen, in denen das HCV-Replikon transient repliziert, die cytoplasmatische I κ B- α -Menge und die nukleäre NF- κ B-Menge bestimmt (48 h *p.t.*). Als Kontrolle dienten Zellen, welche mit einer GFP-spezifischen siRNA behandelt wurden und in denen das HCV-Replikon transient repliziert. Im Vergleich zur Referenz (siGFP + HCV) konnte in PKR- und TIA-1 depletierten Zellen eine erhöhte cytoplasmatische I κ B- α -Menge (je ca. 160% der in den Kontrollzellen detektierten Menge) detektiert werden (Abbildung 3.21 D, F). Dies korrelierte mit einer verringerten NF- κ B-Menge (je ca. 50% der in den Kontrollzellen detektierten Menge) in den entsprechenden Kernextrakten (Abbildung 3.21 E, F). Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Depletion der Proteine PKR und TIA-1 die HCV-induzierte Reduktion der cytoplasmatischen I κ B- α -Konzentration inhibiert. Es erscheint plausibel, dass die im Gegensatz zur Referenz erhöhte cytoplasmatische I κ B- α -Menge in einer Reduktion der Menge an freiem NF- κ B resultiert, welches in den Zellkern translozieren kann. Dies indiziert, dass sowohl PKR, als auch TIA-1 an der HCV-induzierten NF- κ B-Aktivierung beteiligt sind.

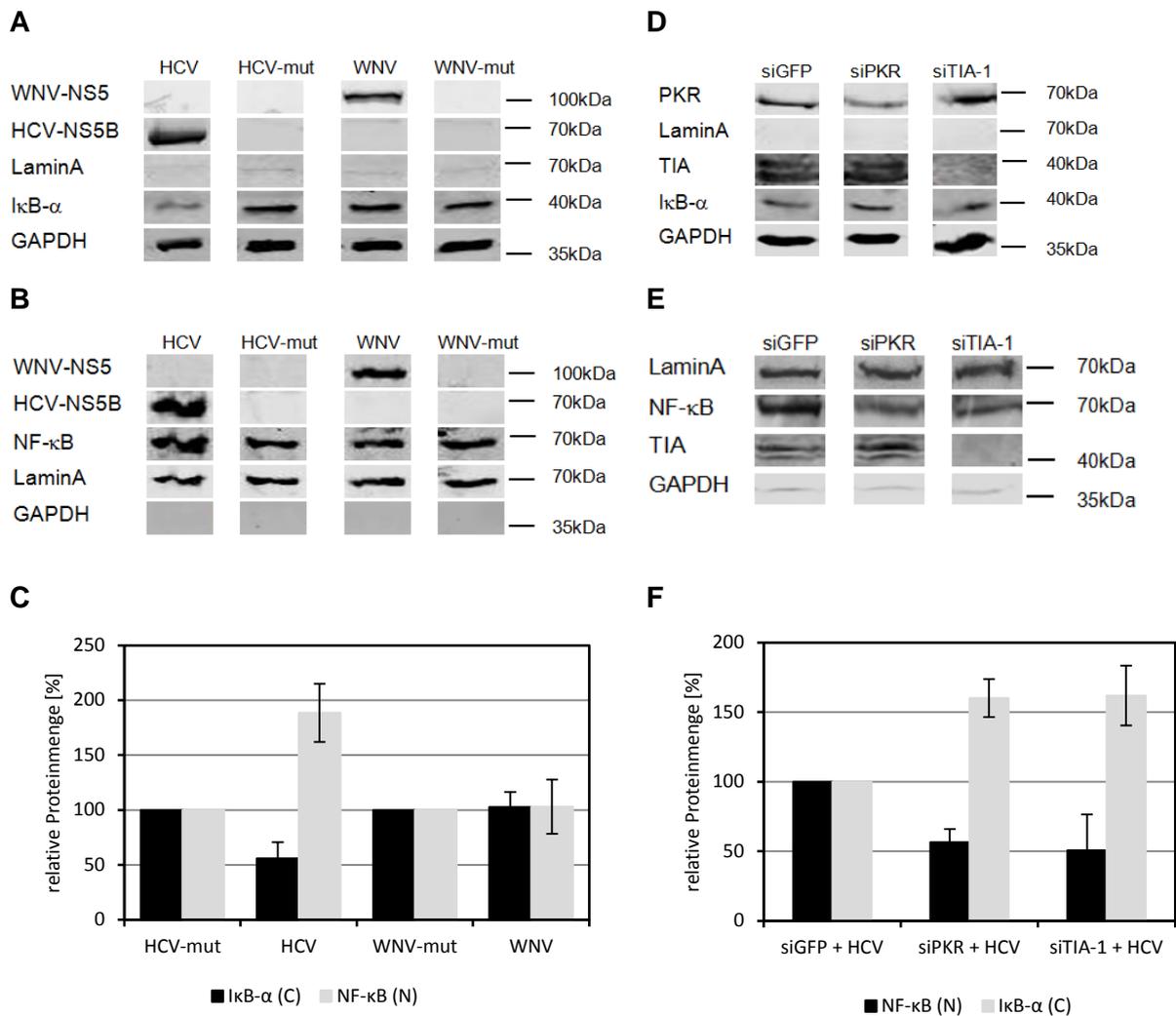


Abbildung 3.21: TIA-1 und PKR vermitteln die HCV-induzierte Aktivierung von NF-κB. (A, B) 48 h nach der Transfektion von Huh7-Zellen mit den Replikons HCV, HCV-mut, WNV bzw. WNV-mut wurden cytoplasmatische Extrakte (A) und Kernextrakte (B) präpariert und mittels Western Blot analysiert. Die Visualisierung der viralen Proteine WNV-NS5 und HCV-NS5B diente dem Nachweis der viralen Replikation. (A) Nachweis von IκB-α, GAPDH und LaminaA. GAPDH diente als Ladekontrolle und wurde zur Normalisierung der detektierten IκB-α-Menge verwendet. (B) Nachweis von NF-κB, GAPDH und LaminaA. LaminaA diente als Ladekontrolle und wurde zur Normalisierung der detektierten NF-κB-Menge verwendet. (C, F) Quantifizierung der mittels Western Blot detektierten cytoplasmatischen IκB-α- und nukleären NF-κB-Mengen. (C) Die detektierten IκB-α- und NF-κB-Mengen der Zellen, welche mit den replikationsdefizienten Replikons (HCV-mut, WNV-mut) transfiziert wurden, dienten als Referenz und wurden als 100% definiert. Die gemessenen Mengen in den HCV- bzw. WNV-transfizierten Zellen wurden in Relation zu diesen gesetzt. (D, E) Huh7-Zellen wurden zunächst mit spezifischen siRNAs (siGFP, siPKR, siTIA-1) und 24 h später transient mit dem HCV-Replikon transfiziert. Nach weiteren 48 h wurden aus den Zellen cytoplasmatische Extrakte (D) und Kernextrakte (E) präpariert und diese mittels Western Blot analysiert. (D) Nachweis von IκB-α, GAPDH, PKR, TIA-1 und LaminaA. GAPDH diente als Ladekontrolle und wurde zur Normalisierung der detektierten IκB-α-Menge verwendet. Die Detektion der Proteine PKR und TIA-1 diente dem Nachweis der siRNA-vermittelten Depletion. (E) Nachweis von NF-κB, GAPDH und LaminaA. LaminaA diente als Ladekontrolle und wurde zur Normalisierung der detektierten NF-κB-Menge verwendet. Die Detektion von TIA-1 diente dem Nachweis der siRNA-vermittelten Depletion. (F) Als Referenz dienten transient mit dem HCV-Replikon transfizierte Huh7-Zellen, welche mit einer siGFP-RNA behandelt wurden. Die in diesen Zellen quantifizierten IκB-α- und NF-κB-Mengen wurden als 100% definiert und die Quantitäten in PKR-, bzw. TIA-1 depletierten Zellen in Relation zu dieser Referenz gesetzt.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob beide TIA-1-Isoformen an der HCV-induzierten NF-κB-Aktivierung beteiligt sind. Da die für die Depletion von TIA-1 verwendete siRNA zur Depletion beider Isoformen führt, sollte diese Fragestellung durch Überexpressionsstudien

adressiert werden. Zu diesem Zweck wurden TIA-1vI und TIA-1vII als FLAG-Fusionsproteine jeweils in der persistenten HCV-Zelllinie überexprimiert. Als Referenz wurden unbehandelte Zellen der persistenten HCV-Zelllinie verwendet. Als Maß für die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges wurde die cytoplasmatische Menge von I κ B- α und die nukleäre Menge an NF- κ B 24 h nach der Plasmid-Transfektion mittels Western Blot quantifiziert. Interessanterweise konnte in Zellen, welche mit dem TIA-1vI-Plasmid transfiziert wurden, eine deutliche Reduktion von I κ B- α im cytoplasmatischen Extrakt detektiert werden (auf ca. 52%), welche mit einer erhöhten NF- κ B-Quantität im Nukleus korrelierte (auf etwa 292%) (im Vergleich zu unbehandelten Zellen der persistenten HCV-Zelllinie). Bei der Transfektion der persistenten HCV-Zelllinie mit dem TIA-1vII-Plasmid konnte dies hingegen nicht beobachtet werden (Abbildung 3.22).

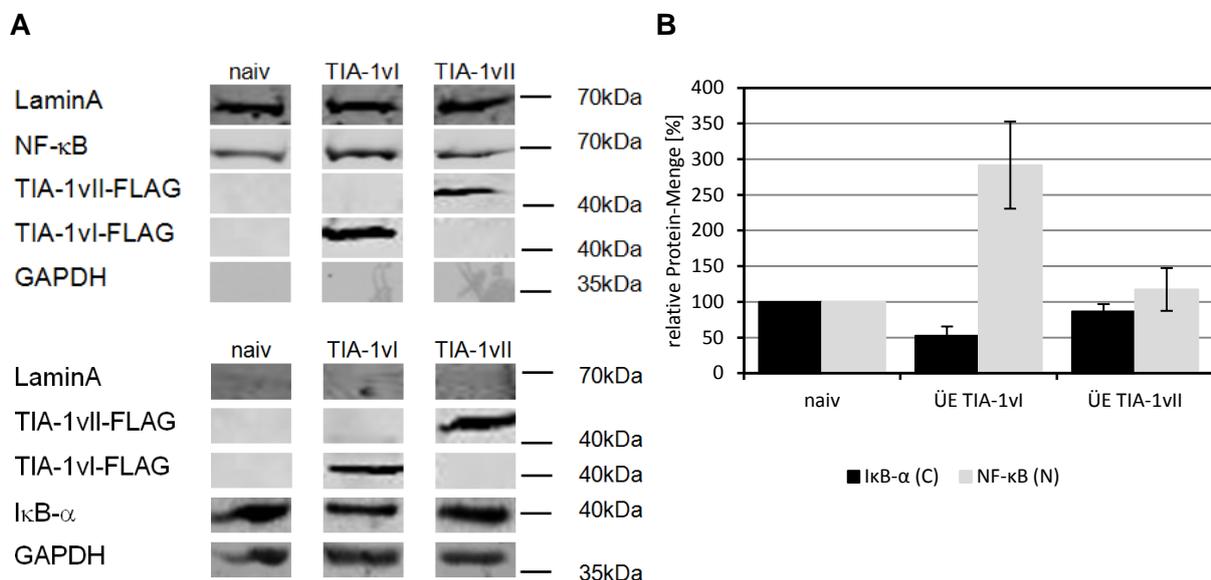


Abbildung 3.22: Die Überexpression von TIA-1vI in der persistenten HCV-Zelllinie induziert eine verringerte cytoplasmatische I κ B- α - und eine erhöhte nukleäre NF- κ B-Menge. (A) Repräsentative Western Blots von NF- κ B, GAPDH und LaminA im Kernextrakt (obere Abbildung), sowie I κ B- α , GAPDH und LaminA im cytoplasmatischen Extrakt (untere Abbildung) von unbehandelten Zellen der persistenten HCV-Zelllinie bzw. 24 h nach ÜE von TIA-1vI oder TIA-1vII. Der Nachweis der Synthese der TIA-1-FLAG-Fusionsproteine erfolgte mittels anti-FLAG-Antikörper (B) Quantifizierung der cytoplasmatischen I κ B- α - und der nukleären NF- κ B-Menge in unbehandelten Zellen der persistenten HCV-Zelllinie, sowie 24 h nach ÜE von TIA-1vI oder TIA-1vII. Die in den Extrakten der unbehandelten Zellen der persistenten HCV-Zelllinie quantifizierten I κ B- α - und NF- κ B-Mengen wurden als 100% definiert und die übrigen Werte in Relation dazu gesetzt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die transiente Replikation des HCV-Replikons in Huh7-Zellen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B induziert. So konnte in Zellen, in denen das HCV-Replikon transient repliziert, im Vergleich zu Kontrollzellen, welche mit der replikationsdefizienten HCV-mut-RNA transfiziert wurden, eine verringerte cytoplasmatische I κ B- α -Menge und eine erhöhte nukleäre NF- κ B-Menge beobachtet werden.

Die erhöhte cytoplasmatische I κ B- α -Menge, sowie die verringerte nukleäre NF- κ B-Menge in mit dem HCV-Replikon transfizierten, TIA-1-depletierten Zellen im Vergleich zu Zellen, wel-

che mit einer nicht funktionalen siRNA behandelt wurden, deuten darauf hin, dass TIA-1 an der HCV-induzierten Aktivierung von NF- κ B beteiligt ist. Dieselben Resultate wurden bei siRNA-vermittelter Depletion von PKR erzielt. Durch Überexpressionsstudien in der persistenten HCV-Zelllinie konnte zudem gezeigt werden, dass die TIA-1vI-Isoform einen negativ regulatorischen Einfluss auf die cytoplasmatische Menge von I κ B- α ausübt, während für die TIA-1vII-Isoform keine solche Funktion nachgewiesen werden konnte. Die Reduktion der cytoplasmatischen I κ B- α -Menge korrelierte wiederum mit einem Anstieg der nukleären NF- κ B-Menge.

3.4.3.1 Die Replikation des HCV-Replikons in Huh7-Zellen hat keinen Einfluss auf die I κ B- α -mRNA-Stabilität

Die beobachtete Abnahme der I κ B- α -Menge im Cytoplasma von transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Huh7-Zellen und Zellen der persistenten HCV-Zelllinie nach ÜE von TIA-1vI könnte auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Zum einen könnte die Degradation von I κ B- α erhöht sein, wodurch (bei gleichbleibender Translation) die Gesamt-I κ B- α -Menge abnehmen würde. Es ist bereits bekannt, dass im Rahmen der NF- κ B-Aktivierung I κ B- α phosphoryliert und ubiquitinyliert wird und somit die proteasomale Degradation initiiert wird. Zum anderen könnte die Translation beeinflusst sein. Dabei wäre sowohl ein direkter Einfluss auf die Translation der I κ B- α -mRNA, als auch ein indirekter Einfluss aufgrund von Regulationen der I κ B- α -mRNA-Menge und/oder -Stabilität denkbar. Im Folgenden sollen diese Möglichkeiten adressiert werden.

Zunächst sollte untersucht werden, ob eine differentielle Regulation der I κ B- α -mRNA in Huh7-Zellen, in denen das HCV-Replikon transient repliziert, im Vergleich zu naiven Huh7-Zellen nachgewiesen werden kann. Als Kontrolle dienten zusätzlich transient mit dem HCV-mut- und dem WNV-Replikon transfizierte Zellen. Bei Betrachtung der I κ B- α -Transkriptmenge 48 h *p.t.* konnten keine Unterschiede im Vergleich zu naiven Huh7-Zellen detektiert werden (Abbildung 3.23 A).

Im Folgenden wurde die Degradation der I κ B- α -mRNA in naiven, sowie in transient mit den Replikons HCV, HCV-mut und WNV transfizierten Zellen untersucht. Die Analyse erfolgte 48 h *p.t.* mittels Actinomycin D-Assay (Vgl. Kapitel 3.2). Die Halbwertszeit der I κ B- α -mRNA wurde mittels exponentieller Regression entsprechend der Formel $y = a * e^{b*x} + c$ bestimmt. Abbildung 3.23 B verdeutlicht, dass die transiente Transfektion der Huh7-Zellen mit dem HCV-, dem HCV-mut und dem WNV-Replikon keinen Einfluss auf die Degradation der I κ B- α -mRNA ausübte. Zwischen den ermittelten Halbwertszeiten in den naiven Huh7-Zellen (84 ± 21) und den transient transfizierten Zellen [81 ± 12 min (HCV-Replikon), 91 ± 22 min

(HCV-mut-Replikon) 91 ± 17 (WNV-Replikon)] besteht kein statistisch signifikanter Unterschied. Somit scheint die beobachtete Abnahme des detektierbaren cytoplasmatischen $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ in Huh7-Zellen, in denen das HCV-Replikon transient repliziert, nicht auf eine verringerte $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ -mRNA-Stabilität zurückzuführen sein.

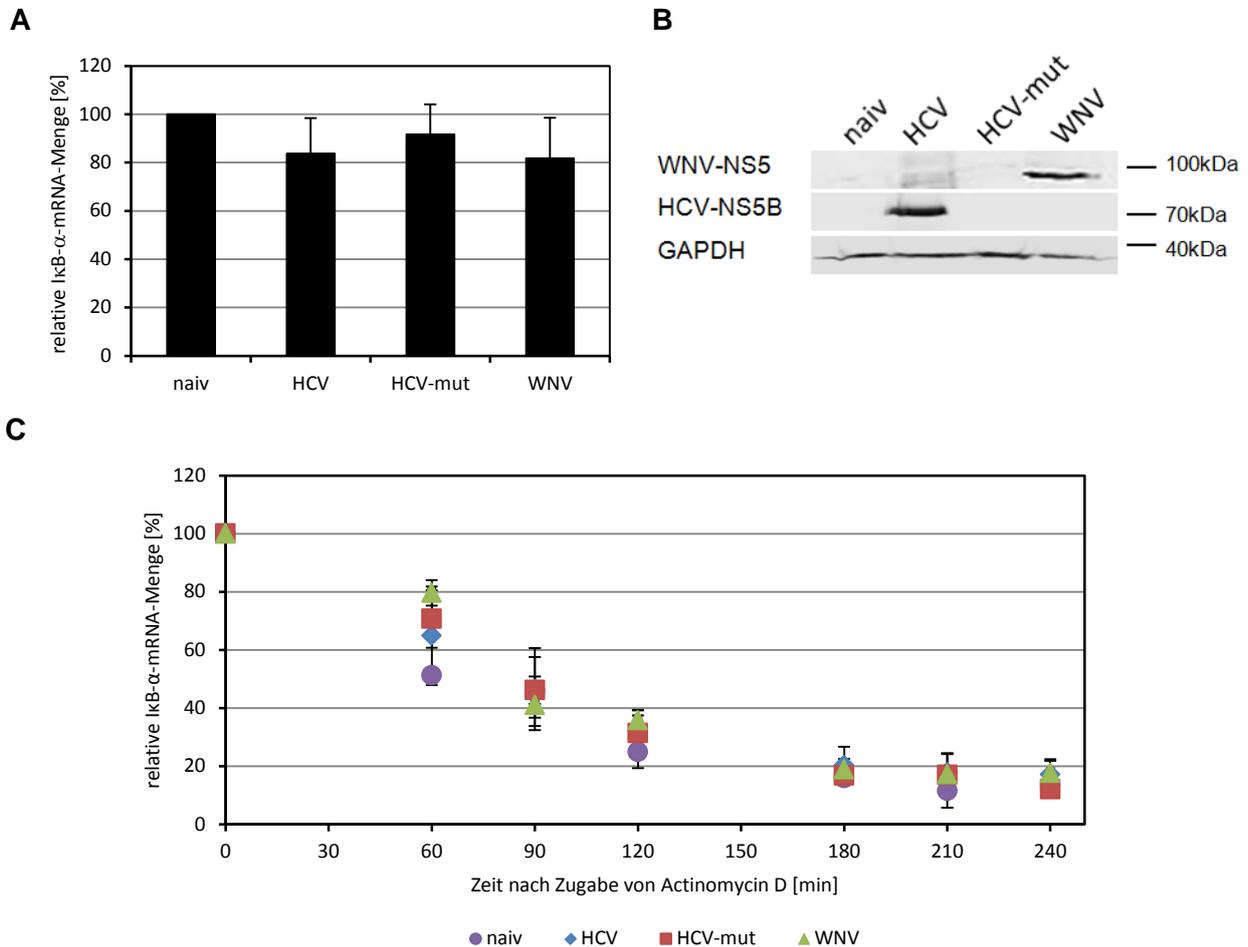


Abbildung 3.23: Die $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ -mRNA ist durch transiente Transfektion der Huh7-Zellen mit dem HCV-, dem HCV-mut- und dem WNV-Replikon nicht differenziell reguliert. Analyse der (A) Gesamtmenge und (C) der Degradation der $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ -mRNA in naiven Huh7-Zellen, sowie 48 h nach transients Transfektion mit dem HCV-, dem HCV-mut und dem WNV-Replikon durch qRT-PCR. (A) Die in naiven Huh7-Zellen detektierbare $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ -mRNA-Menge wurde als 100% definiert und die in den transfizierten Zellen gemessenen Quantitäten in Relation zu dieser gesetzt. (B) Repräsentativer Western Blot von WNV-NS5, HCV-NS5B und GAPDH (Ladekontrolle) in naiven Huh7-Zellen, sowie 48 h nach transients Transfektion mit dem HCV-, dem HCV-mut und dem WNV-Replikon zum Nachweis der viralen Replikation. (C) Für jeden Probenatz wurde die gemessene $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ -mRNA-Menge zum Zeitpunkt 0 min als 100% definiert. Die Transkriptmengen der übrigen Zeitwerte sind als Relativwerte, bezogen auf den 100%-Wert, angegeben. Zur Ermittlung der $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ -mRNA-Halbwertszeit wurden die relativen Transkriptmengen gegen die Zeit nach Actinomycin D-Zugabe aufgetragen.

3.4.3.2 TIA-1 hat keinen Einfluss auf die Degradation von $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$

Da die Replikation des HCV-Replikons in Huh7-Zellen nicht in einer differentiellen Regulation der $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ -mRNA resultierte, wurde ausgeschlossen, dass die Funktion von TIA-1 bei der HCV-induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung durch einen Einfluss auf die $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ -mRNA vermittelt wird. Es sollte deshalb im Folgenden untersucht werden, ob TIA-1 stattdessen ei-

nen Einfluss auf die Degradation von $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ ausübt. Zur Untersuchung der Degradation eines Proteins kommen im Wesentlichen zwei Methoden zum Einsatz, die *pulse chase*-Methode und die Inhibition der *de novo* Translation mittels Cycloheximid, wobei letztere im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Die Cycloheximid-Anwendung zur Analyse der Protein-Degradation ist vergleichbar mit der Analyse der mRNA-Degradation mittels Actinomycin D. Cycloheximid inhibiert die Translation, indem es sowohl die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die Ribosomen, als auch den Transfer von Aminosäuren von der Aminoacyl-tRNA auf entstehende Peptide und die Freisetzung der deacylierten tRNA verhindert. Durch Entnahme von Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandeln der Zellen mit Cycloheximid und anschließender Detektion des Proteins von Interesse mittels Western Blot kann somit dessen Degradation analysiert werden.

Um einen Einblick zu erhalten, ob TIA-1 die Degradation von $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ beeinflusst, wurde TIA-1 in Huh7-Zellen mittels einer spezifischen siRNA depletiert und die Zellen 24 h später mit dem HCV-Replikon transfiziert. Als Kontrolle dienten Huh7-Zellen, welche vor der Transfektion stattdessen mit einer GFP-spezifischen siRNA behandelt wurden. 48 *p.t.* wurde Cycloheximid in das Zellkulturmedium appliziert und im Folgenden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Nach Quantifizierung der cytoplasmatischen $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ -Mengen mittels Western Blot wurde die berechnete $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ -Menge vor der Zugabe von Cycloheximid (0 min) als 100% definiert und die übrigen Werte in Relation dazu gesetzt. Abbildung 3.24 verdeutlicht, dass sich die Degradationsrate von $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ in Huh7-Zellen, in denen das HCV-Replikon transient repliziert, bei Depletion von TIA-1 nicht von der in den Kontrollzellen (mit GFP-spezifischer siRNA behandelt) unterschied. Zusätzlich wurden auch Kernextrakte der mit Cycloheximid behandelten Zellen präpariert und hinsichtlich der enthaltenen NF- κB -Menge verglichen. Interessanterweise korrelierte die (aufgrund der Translations-Inhibition) abnehmende $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ -Menge mit einer ansteigenden Quantität an nukleärem NF- κB .

Es kann geschlussfolgert werden, dass TIA-1 in Huh7-Zellen, in denen das HCV-Replikon transient repliziert, keinen Einfluss auf die Degradation von $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ ausübt.

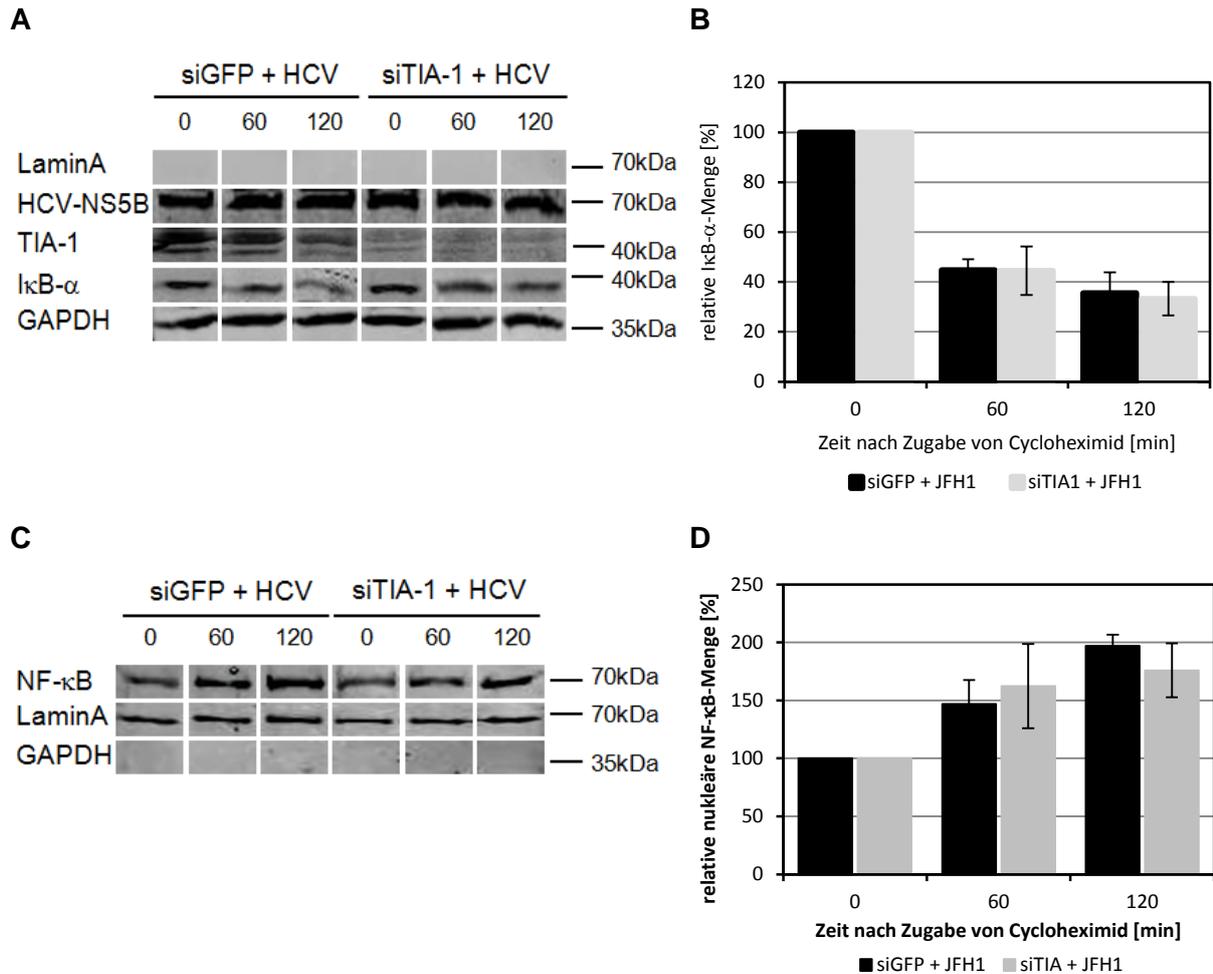


Abbildung 3.24: Die Depletion von TIA-1 hat in transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Huh7-Zellen keinen Einfluss auf die Degradation von IκB-α. Huh7-Zellen wurden mit spezifischen siRNAs (siGFP, siTIA-1) behandelt und 24 h später mit dem HCV-Replikon transfiziert. Nach weiteren 48 h wurde Cycloheximid in das Zellkulturmedium appliziert und nach den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen, aus welchen cytoplasmatische Extrakte sowie Kernextrakte präpariert wurden. (A) Repräsentativer Western Blot von LaminA, HCV-NS5B, TIA-1, IκB-α und GAPDH im cytoplasmatischen Extrakt. Die Detektion von HCV-NS5B diente dem Nachweis der viralen Replikation. (B) Die cytoplasmatischen IκB-α-Mengen wurden mittels Western Blot quantifiziert. Dabei wurden die detektierten IκB-α-Mengen zum Zeitpunkt 0 min als 100% definiert. (C) Repräsentativer Western Blot von NF-κB, GAPDH und LaminA im Kernextrakt. (D) Die nukleären NF-κB-Mengen wurden mittels Western Blot quantifiziert. Die zum Zeitpunkt 0 min nach Cycloheximid-Zugabe detektierte NF-κB-Menge wurde jeweils als 100% definiert.

3.4.3.3 TIA-1 ist in transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Huh7-Zellen an der Inhibition der Translation der IκB-α-mRNA beteiligt

Es war im Folgenden von Interesse, ob TIA-1 möglicherweise einen Einfluss auf die Translation der IκB-α-mRNA ausübt. Um dies zu untersuchen, wurde ein Reporter-Konstrukt generiert, in welchem die für die *firefly*-Luciferase codierende Sequenz von den authentischen UTRs der humanen IκB-α-mRNA flankiert wird (siehe Anhang 8.3). Somit sollte die Regulation der Translation der Luciferase-RNA durch die IκB-α-UTRs vermittelt werden. Das generierte Plasmid diente als Template für die Synthese eines *in vitro* Transkripts [im Folgenden als IU-Luciferase-RNA (IκB-α-UTR-Luciferase) bezeichnet]. Zur Untersuchung des Einflusses

ses von TIA-1 auf die Translation dieses Transkripts wurden Huh7-Zellen zunächst mit verschiedenen siRNAs (siGFP, siTIA-1) behandelt und 24 h später mit dem HCV- bzw. dem HCV-mut-Replikon transient transfiziert. Zum Zeitpunkt der maximalen viralen Replikation (48 h *p.t.*) wurden die Zellen transient mit der IU-Luciferase-RNA transfiziert. Nach weiteren 90 min wurden die Zellen geerntet und die Luciferase-Aktivität gemessen.

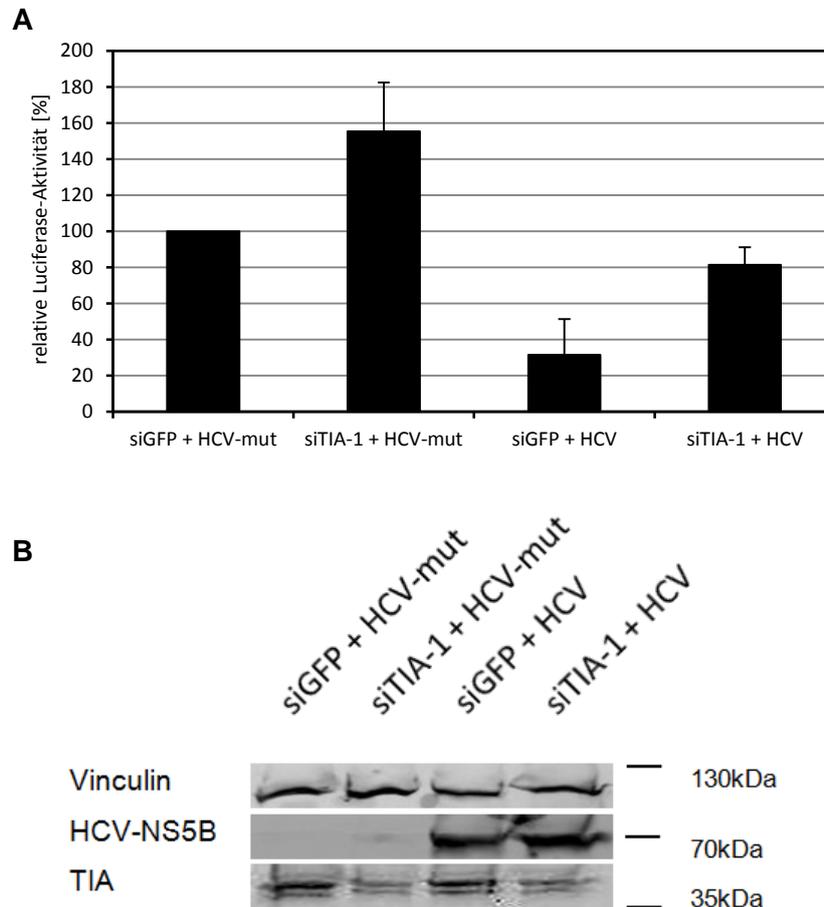


Abbildung 3.25: Die siRNA-vermittelte Depletion von TIA-1 in transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen erhöht die Translation der IU-Luciferase-RNA. 24 h nach der Transfektion von Huh7-Zellen mit der siTIA-1- bzw. der siGFP-RNA wurden die Huh7-Zellen mit dem HCV- bzw. dem HCV-mut-Replikon transient transfiziert. (A) Zum Zeitpunkt der maximalen viralen Replikation (48 h *p.t.*) wurden diese Zellen mit der I κ B- α -UTR-Luciferase-RNA transfiziert. Nach weiteren 90 min wurden Zellextrakte präpariert und die Luciferase-Aktivitäten gemessen. Zum Vergleich der Luciferase-Aktivitäten wurden die mit der siGFP- und der HCV-mut-RNA transfizierten Zellen als Referenz verwendet und die Luciferase-Aktivitäten der übrigen Proben als Relativwerte, bezogen auf den 100% - Wert, berechnet. (B) Repräsentativer Western Blot von Vinculin, TIA-1 (zum Nachweis der TIA-1-Depletion) und HCV-NS5B (zum Nachweis der HCV-Replikation).

Zur Interpretation der Daten diente die Luciferase-Aktivität der mit der siGFP-RNA und dem HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen als Referenz, mit welcher die Aktivitäten der übrigen Zellen verglichen wurden. Somit kann nicht nur der Einfluss der TIA-1-Depletion, sondern auch der der HCV-Replikation auf die Translation der IU-Luciferase-RNA untersucht werden (Abbildung 3.25). Dabei konnte in den transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen, welche mit der siGFP-RNA behandelt wurden (siGFP + HCV) im Vergleich zu den Kontrollzellen (siGFP + HCV-mut) eine deutlich verringerte Luciferase-Aktivität detektiert werden (ca.

30%). Somit scheint die Replikation der HCV-RNA in einer Inhibition der Translation der IU-Luciferase-RNA zu resultieren. Wurden die Zellen jedoch vor der Transfektion des HCV-Replikons mit der siTIA-1-RNA behandelt, konnte nur ein geringer Unterschied zur Referenz ermittelt werden (ca. 80 %). Somit kann geschlussfolgert werden, dass der inhibitorische Einfluss der HCV-Replikation auf die Translation der IU-Luciferase-RNA durch Depletion von TIA-1 inhibiert wird. Beim Vergleich der Luciferase-Aktivitäten von transient mit dem HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen, welche zum einen mit der TIA-1- und zum anderen mit der GFP-spezifischen siRNA behandelt wurden, konnten nur geringe Unterschiede detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mittels des Luciferase-Assays ein Einfluss der HCV-Replikation auf die Translation der IU-Luciferase-RNA nachgewiesen werden konnte. Darüber, ob es sich dabei um eine mRNA-spezifische Translations-Inhibition oder eine Folge der für die HCV-Replikation beschriebenen allgemeinen Inhibition der Translation handelt, kann im Moment nur spekuliert werden. Des Weiteren konnte bei Betrachtung von transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen in TIA-1-depletierten Zellen (im Vergleich zur Behandlung mit der siGFP-RNA), eine deutlich erhöhte Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden. Unter dem Einfluss der HCV-Replikation scheint TIA-1 somit die Translation der IU-Luciferase-RNA zu inhibieren. Da bei Betrachtung von transient mit dem HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen jedoch nur ein geringer Einfluss der TIA-1-Depletion auf die Translation der IU-Luciferase-RNA beobachtet werden konnte, kann angenommen werden, dass TIA-1 nicht generell deren Translation inhibiert.

4 Diskussion

Das HCV repräsentiert ein bedeutsames Humanpathogen aus der Gruppe der (+)-Strang-RNA-Viren und bewirkt umfassende Veränderungen der zellulären Genexpression in den Wirtszellen. Der in dieser Arbeit am Beispiel der VEGF-A-mRNA untersuchte Einfluss auf die mRNA-Degradation könnte daran entscheidend beteiligt sein. Die Stabilisierung zellulärer Transkripte als Folge der viralen Replikation könnte einen verallgemeinerbaren Mechanismus repräsentieren, über den die virale Replikation die posttranskriptionelle Regulation der zellulären Genexpression beeinflusst. Die in dieser Arbeit untersuchte HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA kann dabei als Prototyp dieses Mechanismus angesehen werden.

Das Mitogen VEGF-A ist von hoher medizinischer Bedeutung. Beim überwiegenden Anteil HCV-infizierter Patienten entwickelt sich eine persistierende Infektion, welche zu chronischer Hepatitis, Leberzirrhosen und hepatozellulären Karzinomen (HCC) führen kann (Hoofnagle 2002, Marusawa *et al.* 1999). Die molekularen Mechanismen, die der HCV-induzierten Kanzerogenese zu Grunde liegen, sind bisher noch unzureichend geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass sie mit hepatischer Angiogenese einhergeht. Einen der wichtigsten Faktoren der Angiogenese repräsentiert das VEGF-A. Aus verschiedenen Studien war bekannt, dass eine HCV-Infektion dessen Expression beeinflusst (Abe *et al.* 2012, Nasimuzzaman *et al.* 2007, Ripoli *et al.* 2010). So konnten Nasimuzzaman und Kollegen zeigen, dass sowohl die Quantität der VEGF-A-mRNA als auch die VEGF-A-Proteinsynthese unter dem Einfluss von HCV erhöht ist und führten dies auf einen Hypoxie-ähnlichen Effekt zurück. Unter Hypoxie wird eine erhöhte VEGF-A-Expression (unter Beteiligung von HIF-1) sowohl durch eine Transkriptionsinduktion, als auch durch eine erhöhte VEGF-A-mRNA-Stabilität vermittelt. Im Zuge der Arbeit von Fr. Dipl. Biol. Winkler konnte erstmals gezeigt werden, dass auch die HCV-Replikation die Stabilität der VEGF-A-mRNA erhöht, dies jedoch nicht von der HIF-1-Aktivität abhängig ist. Somit wird die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA vermutlich durch einen Hypoxie-unabhängigen Signalweg vermittelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die darin involvierten viralen und zellulären Determinanten identifiziert. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA in Zusammenhang mit der IFN β -Antwort steht.

4.1 Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung durch virale RNA

Es wurden verschiedene virale RNA-Moleküle hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA zu induzieren. Dabei konnte bestätigt werden, dass die

transiente HCV-Replikation, nicht jedoch die WNV-Replikation in einer erhöhten Stabilität der VEGF-A-mRNA resultiert (siehe Kapitel 3.2) (¹).

Als entscheidende molekulare Determinante dieser Beobachtungen konnte die HCV-IRES identifiziert werden (siehe Kapitel 3.3.3 und 3.3.6). Die intrazelluläre Präsenz der HCV-IRES erwies sich jedoch nur in Kombination mit einer replizierenden viralen RNA als hinreichend, um die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA zu induzieren (siehe Kapitel 3.3.3 und 3.3.6).

Die Sekundärstruktur der HCV-IRES ist hoch konserviert und kann in vier Domänen unterteilt werden (I, II, III und IV). Dabei sind die Domänen I und II für eine effiziente Replikation unabdingbar, während die Domänen II, III und IV die Translations-Initiation vermitteln (Kim *et al.* 2002, Kolupaeva *et al.* 2000, Otto *et al.* 2004). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA keinen für das HCV spezifischen Effekt darstellt, sondern auch durch die transiente Replikation des BVDV-Replikons induziert werden kann (siehe Kapitel 3.3.7). Zwischen BVDV und HCV besteht ein hoher Grad an Homologie bezüglich vieler Charakteristika, z.B. Genomorganisation, sowie Replikations- und Translations-Strategie (Baginski *et al.* 2000, Lindenbach *et al.* 2003, Tautz *et al.* 2015, Zitzmann *et al.* 1999). Die zum Typ IV zählenden IRES-Elemente des HCV und des BVDV weisen starke Ähnlichkeiten auf. Neben einer signifikanten Konservierung der Nukleotidsequenz bezieht sich diese Ähnlichkeit auch auf die angenommene Sekundär- und Tertiärstruktur der RNA (Pestova *et al.* 1999).

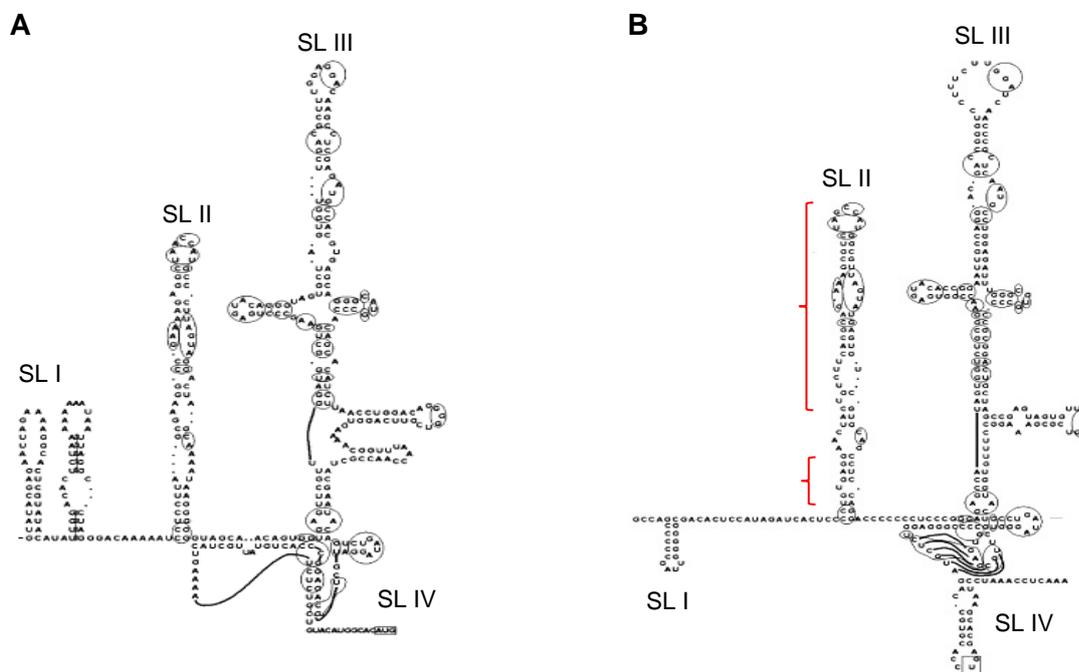


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der BVDV-IRES und der HCV-IRES. Dargestellt sind die postulierte Sekundärstruktur der BVDV-IRES (A) und der HCV-IRES (B). Die größte Ähnlichkeit der beiden IRES-Elemente ist in den *stem loops* II und III zu finden. Übereinstimmende Nukleotidsequenzen sind durch Einrahmung gekennzeichnet. (B) Die roten Klammern markieren die innerhalb der HCV-IRES identifizierte Bindestelle der PKR (siehe Kapitel 4.2) (Toroney *et al.* 2010). Abbildungen modifiziert nach (Grassmann *et al.* 2005).

Auch in Bezug auf die für die Translations-Initiation benötigten zellulären Initiationsfaktoren stehen HCV und BVDV in Übereinstimmung zueinander (Pestova *et al.* 1999). Die stärkste Ähnlichkeit der HCV- und BVDV-IRES ist in den Domänen II und III zu finden (Abbildung 4.1).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate deuten darauf hin, dass die übereinstimmenden Charakteristika des HCV und des BVDV bezüglich ihrer Translationsstrategie (cap-unabhängig, IRES-vermittelt), sowie des damit korrelierenden Einflusses auf die Wirtszelle entscheidend für die Stabilisierung der hier untersuchten VEGF-A-mRNA durch beide Replikonsysteme sind. Die WNV-RNA, sowie die ebenfalls untersuchte Sindbis-RNA werden cap-abhängig translatiert und enthalten keine IRES-Struktur. Es wird postuliert, dass die Absenz der IRES die Ursache dafür darstellt, dass die Replikation beider viralen RNAs keinen Einfluss auf die Degradation der VEGF-A-mRNA ausübt (siehe Kapitel 3.3.7).

Analog zu den Studien mit dem HCV (¹) wurde die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung unter transienter BVDV-Replikation zum Zeitpunkt der maximalen viralen Replikation beobachtet (24 h *p.t.*) (siehe Kapitel 3.3.7). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA einem definierten zeitlichen Rahmen unterliegt. Unter Verwendung des BVDV-Replikonsystems konnte zudem nachgewiesen werden, dass die viral-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA keinen Zelltyp-spezifischen Effekt darstellt (siehe Kapitel 3.3.7).

Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die verschiedenen viralen RNAs bzw. RNA-Kombinationen, welche in Hinblick auf ihre Fähigkeit getestet wurden, in Huh7-Zellen die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA zu induzieren.

Tabelle 4.1. Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung durch virale RNAs

virale RNA	Stabilisierung VEGF-A-mRNA	virale Replikation	Phosphorylierung von PKR und eIF2 α *
HCV	✓	✓	✓ 12 h <i>p.t.</i> , 48 h <i>p.t.</i>
HCV-mut	-	-	✓ 12 h <i>p.t.</i>
BVDV	✓	✓	✓ 12 h <i>p.t.</i> , 24 h <i>p.t.</i>
BVDV-mut	-	-	✓ 12 h <i>p.t.</i>
WNV	-	✓	-
WNV-mut	-	-	-
WNV + HCV-mut	✓	✓	✓ 12 h <i>p.t.</i>
WNV + HCV-IRES SL1-4	✓	✓	✓ 12 h <i>p.t.</i>
WNV + HCV-IRES SL1-3	-	✓	-
WNV + HCV-IRES SL1-2	-	✓	-
HCV-IRES SL1-4	-	-	✓ 12 h <i>p.t.</i>
HCV-IRES SL1-3	-	-	-
HCV-IRES SL1-2	-	-	n.g.
WNV + BVDV-mut	✓	✓	n.g.

n.g.- nicht getestet; * detektiert zum Zeitpunkt

4.2 Abhängigkeit der HCV-induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung von PKR und RIG I

Die Erkennung der viralen RNA als PAMP durch spezifische PRRs stellt das initiale Ereignis bei der Induktion der IFN β -Antwort dar. Dabei wird die virale RNA anhand spezifischer Charakteristika erkannt, welche sie von zellulärer RNA unterscheidet. So erkennen die membrangebundenen TLRs (*toll like*-Rezeptoren) u.a. RNA in endosomalen Vesikeln, in denen keine zelluläre RNA vorkommt (Iwasaki *et al.* 2004). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit lag der Fokus allerdings auf den cytoplasmatisch lokalisierten Sensor-Proteinen PKR und RIG I.

Es konnte gezeigt werden, dass RIG I essentiell für die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA ist (siehe Kapitel 3.3.1). Als entscheidende PAMPs der HCV-RNA, welche durch RIG I erkannt werden, wurden die Triphosphat-Struktur am 5'Ende der viralen RNA, sowie poly-Uridin-Motive in der 3'UTR identifiziert (Hornung *et al.* 2006, Pichlmair *et al.* 2006, Schmidt *et al.* 2009, Schnell *et al.* 2012, Yoneyama *et al.* 2004). Obwohl der WNV-RNA diese beiden Charakteristika fehlen, wird RIG I auch von WNV-RNA aktiviert (Errett *et al.* 2013, Fredericksen *et al.* 2006, Fredericksen *et al.* 2008, Loo *et al.* 2011, Shipley *et al.* 2012). Es wurden mehrere Sequenzbereiche innerhalb des WNV-Genoms und des anti-Genoms [(-)-Strang-Intermediat während der viralen Replikation] identifiziert, welche als PAMP zur Aktivierung von RIG I fungieren können (Shipley *et al.* 2012). Diese hochstrukturierten Bereiche besitzen keinerlei Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer Nukleotid-Sequenz, was darauf hindeutet, dass die Aktivierung von RIG I nicht durch ein spezifisches Sequenzmotiv vermittelt wird (Shipley *et al.* 2012). RIG I ist nicht nur an der Detektion von HCV und WNV, sondern auch an der zahlreicher anderer Viren [z.B. Dengue Virus, Poliovirus, Influenza-Virus, VSV (*vesicular stomatitis virus*), Masern-Virus, Ebola-Virus] beteiligt und wird dabei durch jeweils völlig verschiedene RNA-Elemente aktiviert. Dass die Replikation des hier untersuchten WNV-Replikons in Huh7-Zellen keinen Einfluss auf die Degradation der VEGF-A-mRNA ausübt, deutet darauf hin, dass die Erkennung der viralen RNA durch RIG I nicht hinreichend für die Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung ist. Zusätzlich scheint auch die Aktivierung der Kinase PKR eine hierfür essentielle Determinante zu sein (siehe Kapitel 3.3.1 - 3.3.7).

Die PKR ist wie RIG I an der Detektion viraler RNA und der Induktion eines antiviralen Status in der Zelle beteiligt (Diebold *et al.* 2003, McAllister *et al.* 2009, McAllister *et al.* 2012). Sie ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche wichtige Funktionen bei der Regulation der Transkription und Translation besitzt (Clemens *et al.* 1997). Die PKR kann strukturell in zwei Domänen unterteilt werden: eine N-terminale dsRNA-bindende Domäne (dsRBD) und eine C-terminale Kinase-Domäne, welche durch Bindung der dsRBD an RNA aktiviert wird. Die Substratspezifität der PKR-Aktivierung wird noch kontrovers diskutiert. So wurde ursprünglich angenom-

men, dass die PKR zwar auch an kurze dsRNA (15 - 16 bp) binden kann (Bevilacqua *et al.* 1996, Ucci *et al.* 2007), ihre Aktivierung jedoch nur durch längere dsRNA (30 - 85 bp) induziert wird (Manche *et al.* 1992, Minks *et al.* 1979). Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass die PKR auch durch 19 - 21 bp lange siRNAs aktiviert werden kann (Puthenveetil *et al.* 2006, Sledz *et al.* 2003). Obwohl sie hoch strukturiert ist und keine längeren (>30 bp) dsRNA-Bereiche enthält, kann auch die HCV-IRES die Aktivierung der PKR induzieren (siehe auch Kapitel 3.3.6). Die Wechselwirkungen zwischen HCV und PKR sind bereits intensiv untersucht worden. Mehrere Studien konnten bereits den inhibitorischen Effekt der PKR auf die HCV-Replikation demonstrieren (Itsui *et al.* 2006, Rivas-Estilla *et al.* 2002, Tokumoto *et al.* 2007). Des Weiteren konnte sowohl in akut HCV-infizierten Schimpansen (Bigger *et al.* 2001), als auch in chronisch mit dem HCV infizierten Patienten (Yu *et al.* 2000) und in Hepatom-Zelllinien, welche von HCV-assoziierten Tumoren abgeleitet wurden (Hiasa *et al.* 2003), eine erhöhte PKR-Expression nachgewiesen werden.

Die wohl wichtigste Funktion der PKR stellt die zur Translations-Inhibition führende Phosphorylierung von eIF2 α dar. Zusammen mit den Untereinheiten β und γ bildet eIF2 α das eIF2-Protein. Der ternäre Komplex aus eIF2, GTP und der Initiator-tRNA ist essentiell für die Translations-Initiation. Dabei vermittelt eIF2 in einem GTP-abhängigen Prozess die Ausbildung von Basenpaarungen zwischen dem AUG-Startcodon der mRNA und der Initiator-tRNA (Nanda *et al.* 2013, Pestova *et al.* 2002, Peterson *et al.* 1979, Pisarev *et al.* 2006) (Abbildung 4.2). Nach der GTP-Hydrolyse wird der eIF2:GDP-Komplex freigesetzt und anschließend das GDP durch GTP ersetzt. Dieser Prozess ist nur unter Stimulation durch den GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) eIF2B (*eukaryotic initiation factor 2B*) möglich (Panniers *et al.* 1988). Die Affinität von eIF2B für eIF2 α -P:GDP ist wesentlich höher als die für eIF2 α :GDP. Deshalb inhibiert die Phosphorylierung von eIF2 α (am Ser51) die eIF2B-stimulierte Substitution von GDP gegen GTP und führt somit zur Inhibition der Translation (Rowlands *et al.* 1988, Sudhakar *et al.* 2000). Die eingeschränkte Verfügbarkeit des eIF2-GTP-tRNA^{Met}-Komplexes resultiert in Translations-inkompetenten Prä-Initiationskomplexen und der Assemblierung von Stress Granula (siehe Kapitel 1.4).

Die Phosphorylierung von eIF2 α repräsentiert einen entscheidenden antiviralen Mechanismus. So wird zum einen die virale Translation inhibiert und zum anderen kann die Inhibition der zellulären Translation zur Apoptose führen, wodurch die virale Ausbreitung verhindert wird (Der *et al.* 1997, Jagus *et al.* 1999, Tan *et al.* 1999). Neben der durch dsRNA aktivierten PKR sind bisher drei weitere Kinasen bekannt, welche eIF2 α phosphorylieren können. Dabei wird die PERK als Konsequenz von ER-Stress (Harding *et al.* 2000), die *heme-regulated inhibitor kinase* (HRI) durch Häm-Mangel (Han *et al.* 2001, Lu *et al.* 2001) und die *general*

control non-derepressible kinase 2 (GCN2) durch Aminosäure-Mangel (Kimball 1999) aktiviert.

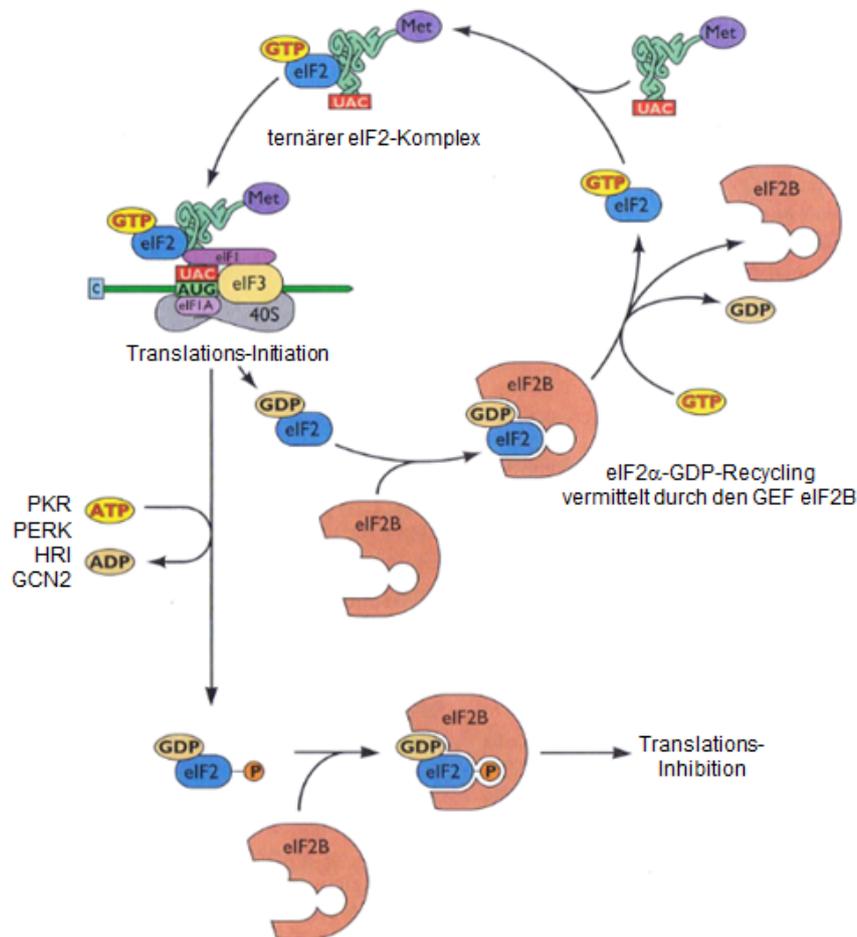


Abbildung 4.2: Translations-Initiation an zellulären mRNAs. Die Translations-Initiation an zellulären mRNAs beginnt mit der Assemblierung des 43S-Prä-Initiations-Komplexes. Dieser besteht aus der ribosomalen 40S-Untereinheit, an welche verschiedene Translations-Initiationsfaktoren gebunden sind und dem ternären eIF2-Komplex. Dieser wiederum besteht aus der Initiator-tRNA, GTP und dem eIF2-Protein. Nur im Komplex mit GTP und der Initiator-tRNA kann eIF2 zusammen mit weiteren Faktoren die Translation initiieren. Anschließend muss das entstandene GDP unter Stimulation durch eIF2B gegen GTP substituiert werden. Verschiedene Arten von zellulärem Stress resultieren in der Phosphorylierung der α -Untereinheit von eIF2 mittels der Kinasen HRI, PKR, PERK oder GCN2, wodurch die eIF2B-vermittelte Substitution von GDP gegen GTP und somit die Translations-Initiation inhibiert wird. Abbildung modifiziert nach (Flint 2009).

Zahlreiche Viren, vor allem (+)-Strang-RNA-Viren haben einen alternativen Mechanismus der Translations-Initiation entwickelt. Einer der einfachsten dieser Mechanismen findet sich beim HCV (analog beim BVDV). Die Initiation verläuft cap-unabhängig und wird stattdessen durch die in der 5'UTR lokalisierte IRES vermittelt (Brown *et al.* 1992, Pestova *et al.* 1998, Sarnow 2003). Die Domäne III der HCV-IRES vermittelt die korrekte Positionierung des Translations-Startcodons, welches in Domäne IV der HCV-IRES lokalisiert ist, in der ribosomalen 40S-Untereinheit, wodurch der ribosomale *scanning*-Prozess obsolet wird (Honda *et al.* 1996, Pestova *et al.* 1998) (Abbildung 4.3). Des Weiteren ist nur ein Minimum an Translations-Initiationsfaktoren essentiell. So ist eIF3 an der Bindung der 40S-Untereinheit an die HCV-IRES beteiligt, da es zum einen mit der 40S-Untereinheit und zum anderen mit der Domäne

III der HCV-IRES interagiert. Des Weiteren bindet es an den ternären eIF2-Komplex, welcher die Initiator-tRNA rekrutiert. Im weiteren Verlauf vermittelt eIF5B die Assemblierung des funktionellen 80S-Ribosoms. Dieser Mechanismus der Translations-Initiation involviert jedoch (analog zum Mechanismus an zellulären mRNAs) den eIF2-Komplex.

Es existieren allerdings auch Mechanismen der eIF2 α -unabhängigen Translations-Initiation, welche die fortgesetzte Translation unter zellulärem Stress gewährleisten (Pisarev *et al.* 2005, Thakor *et al.* 2012). Dies ist unter anderem auch für das HCV nachgewiesen worden (Khawaja *et al.* 2015, Kim *et al.* 2011, Terenin *et al.* 2008). Dabei wurden zum einen eIF5B (Terenin *et al.* 2008) und zum anderen eIF2A (Kim *et al.* 2011) als alternative Initiator-tRNA-bindende Proteine postuliert. Übereinstimmend ist bei beiden vorgeschlagenen Mechanismen die Translation der viralen RNA auch unter Mangel des ternären eIF2-Komplexes möglich. Deshalb ist die Translation der HCV-RNA gegenüber der PKR-vermittelten eIF2 α -Phosphorylierung nicht nur unempfindlich, sondern sie wurde sogar bereits als vorteilhaft für das HCV beschrieben (Arnaud *et al.* 2010, Arnaud *et al.* 2011). Dies beruht zum einen darauf, dass die HCV-RNA aufgrund der Inhibition der eIF2 α -abhängigen Translation nicht mit zellulären mRNAs um die Translationsmaschinerie konkurrieren muss und zum anderen darauf, dass auch die Synthese wichtiger antiviraler Effektoren (z.B. IFN β) aufgrund der eIF2 α -Phosphorylierung inhibiert ist (Arnaud *et al.* 2010).

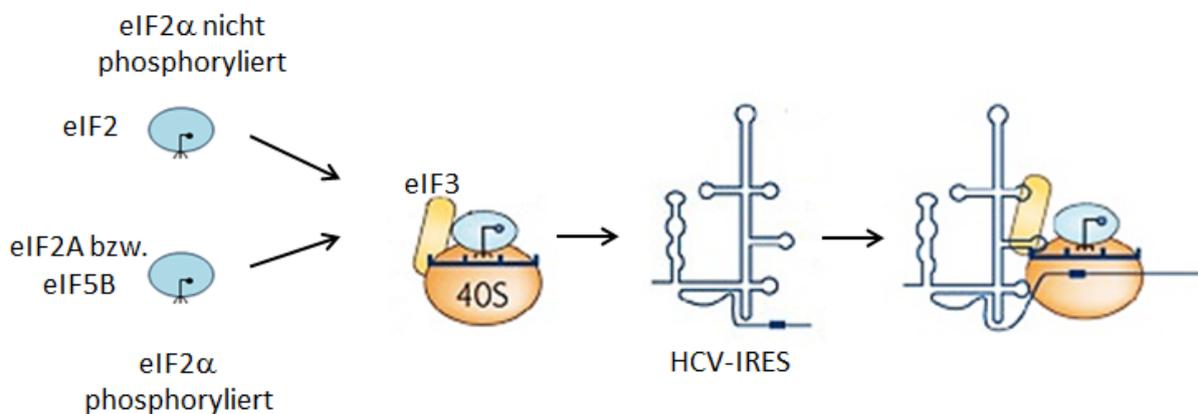


Abbildung 4.3: Translations-Initiation an der HCV-RNA. Die Struktur der HCV-IRES vermittelt die direkte Bindung der ribosomalen 40S-Untereinheit des 43S-Prä-Initiations-Komplexes an die HCV-RNA. Dies resultiert in einer Konformationsänderung der 40S-Untereinheit, wodurch das Startcodon korrekt in der 40S-Untereinheit positioniert wird. Der ribosomale *scanning*-Prozess ist somit nicht notwendig. Unter normalen physiologischen Bedingungen rekrutiert der eIF2-Komplex die Initiator-tRNA. Bei zellulärem Stress, welcher die Phosphorylierung von eIF2- α induziert, gewährleistet ein alternatives Initiator-tRNA-bindendes Protein (eIF5B bzw. eIF2A) die fortgesetzte Translation der HCV-RNA. Abbildung modifiziert nach (Jackson *et al.* 2010).

Neben der eIF2 α -vermittelten Translations-Inhibition wird die antivirale Wirkung der PKR zusätzlich durch ihren Einfluss als Signal-transduzierendes Protein auf die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren (IRF-1, NF- κ B, STAT1) vermittelt, wodurch sie an der Induktion der IFN β -Antwort und verschiedenen weiteren antiviralen Effekten beteiligt ist (Cuddihy *et al.* 1999, Kumar *et al.* 1997, Williams 1999, Wong *et al.* 1997, Zamanian-Daryoush *et al.* 2000).

Die Rolle der PKR bei der HCV-induzierten Aktivierung von NF- κ B soll in Kapitel 4.4 diskutiert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass die transiente Transfektion von Huh7-Zellen mit den HCV- und BVDV-Replikons die Phosphorylierung von PKR und eIF2 α induziert (siehe Kapitel 3.3.2 und 3.3.7). Nur in den Zellen, in denen die jeweiligen Replikons transient replizierten, konnte die Phosphorylierung von PKR und eIF2 α auch zum Zeitpunkt der maximalen Replikation nachgewiesen werden (nicht bei replikationsdefizienten Varianten). Dies deutet auf eine positive Korrelation zwischen der intrazellulären Quantität der viralen RNA und der Aktivierung der PKR hin.

In Übereinstimmung mit diesen Resultaten konnte in anderen Studien die PKR-Aktivierung sowohl nach Infektion verschiedener Huh7-Zelllinien mit dem JFH1-Virusstamm (Arnaud *et al.* 2010, Arnaud *et al.* 2011, Garaigorta *et al.* 2009, Kang *et al.* 2009) als auch unter Verwendung subgenomischer HCV-Replikons (Taylor *et al.* 2005, Wang *et al.* 2003) nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte bereits gezeigt werden, dass in Analogie zu HCV auch BVDV die Aktivierung der PKR, die Phosphorylierung von eIF2 α , die resultierende Translations-Inhibition und die Aktivierung von NF- κ B induziert (Gil *et al.* 2006, Schweizer *et al.* 2001, Yamane *et al.* 2006). Des Weiteren wurde in mehreren Publikationen beschrieben, dass der BVDV-Stamm, welchem das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete BVDV-Replikon zugeordnet werden kann (BVDV-cp7/cp9, cp: *cytopathic*, Meyers *et al.* 1996), die Synthese der Typ I-Interferone induziert (Adler *et al.* 1997, Charleston *et al.* 2001, Perler *et al.* 2000). Zudem wurde auch für das BVDV bereits ein Einfluss auf die VEGF-Expression nachgewiesen (Bielefeldt-Ohmann *et al.* 2012).

Die cap-abhängig translatierten viralen RNAs (WNV, Sindbis) induzierten hingegen weder die Phosphorylierung von PKR, noch die von eIF2 α (siehe Kapitel 3.3.2 und 3.3.7). Das Sindbis-Virus ist ein Vertreter der zur Familie der *Togaviridae* zählenden Alphaviren. Zahlreiche Studien belegen eine sehr effiziente Translations-Inhibition in mit dem Sindbis-Virus infizierten Wirtszellen (Favre *et al.* 1996, Gorchakov *et al.* 2004, Ventoso *et al.* 2006). Daran sind sowohl PKR-abhängige, als auch PKR-unabhängige Mechanismen beteiligt (Gorchakov *et al.* 2004). Im Gegensatz zu den *Flaviviridae* werden bei den Alphaviren die Strukturproteine von einer subgenomischen RNA (sgRNA) translatiert, welche erst in späten Stadien der Infektion auftritt. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Infektionen mit dem Sindbis-Virus zur Aktivierung der PKR und der fast vollständigen Phosphorylierung von eIF2 α führen (Gorchakov *et al.* 2004, Ventoso *et al.* 2006). Ventoso *et al.* konnten zeigen, dass die Translation der sgRNA gegenüber der eIF2 α -Phosphorylierung unempfindlich ist und postulierten eIF2A als alternatives Initiator-tRNA-bindendes Protein, welches die Translation der sgRNA ermöglicht (Ventoso *et al.* 2006) und auch für das HCV vorgeschlagen

wurde (Kim *et al.* 2011). Im Gegensatz zur sgRNA wird die Translation der genomischen RNA, welche für die Nichtstruktur-Proteine codiert, aufgrund der Phosphorylierung von eIF2 α inhibiert (Ventoso *et al.* 2006). Auch unter Verwendung von Sindbis-Replikons, welche nicht für die viralen Strukturproteine codieren (keine subgenomische RNA), ist eine Inhibition der zellulären Translation nachgewiesen worden. Interessanterweise wird diese jedoch über PKR- und eIF2 α -unabhängige Mechanismen vermittelt (Frolov *et al.* 1994, Gorchakov *et al.* 2004). Es kann spekuliert werden, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine PKR- und eIF2 α -Phosphorylierung detektiert werden konnte, da im Gegensatz zu den Studien von Ventoso *et al.* (Infektion mit Sindbis, vollständiges Genom) ein ausschließlich für die Nichtstrukturproteine codierendes Sindbis-Replikon verwendet wurde.

Die Aktivierung der PKR durch WNV-RNA wird kontrovers diskutiert (Courtney *et al.* 2012, Elbahesh *et al.* 2011, Gilfoy *et al.* 2007). So zeigten Gilfoy *et al.*, dass die PKR sowohl in murinen, als auch in verschiedenen humanen Zellen an der WNV-induzierten Interferon-Induktion beteiligt ist (Gilfoy *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu beschrieben Elbahesh und Kollegen, dass die Infektion von Wirtszellen mit natürlich auftretenden WNV-Stämmen nicht mit der Aktivierung der PKR einhergeht. Sie postulierten, dass die virale RNA *in vivo* aufgrund ihrer subzellulären Lokalisation vor der Erkennung durch die PKR geschützt ist (Elbahesh *et al.* 2011). In Übereinstimmung damit schlugen Courtney und Kollegen eine direkte Korrelation zwischen der Aktivierung der PKR und dem Ausmaß der viralen RNA-Synthese zu frühen Zeitpunkten der WNV-Infektion vor. Die Replikation des WNV erfolgt, wie auch die anderer Vertreter der *Flaviviridae* in membrangebundenen Replikationskomplexen (den Boon *et al.* 2010a, den Boon *et al.* 2010b, Egger *et al.* 2002, Gosert *et al.* 2003, Hugle *et al.* 2001, Lindenbach 2007, Miller *et al.* 2008). Courtney und Kollegen vermuteten, dass die anfänglich relativ langsame virale Replikation bei natürlich auftretenden WNV-Stämmen dazu führt, dass zunächst diese speziellen Membranstrukturen ausgebildet werden, in denen dann die effiziente Replikation der viralen RNA erfolgt. Somit liegen zu keinem Zeitpunkt größere Mengen viraler RNA im Cytoplasma der Wirtszelle vor, welche die PKR aktivieren könnten. Es ist jedoch anzumerken, dass auch die Replikation des HCV in membrangebundenen Replikationskomplexen abläuft (El-Hage *et al.* 2003, Lindenbach 2007). Dass die HCV-RNA dennoch die Aktivierung der PKR induziert, deutet darauf hin, dass weitere Faktoren dazu führen, dass bei transientser WNV-Replikation keine PKR-Aktivierung detektiert werden konnte (siehe Kapitel 3.3.2).

Die bei der simultanen Transfektion des WNV-Replikons mit der HCV-mut-RNA bzw. der vollständigen HCV-IRES beobachtete Aktivierung der PKR kann auf die Präsenz der HCV-RNA zurückgeführt werden und steht in Übereinstimmung mit bereits publizierten Studien (siehe Kapitel 3.3.6). So wurde die HCV-IRES bereits als entscheidendes PAMP beschrie-

ben, welches die Aktivierung der PKR vermittelt (Arnaud *et al.* 2011, Shimoike *et al.* 2009, Toroney *et al.* 2010) und somit an der Induktion der Interferon-Antwort beteiligt ist (Zhang *et al.* 2013). Der Mechanismus der PKR-Aktivierung ist noch nicht vollständig geklärt. Im Wesentlichen werden derzeit zwei favorisierte Modelle diskutiert: das Auto-Inhibitions-Modell und das Dimerisierungs-Modell (Cole 2007, Lemaire *et al.* 2008, Nanduri *et al.* 2000).

Wie bereits beschrieben, besteht die PKR strukturell aus einer regulatorischen dsRBD und einer Kinase-Domäne. Gemäß dem Auto-Inhibitions-Modell liegt die PKR im inaktiven Zustand in einer geschlossenen Konformation vor, in welcher die Kinase-Aktivität durch Interaktionen der dsRBD und der Kinase-Domäne inhibiert wird. Die Bindung an dsRNA induziert eine Konformationsänderung, wodurch die Kinase-Domäne aktiviert wird (Gelev *et al.* 2006, Lemaire *et al.* 2008, Nanduri *et al.* 2000). Im Gegensatz dazu postuliert das Dimerisierungs-Modell, dass die Dimerisierung der PKR für ihre Aktivierung entscheidend ist. So resultiert die räumliche Nähe mehrerer PKR-Moleküle durch Bindung an ein RNA-Molekül in der Aktivierung der Kinase-Aktivität (Cole 2007, McKenna *et al.* 2007, Robertson *et al.* 1996).

Welche Bereiche der HCV-IRES die PKR-Aktivierung vermitteln, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. So lokalisierten Shimoike und Kollegen die PKR-Bindestelle innerhalb der HCV-IRES bei den Domänen III und IV (Shimoike *et al.* 2009). Die Studien von Toroney *et al.* bestätigten in einem *in vitro* PKR-Phosphorylierungs-Assay die Aktivierung der PKR durch die Domänen III und IV der HCV-IRES, identifizierten jedoch die Domäne II als einen noch effizienteren Aktivator der PKR (Toroney *et al.* 2010). Mittels *footprinting*-Analysen wurde die Bindestelle der PKR innerhalb des *stem loops* II stromauf- und -abwärts einer ungepaarten Sequenz lokalisiert (nt 53-57, AACUA) (Abbildung 4.1).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine Aktivierung der PKR nur durch die vollständige HCV-IRES (SL1-4) induziert werden, nicht jedoch durch die kürzere SL1-3-RNA, obgleich der *stemloop* II auch in der SL1-3-RNA enthalten ist. Ein Vergleich dieser *in cellulo*-Studien mit den erwähnten *in vitro*-Studien ist nur bedingt möglich. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass unter *in cellulo*-Bedingungen der *stem loop* IV von besonderer Bedeutung für die PKR-Aktivierung ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass bei Deletion des *stem loop* IV die native Sekundärstruktur der *stem loops* I-III beeinträchtigt ist. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die simultane Transfektion des WNV-Replikons mit *in vitro* Transkripten, welche ausschließlich den *stem loop* III oder die *stem loops* III und IV der HCV-IRES umfassen, die Stabilität der VEGF-A-mRNA nicht beeinflusst (persönliche Mitteilung, Fr. M.Sc. Aniseh Poshtgohian Madi, Mikrobielle Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg). In weiterführenden Studien kann durch systematisches Mutieren einzelner Sequenzbereiche der HCV-IRES näher charakterisiert werden, welche Bereiche der HCV-IRES für die Aktivierung der PKR unter *in cellulo*-Bedingungen essentiell sind.

Auch bei der ÜE der konstitutiv aktiven Varianten von PKR und eIF2 α in der persistenten HCV-Zelllinie (siehe Kapitel 3.3.5) ergaben sich Hinweise auf eine positive Korrelation zwischen der Aktivierung der PKR und der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung. Allerdings erwies sich die Phosphorylierung von eIF2 α nicht als hinreichend für die Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung. Zusätzlich zur eIF2 α -Phosphorylierung erscheint die Replikation einer viralen RNA als eine essentielle Determinante, um diesen Effekt zu induzieren. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass nicht die Aktivierung der PKR im speziellen, sondern die von ihr vermittelte eIF2 α -Phosphorylierung für die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA von Bedeutung ist (siehe Kapitel 3.3.4, 3.3.5).

Wie bereits beschrieben, werden durch die Aktivierung von RIG I und PKR wichtige zelluläre Prozesse wie die Translation und die Genexpression entscheidend beeinflusst, was mit der Induktion multipler Stress-Faktoren in den Zellen einhergeht. Die längerfristige Aktivierung solch zentraler Signalkaskaden wirkt sich negativ auf die Vitalität der Zellen aus und kann letztlich zur Induktion der Apoptose führen (Benali-Furet *et al.* 2005, Gonzalez-Gallego *et al.* 2011, Kaufman 1999, Li *et al.* 2009, Nakagawa *et al.* 2000). Es ist deshalb von entscheidender Bedeutung, dass für die Signalkaskaden entsprechende Gegenregulationen bzw. Mechanismen zur Deaktivierung existieren. Im Kontext persistenter HCV-Infektionen ist dies bereits eingehender untersucht worden. So beschrieben Ruggieri *et al.* in HCV-infizierten Zellen eine oszillierende Aktivierung und Deaktivierung der PKR, welche mit der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von eIF2 α und der Assemblierung bzw. Disassemblierung von Stress Granula korreliert. Sie beschrieben des Weiteren, dass an der Gegenregulation der PKR-Aktivierung die erhöhte Expression von GADD34 (*growth arrest and damage-inducible protein 34*) maßgeblich beteiligt ist. GADD34 repräsentiert die regulatorische Untereinheit der Protein-Phosphatase 1, welche eIF2 α dephosphoryliert (Connor *et al.* 2001, Novoa *et al.* 2001). Die Autoren postulieren, dass die Oszillation der PKR-Aktivierung und die daraus resultierenden Phasen aktiver und inhibierter Translation eine entscheidende Rolle für die Entwicklung persistenter HCV-Infektionen spielen.

Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mittels Microarray-Analyse bei transienter HCV-Replikation in Huh7-Zellen eine um den Faktor 4 - 5 erhöhte GADD34-mRNA-Menge (48 h *p.t.*; im Vergleich zu transient mit dem HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In der persistenten HCV-Zelllinie konnte keine erhöhte GADD34-Transkriptmenge nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es ist jedoch anzumerken, dass die Protein-Phosphatase 1 neben GADD34 auch an eine andere regulatorische Untereinheit binden kann (*phosphoprotein regulatory subunit 15B* - PPP1R15B) (Jousse *et al.* 2003). Im Gegensatz zu GADD34, welches nur unter zellulärem Stress exprimiert wird, wird PPP1R15B konstitutiv exprimiert (Jousse *et al.* 2003). Mittels Microarray-

Analyse konnte eine erhöhte PPP1R15B-Transkriptmenge in der persistenten HCV-Zelllinie nachgewiesen werden (1,8 - 2,5fache Erhöhung im Vergleich zu transient mit dem HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen) (Daten nicht gezeigt). Bei transients HCV-Replikation war die PPP1R15B-Transkriptmenge (im Vergleich zu transient mit dem HCV-mut-Replikon transfizierten Zellen) nicht erhöht (Daten nicht gezeigt).

Es konnte nicht geklärt werden, welche genauen molekularen Mechanismen der fehlenden VEGF-A-mRNA-Stabilisierung in der persistenten HCV-Zelllinie zu Grunde liegen. Es wird jedoch ein Zusammenhang mit der PKR-vermittelten Phosphorylierung von eIF2 α postuliert. Obleich diesbezüglich keine detaillierten Studien durchgeführt wurden, erscheint es dabei plausibel, dass in der persistenten HCV-Zelllinie eine dem von Ruggieri *et al.* beschriebenen Mechanismus ähnliche Regulation der PKR-Aktivität vorliegt.

4.3 Die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA steht in Zusammenhang mit der Interferon β -Antwort

Die Aktivierung der zellulären Sensor-Proteine PKR und RIG I durch Bindung an virale RNA führt letztlich zu Induktion der Interferon β -Antwort (McAllister *et al.* 2009, McAllister *et al.* 2012, Yoneyama *et al.* 2004, Yoneyama *et al.* 2005, Yoneyama *et al.* 2007). RIG I besitzt zwei N-terminale CARD-Domänen, welche nach ihrer Aktivierung die Signaltransduktion durch Interaktion mit dem in der Mitochondrien-Membran lokalisierten MAVS (*mitochondrial anti-viral signaling protein*) gewährleisten. Im Folgenden werden mittels verschiedener Kinasen [*I κ B-kinase i* - IKK_i (IKK α , IKK β , IKK ϵ), *TANK-binding kinase 1* – TBK1] Transkriptionsfaktoren (IRF-3, NF- κ B, ATF-2/c-Jun) aktiviert, welche in den Nukleus translozieren und dort durch Bindung an bestimmte Promotor-Elemente des *IFN β* -Gens dessen Transkription induzieren (Kawai *et al.* 2005, Seth *et al.* 2005, Yoneyama *et al.* 2007). Der Promotor des *IFN β* -Gens enthält verschiedene regulatorische Domänen, an welche jeweils bestimmte Transkriptionsfaktoren binden können. Die Transkriptionsfaktoren binden kooperativ an den *IFN β* -Promotor und bilden einen multimeren Protein-Komplex, welcher als IFN β -Enhanceosom bezeichnet wird. Durch den speziellen Aufbau des *IFN β* -Promotors unterliegt die Transkriptions-Aktivierung einem Synergie-Effekt. Dabei kann jeder der Transkriptionsfaktoren eine basale Transkription des *IFN β* -Gens induzieren, aber bei gleichzeitiger Aktivierung aller Transkriptionsfaktoren wird die Transkription überproportional gesteigert (Juang *et al.* 1998, Merika *et al.* 1998, Thanos *et al.* 1995).

Es wurde gezeigt, dass die transiente Replikation des hier verwendeten HCV-Replikons, nicht jedoch die des WNV-Replikons in Huh7-Zellen in einer deutlichen Erhöhung der IFN β -Transkriptmenge resultiert (siehe Kapitel 3.3.8.1). Diese Beobachtung war unerwartet, da in

früheren Studien eine deutliche WNV-vermittelte IFN β -Induktion gezeigt werden konnte (Cinatl *et al.* 2006, Fredericksen *et al.* 2004, Gilfoy *et al.* 2007, Scholle *et al.* 2005), während das HCV als relativ schwacher Induktor der IFN β -Transkription beschrieben wurde (Arnaud *et al.* 2010, Mihm *et al.* 2004, Park *et al.* 2012). Die genomischen RNAs beider Viren können prinzipiell als effiziente PAMPs fungieren, welche von zellulären Sensor-Proteinen wie PKR, RIG I und TLRs erkannt werden, wodurch die angeborene Immunantwort der Zelle induziert wird. Beide Viren haben jedoch unterschiedliche Strategien entwickelt, um die Immunabwehr der Wirtszellen zu inhibieren (Keller *et al.* 2007). So konnte bereits für mehrere der HCV-Proteine (*core*, E2, NS3/4A, NS5A) gezeigt werden, dass sie mit der zellulären Immunantwort interferieren (Foy *et al.* 2003, Gale *et al.* 1997, Gale *et al.* 1998, Melen *et al.* 2004, Miller *et al.* 2004, Taylor *et al.* 1999). Die immunmodulatorischen Effekte der HCV-Proteine E2 und *core* können im Kontext der vorliegenden Arbeit jedoch vernachlässigt werden, da diese Proteine von dem verwendeten HCV-Replikon nicht codiert werden. Die inhibitorische Wirkung der NS3/4A-Protease beruht auf der Proteolyse des Adaptorproteins MAVS, welches die von RIG I ausgehende Signaltransduktion vermittelt. Aufgrund der Proteolyse können die Transkriptionsfaktoren IRF-3 und NF- κ B nicht mehr aktiviert werden, wodurch die Synthese der Typ I-Interferone inhibiert wird. Das NS5A-Protein interagiert hingegen mit der PKR und inhibiert diese. Zusätzlich kann es den Interferon-induzierten JAK/STAT-Signalweg inhibieren und übt einen modulatorischen Effekt auf verschiedene Zellzyklus-regulierende Gene aus (Ghosh *et al.* 1999, Ghosh *et al.* 2000, Ghosh *et al.* 2003, Polyak *et al.* 1999). Der Einfluss der von dem HCV-Replikon codierten viralen Proteine NS3/4A und NS5A auf die IFN β -Antwort im Kontext der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung ist nicht untersucht worden und könnte in späteren Studien charakterisiert werden.

Im Gegensatz zu HCV inhibiert das WNV den RIG I-Signalweg und die resultierende Synthese der Typ I-Interferone (α , β) nicht. Stattdessen wurde eine zeitliche Verzögerung der von den PRRs ausgehenden Signalkaskaden beschrieben, welche sich in frühen Stadien der Infektion als vorteilhaft für die virale Replikation erweist (Fredericksen *et al.* 2004). Dadurch können virale Proteine in den Wirtszellen akkumulieren, welche die antiviralen Mechanismen der Typ I-Interferone inhibieren. In zahlreichen unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass das WNV verschiedene Komponenten der JAK/STAT-Signalkaskade inhibiert (Guo *et al.* 2005, Liu *et al.* 2005, Lucas *et al.* 2003, Morrey *et al.* 2004, Munoz-Jordan *et al.* 2005). Die genauen Mechanismen und viralen Determinanten dieser Inhibition sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. So wurde für verschiedene WNV-Proteine (NS2A, NS2B, NS4A, NS4B, NS5) eine immunsuppressive Funktion postuliert (Guo *et al.* 2005, Keller *et al.* 2006, Laurent-Rolle *et al.* 2010, Liu *et al.* 2005, Munoz-Jordan *et al.* 2005). Des Weiteren unterscheidet sich die Fähigkeit zur Inhibition der Interferon-Antwort signifikant zwischen den

verschiedenen natürlich auftretenden WNV-Stämmen (Hussmann *et al.* 2013, Keller *et al.* 2006, Liu *et al.* 2006).

Die unterschiedlichen Mechanismen des HCV und WNV zur Inhibition der angeborenen Immunantwort der Wirtszellen erklären auch ihre unterschiedliche Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit Typ I-Interferonen. Während nach Etablierung einer WNV-Infektion die virale Replikation resistent gegenüber IFN α ist (Keller *et al.* 2006, Lucas *et al.* 2003, Morrey *et al.* 2004), erweist sich das HCV als sensitiv gegenüber diesem Interferon, weshalb es in der Standard-Therapie für HCV-infizierte Patienten verwendet wird (Frese *et al.* 2001, Guo *et al.* 2005, Palumbo 2009, Ross *et al.* 2004, Wiegand *et al.* 2006).

Über die Ursachen, warum eine erhöhte IFN β -Transkriptmenge als Folge der transienten HCV-Replikation, nicht jedoch der WNV-Replikation beobachtet werden konnte, kann bisher nur spekuliert werden. Da die IFN β -Induktion ausschließlich in Huh7-Zellen untersucht wurde, könnten Zelllinien-spezifische Adaptionen eine mögliche Ursache darstellen. Um diese Vermutung zu bestätigen, könnte in späteren Studien untersucht werden, ob die WNV-Replikation z.B. in HeLa- oder Hek293T-RExTM-Zellen einen Einfluss auf die IFN β -Transkription ausübt.

Interessanterweise resultierte die ÜE von IFN β sowohl in der Huh7- als auch in der persistenten HCV-Zelllinie in der Stabilisierung der VEGF-A-mRNA (siehe Kapitel 3.3.8.2). Dieser posttranskriptionelle Effekt kann somit auch unabhängig von der Replikation einer viralen RNA induziert werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der IFN β -induzierten und der HCV-induzierten Stabilisierung der VEGF-A-mRNA unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen. Die Beteiligung der Sensor-Proteine PKR und RIG, sowie die Bedeutung der HCV-IRES als PAMP bei der HCV-induzierten Stabilisierung der VEGF-A-mRNA deuten jedoch auf einen Zusammenhang dieser mit der IFN β -Induktion hin. Außerdem konnte JAK1 als essentieller Faktor der HCV-induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung identifiziert werden. Da die Funktion von JAK1 in der Transduktion von Signalen ausgehend vom IFNAR liegt, deutet dies darauf hin, dass die HCV-induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung abhängig von der JAK/STAT-Signalkaskade ist. Auf welche Weise diese Signalkaskade die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA vermittelt, konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Wie bereits erwähnt, kann die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs die Expression zahlreicher Gene beeinflussen. Diese umfassen unter anderem Proteine, für welche bereits eine antivirale Wirkung nachgewiesen wurde (Mx-Proteine, RNaseL, OAS, PKR, diverse ISG-Proteine), sowie Transkriptionsfaktoren (z.B. IRF-7) und PRRs [z.B. PKR, RIG I, TLR3; (de Veer *et al.* 2001, Thomis *et al.* 1992)], welche über positive Rückkopplungsschleifen die IFN-Antwort amplifizieren können (Marie *et al.* 1998, Sato *et al.* 1998, Sato *et al.* 2000). Über die immense Vielfalt an verschiedenen Genen, deren Transkription über den

JAK/STAT-Signalweg verändert werden kann, können aber auch viele weitere zelluläre Mechanismen wie Zellproliferation, Entwicklung, Differenzierung, Apoptose, Hämatopoese und Migration beeinflusst werden. Um aufzuklären, ob die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA durch eines der von IFN β induzierten Gene vermittelt wird, wäre es vorteilhaft, den molekularen Mechanismus der Stabilisierung zu charakterisieren. Als plausibel erscheinen eine direkte Interaktion der mRNA mit einem oder mehreren RNA-bindenden Proteinen und/oder eine veränderte subzelluläre Lokalisierung der mRNA innerhalb protektiver Kompartimente, welche den Zugang der zellulären Degradationsmaschinerie zu der mRNA limitieren.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich aus einer Besonderheit der VEGF-A-mRNA. Sie ist durch eine außergewöhnlich lange 5'UTR charakterisiert, welche zwei separate IRES-Elemente enthält (Akiri *et al.* 1998, Huez *et al.* 1998, Huez *et al.* 2001, Stein *et al.* 1998). Diese ursprünglich in viralen RNAs entdeckten RNA-Strukturen, wurden bereits für zahlreiche zelluläre mRNAs beschrieben (Komar *et al.* 2005, Komar *et al.* 2011). Viele dieser mRNAs sind Schlüsselkomponenten zentraler zellulärer Mechanismen wie Stress-Antworten, Zell-Überleben, Proliferation und Apoptose (Komar *et al.* 2011). Deshalb ist ihre Expression häufig einer strikten und komplexen Regulation unterworfen. Unter normalen physiologischen Bedingungen, unter denen eine effiziente cap-abhängige Translation abläuft, werden solche IRES-haltigen mRNAs häufig nur ineffizient translatiert, da die außergewöhnlich langen und oft hoch strukturierten 5'UTRs mit dem ribosomalen *scanning* interferieren (Park *et al.* 2005). Unter verschiedenen zellulären Stress-Bedingungen, welche mit der Inhibition der cap-abhängigen Translations-Initiation einhergehen, vermitteln diese IRES-Elemente jedoch eine effiziente Translation der entsprechenden mRNAs (Graber *et al.* 2007, Komar *et al.* 2011, Lewis *et al.* 2008, Spriggs *et al.* 2008). Es wird angenommen, dass unter solchen Bedingungen die IRES-vermittelte Translation dieser zellulären mRNAs eine entscheidende Rolle für die Entscheidung des weiteren Zell-Schicksals spielt (Komar *et al.* 2005, Komar *et al.* 2011). Da unter dem Einfluss der transienten HCV-Replikation die Aktivierung der PKR, sowie die Phosphorylierung von eIF2 α demonstriert werden konnte, kann spekuliert werden, dass unter diesen Bedingungen Transkripte wie die VEGF-A-mRNA aufgrund der enthaltenen IRES-Elemente verstärkt translatiert werden. Obwohl die eIF2 α -Phosphorylierung generell sowohl die cap-abhängige, als auch die IRES-abhängige Translation inhibiert, wurden neben diversen viralen RNAs auch zelluläre Transkripte identifiziert, deren Translation diesem Mechanismus gegenüber unempfindlich ist (Braunstein *et al.* 2007, Ramirez-Valle *et al.* 2008, Silvera *et al.* 2009a, Silvera *et al.* 2009b, Thakor *et al.* 2012). Zu diesen Transkripten gehören z.B. die XIAP-mRNA (*X-linked inhibitor of apoptosis*), die p120-Catenin-mRNA und die VEGF-mRNA (Silvera *et al.* 2009a, Silvera *et al.* 2009b). Anhand von Studien, welche am Beispiel der XIAP-mRNA durchgeführt wurden, wird postuliert, dass die fortgesetzte IRES-

medierte Translation einiger zellulärer Transkripte bei Phosphorylierung von eIF2 α mittels eines Mechanismus erfolgt, welcher (ähnlich wie im Falle der HCV-RNA) durch eIF5B vermittelt wird (Pestova *et al.* 2008, Terenin *et al.* 2008, Thakor *et al.* 2012). In Analogie zur HCV-IRES, scheint auch die XIAP-IRES die korrekte Positionierung der ribosomalen Untereinheit in der Nähe des AUG-Startcodons zu vermitteln, sodass der *scanning*-Prozess entfällt. Als Initiator-tRNA-bindendes Protein alternativ zum eIF2-Komplex fungiert eIF5B (Thakor *et al.* 2012) (Abbildung 4.3). Für verschiedene andere IRES-enhaltende zelluläre Transkripte wurde hingegen beschrieben, dass sie nicht über den postulierten eIF2 α -unabhängigen, eIF5B-vermittelten Mechanismus translatiert werden können [z.B. CIAP1 (*cellular inhibitor of apoptosis 1*), Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*)] (Thakor *et al.* 2012).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die HCV-induzierte Stabilisierung zellulärer mRNAs keinen für die VEGF-A-mRNA spezifischen Effekt darstellt. Im Zuge der dazu durchgeführten Studien wurde der Einfluss der HCV-Replikation auf die Degradation mehrerer IRES-enhaltender zellulärer mRNAs untersucht. Dabei wiesen einige der Transkripte als Folge der HCV-Replikation (analog zur VEGF-A-mRNA) eine erhöhte Stabilität auf. Interessanterweise war eines dieser Transkripte die XIAP-mRNA. Die Degradation anderer Transkripte wurde hingegen nicht durch die HCV-Replikation beeinflusst (z.B. NRF: *NF- κ B repressing factor*, Cyr61: *cysteine-rich angiogenic inducer 61*, Pim1: *proto-oncogen serine/threonin-protein kinase*, Fr. Dipl. Biol. Winkler, Fr. M.Sc. Aniseh Poshtgohian Madi; Mikrobielle Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg). Da nicht alle IRES-haltigen mRNAs aufgrund der HCV-Replikation eine erhöhte Stabilität aufweisen, kann geschlossen werden, dass die HCV-induzierte Stabilisierung zellulärer mRNAs selektiv erfolgt. Die Grundlage dieser Spezifität ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen (siehe Kapitel 5). Dabei wird zunächst die Hypothese adressiert, ob (wie im Fall der VEGF-A- und der XIAP-mRNA) eine Korrelation zwischen der HCV-induzierten Stabilisierung der Transkripte und deren fortgesetzter Translation bei Phosphorylierung von eIF2 α besteht.

Die verstärkte Assoziation einer mRNA mit der zellulären Translationsmaschinerie könnte den Zugang RNA-degradierender Enzyme einschränken und somit erklären, warum aufgrund der HCV-Replikation ein größerer Anteil der hier untersuchten VEGF-A-mRNA vor Abbau geschützt ist. Es kann angenommen werden, dass die verstärkte Translation der VEGF-A-mRNA in einer erhöhten intrazellulären bzw. sekretierten VEGF-A-Proteinmenge resultiert. Dies steht in Übereinstimmung mit verschiedenen Publikationen, welche eine erhöhte VEGF-Expression unter dem Einfluss von HCV beschrieben (Abe *et al.* 2012, Hassan *et al.* 2009, Nasimuzzaman *et al.* 2007, Ripoli *et al.* 2010). Auch in den Studien von Fr. Dipl. Biol. Winkler konnte eine erhöhte VEGF-A-Protein-Menge im Kulturüberstand von transient und persistent mit dem HCV-Replikon transfizierten Huh7-Zellen demonstriert werden (¹). Es

muss jedoch beachtet werden, dass auch die Quantität der VEGF-A-mRNA in diesen Zellen erhöht ist, was entweder auf die erhöhte Stabilität der mRNA oder auf eine Transkriptionsinduktion zurückgeführt werden kann. Da anhand der durchgeführten Studien zwischen diesen Einflussfaktoren nicht diskriminiert werden kann, wird darauf verzichtet, diesen Aspekt zu diskutieren. Es ist durchaus denkbar, dass die beobachtete erhöhte VEGF-A-Proteinmenge aus einer Kombination all dieser Faktoren resultiert.

Ob ein Zusammenhang zwischen der Translation und der Stabilität einer mRNA besteht, ist derzeit noch nicht aufgeklärt. In den bisher durchgeführten Studien, welche eine mögliche Korrelation adressierten, konnten sowohl Transkripte identifiziert werden, deren Stabilität aufgrund aktiver Translation erhöht ist, als auch solche, deren Stabilität aufgrund der Translation verringert, oder unbeeinflusst ist (Kawai *et al.* 2004). So beschrieben Kawai *et al.*, dass die Inhibition der Translation verschiedener mRNAs eher einen negativen Einfluss auf deren Stabilität ausübt (Kawai *et al.* 2004). In Übereinstimmung damit, zeigten Aharon *et al.* und Curatola *et al.* am Beispiel des ARE des GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), dass die Translation von Transkripten, welche dieses ARE enthalten, deren rasche Degradation initiiert (Aharon *et al.* 1993, Curatola *et al.* 1995). ARE-Motive kommen in der 3'UTR zahlreicher zellulärer mRNAs vor und sind charakteristisch für instabile RNAs. Diese codieren häufig für Proteine, die in zentrale Prozesse wie Proliferation, Stressantwort und Immunantwort involviert sind. Über die kurze Halbwertszeit dieser Transkripte wird eine schnelle Reaktionsfähigkeit der Zelle auf veränderte Umweltbedingungen ermöglicht (von Roretz *et al.* 2011). Im Gegensatz zum ARE des GM-CSF hat die Translation von Transkripten, welche das ARE der c-fos-mRNA (*cellular FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*) enthalten, keinen Einfluss auf deren Stabilität (Koeller *et al.* 1991). Für andere mRNAs, z.B. die CAT-1- (*cationic amino acid transporter-1*), die GLUT-1- (*glucose transporter-1*) und die NEFM-mRNA (*neurofilament M*) konnte eine erhöhte Transkriptstabilität bei verstärkter Translation beobachtet werden (Antic *et al.* 1999, Aulak *et al.* 1999, Jain *et al.* 1997, Yaman *et al.* 2003). Kawai *et al.* postulierten, dass die wahrscheinlichste Ursache für diese unterschiedlichen Beobachtungen das Zusammenwirken verschiedener Komponenten darstellt, welche in Abhängigkeit verschiedener Faktoren wie Zelltyp, Umweltbedingungen, die beteiligten RBPs und die Transkriptsequenz in unterschiedlichen Einflüssen auf die mRNA-Stabilität resultieren (Kawai *et al.* 2004).

Ob ein Zusammenhang zwischen der HCV-induzierten Stabilisierung der VEGF-A-mRNA und der Translation dieses Transkripts besteht, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht aufgeklärt werden. Für die biologische Relevanz der HCV-induzierten Stabilisierung der VEGF-A-mRNA ist dies jedoch von entscheidender Bedeutung, weshalb dies einen Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen darstellt (siehe Kapitel 5).

4.4 Die Rolle von TIA-1 für die HCV-induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung

TIA-1 (spezifischer TIA-1vI) wurde in früheren Studien als essentieller Faktor für die HCV-induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung identifiziert (¹). TIA-1 ist ein RBP, welches in multiple zelluläre Prozesse wie mRNA-Spleißen, -Degradation und -Translation, sowie Metabolismus und Stress-Antwort involviert ist. Es besitzt drei N-terminale RRM (RNA recognition motifs) und eine C-terminale Glutamin/Asparagin-reiche PR-Domäne (*prion-related*). Die PR-Domäne ist charakterisiert durch ihre Fähigkeit zur Selbst-Oligomerisierung und vermittelt die Assemblierung der SGs (Kedersha *et al.* 1999, Tian *et al.* 1991) (siehe Kapitel 1.4). In humanen Zellen existieren zwei Isoformen von TIA-1, welche durch alternatives Spleißen generiert werden (Beck *et al.* 1996, Kawakami *et al.* 1994). Dabei ist ein in der kürzeren Isoform (TIA-1vI) vorkommendes Asparagin innerhalb der RRM2 in der kanonischen, längeren Isoform (TIA-1vII) durch ein 12 Aminosäuren umfassendes Insert ersetzt (Abbildung 4.4).

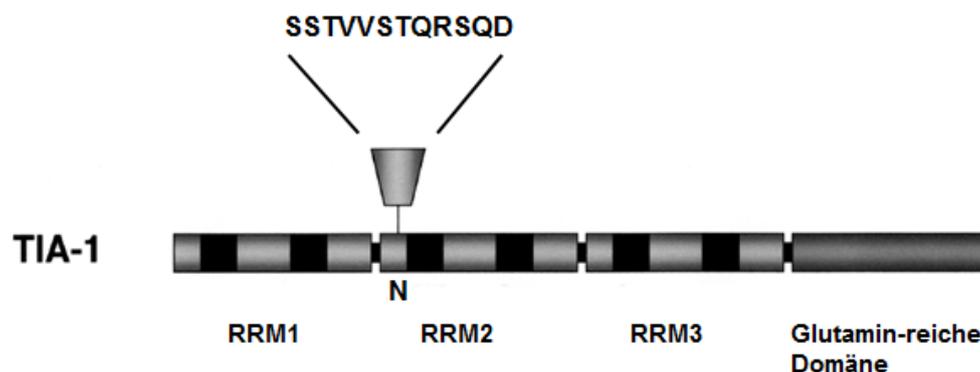


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des TIA-1-Proteins. TIA-1 enthält drei RRMS, sowie eine Glutamin-reiche Domäne. In humanen Zellen existieren zwei Isoformen von TIA-1. Die kanonische, längere Variante ist durch ein 12 Aminosäuren umfassendes Insert in der RRM2 charakterisiert, welches ein an dieser Stelle in der kürzeren Isoform lokalisiertes Asparagin ersetzt. Die Aminosäure-Sequenz dieses Inserts ist entsprechend des Aminosäurecodes angegeben. Abbildung modifiziert nach (Anderson *et al.* 2002).

Die RRM weisen unterschiedliche Bindespezifitäten für RNA auf. In *in vitro*-Studien konnte für das RRM1 keinerlei RNA-Bindung nachgewiesen werden. Während das RRM3 RNA ohne jede Sequenzspezifität zu binden scheint, bindet das RRM2 hingegen bevorzugt an Uridin-reiche Sequenzen (Dember *et al.* 1996). Uridin-reiche Sequenzen sind häufig Bestandteil von regulatorischen ARE-Motiven (vgl. Kapitel 4.3). Des Weiteren wurde eine gemeinsame Konsensus-Sequenz der von TIA-1 gebundenen Transkripte postuliert (Lopez de Silanes *et al.* 2005). Für die beiden in humanen Zellen existierenden Isoformen des TIA-1 wurden bereits unterschiedliche Bindungsspezifitäten und Funktionen vorgeschlagen (Forch *et al.* 2002, Izquierdo *et al.* 2007, Le Guiner *et al.* 2001). So beschrieben z.B. Izquierdo und Kollegen, dass TIA-1vII eine höhere Spleiß-Aktivität aufweist als TIA-1vI. In den meisten bisher

durchgeführten Studien wird jedoch nicht zwischen den beiden Isoformen des TIA-1 unterschieden.

Bei der Charakterisierung der Funktion von TIA-1 für die HCV-induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung erschien es zunächst plausibel, dass TIA-1 als RNA-bindendes Protein durch eine direkte Interaktion mit der VEGF-A-mRNA diese vor Degradation schützt. Dass die VEGF-A-mRNA von TIA-1 gebunden werden kann, ist bereits in anderen Studien beschrieben worden (Hamdollah Zadeh *et al.* 2015, Suswam *et al.* 2005). In Übereinstimmung damit konnte eine Interaktion von TIA-1 mit der VEGF-A-mRNA *in vitro* beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Hierzu wurden die beiden Isoformen TIA-1vI und TIA-1vII heterolog in *E. coli* exprimiert und chromatographisch gereinigt (PD Dr. Ralph Golbik und Fr. M.Sc. Aniseh Postgohian Madi, Mikrobielle Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg). Durch RNA-Protein-Interaktionsstudien mit beiden Isoformen und drei verschiedenen RNA-Substraten (humane VEGF-A-mRNA-5'UTR, humane VEGF-A-mRNA-3'UTR, Negativkontrolle: GFP-mRNA; siehe Kapitel 8.3) konnte gezeigt werden, dass beide TIA-1-Isoformen in der Lage sind, spezifisch an die VEGF-A-mRNA-UTRs (5'UTR und 3'UTR) zu binden. Eine abschließende Erklärung für die Beteiligung von TIA-1 an der HCV-induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung konnte über die *in vitro* RNA-Protein-Interaktionsstudien jedoch nicht ermittelt werden.

In früheren Studien konnte bereits ausgeschlossen werden, dass die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA von der Assemblierung von Stress Granula (siehe Kapitel 1.4) abhängig ist (¹). Dies steht in Übereinstimmung mit anderen Studien. Ursprünglich wurde angenommen, dass Stress Granula essentiell für die Inhibition der mRNA-Translation und entscheidend an der Regulation der mRNA-Degradation beteiligt sind. Neuere Befunde deuten jedoch darauf hin, dass die Regulation beider Prozesse weitgehend unabhängig von der Präsenz von Stress Granula ist (Bley *et al.* 2015, Mokas *et al.* 2009). Stattdessen scheint die Interaktion zellulärer Transkripte mit verschiedenen RBPs in Form von mRNPs (*messenger ribonucleoprotein*) für das weitere Schicksal der mRNAs von entscheidender Bedeutung zu sein (Bley *et al.* 2015). Diese mRNPs können sich dynamisch zwischen SGs, dem Cytoplasma und translatierenden Polysomen bewegen (Anderson *et al.* 2009, Bley *et al.* 2015, Kedersha *et al.* 2000, Kedersha *et al.* 2005).

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten weisen darauf hin, dass TIA-1 an der HCV-induzierten Transkriptionsinduktion von *IFN β* beteiligt ist (siehe Kapitel 3.4.2). Da die Beteiligung von TIA-1 an der viral induzierten *IFN β* -Transkription bisher nicht beschrieben wurde, repräsentiert dies einen neuen Befund. Im Kontext bereits publizierter Studien wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Rolle von TIA-1 bei der HCV-induzierten *IFN β* -Induktion durch NF- κ B vermittelt wird (siehe Kapitel 3.4.3). In den auf Grundlage dieser Hypothese durchgeführten

Studien wurde beobachtet, dass die transiente HCV-Replikation in einer verringerten cytoplasmatischen I κ B- α -Menge und einer erhöhten nukleären NF- κ B-Menge resultiert (siehe Kapitel 3.4.3). Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten, in welchen eine Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durch HCV beschrieben wurde (Gong *et al.* 2001, Kanda *et al.* 2006, Oem *et al.* 2008, Tai *et al.* 2000). Allerdings konnte im Gegensatz zu den Resultaten der vorliegenden Arbeit auch für WNV bereits eine NF- κ B-Aktivierung demonstriert werden (Cheng *et al.* 2004, Kesson *et al.* 2002, Kesson *et al.* 2001). Über die Ursache dieser unterschiedlichen Beobachtungen kann wie auch im Falle der IFN β -Induktion nur spekuliert werden. Die wahrscheinlichste Erklärung stellen Unterschiede der experimentellen Bedingungen dar (verwendete Zelllinie, Infektion oder Transfektion der Zellen mit WNV, Virusstamm). Da NF- κ B jedoch, wie bereits erwähnt, einen Transkriptionsfaktor von IFN β repräsentiert, ist es durchaus denkbar, dass eine Korrelation zwischen dem inaktiven NF- κ B-Signalweg und dem Fehlen der IFN β -Induktion bei transienter WNV-Replikation besteht (siehe Kapitel 3.3.2, 3.3.8.1). Des Weiteren ist anzumerken, dass die HCV-induzierten Veränderungen der cytoplasmatischen I κ B- α -Menge und der nukleären NF- κ B-Menge von eher geringem Ausmaß waren. Aufgrund des Synergie-Effektes, dem der IFN β -Promotor unterliegt, erscheint es jedoch plausibel, dass eine geringfügig erhöhte NF- κ B-Aktivität in einer überproportionalen Steigerung der IFN β -Transkription resultiert.

Für die HCV-induzierte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs erwies sich die PKR als entscheidend (siehe Kapitel 3.4.3). In Übereinstimmung damit wurde in verschiedenen Studien beschrieben, dass die PKR über einen von NF- κ B vermittelten Weg an der IFN β -Induktion beteiligt ist. Der Mechanismus, über den die PKR den NF- κ B-Signalweg beeinflusst, wird jedoch noch kontrovers diskutiert. So wurde zum einen beschrieben, dass die Kinase-Aktivität der PKR die NF- κ B-Aktivierung begünstigt, jedoch nicht essentiell für diese ist (Bonnet *et al.* 2000, Chu *et al.* 1999, Zamanian-Daryoush *et al.* 2000). Zum anderen existieren Studien, in welchen dargelegt wird, dass die PKR-abhängige NF- κ B-Aktivierung durch die Phosphorylierung der I κ B-Proteine vermittelt wird (Kumar *et al.* 1994). Eine entscheidende Rolle der PKR-Kinase-Aktivität wurde zudem in Publikationen postuliert, in denen der Einfluss der PKR auf den NF- κ B-Signalweg auf die PKR-induzierte Translations-Inhibition zurückgeführt wird. Dies resultiert als Folge einer verringerten cytoplasmatischen I κ B-Konzentration in einer gesteigerten Quantität an freiem NF- κ B (Deng *et al.* 2004, McAllister *et al.* 2012).

Neben PKR scheint auch TIA-1 an der HCV-induzierten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs beteiligt zu sein (siehe Kapitel 3.4.3). Dabei wäre es zum einen möglich, dass der Einfluss beider Proteine auf die NF- κ B-Aktivierung über unabhängige Signalwege vermittelt wird oder dass sie Komponenten derselben Signalkaskade repräsentieren. Durch Überexpressions-

studien konnte gezeigt werden, dass spezifisch die TIA-1vI-Isoform an der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs beteiligt ist (siehe Kapitel 3.4.3). Interessanterweise korrelierte die ÜE beider TIA-1-Isoformen in der persistenten HCV-Zelllinie mit einer erhöhten zellulären IFN β -Transkriptmenge (Referenz: unbehandelte Zellen der persistenten HCV-Zelllinie) (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt war jedoch bei ÜE der TIA-1vI-Isoform deutlich stärker ausgeprägt als bei ÜE der TIA-1vII-Isoform. Ob die durch ÜE der TIA1-Isoformen erhöhte IFN β -mRNA-Menge eine direkte Folge der NF- κ B-Aktivierung darstellt, wurde nicht überprüft. Eine Beteiligung von TIA-1 an der Regulation des NF- κ B-Signalwegs im Rahmen der antiviralen Immunantwort wurde bisher nicht beschrieben und repräsentiert somit eine neu identifizierte Funktion des TIA-1. In weiterführenden Studien könnte die Bedeutung von NF- κ B für die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung näher charakterisiert werden. So könnte die NF- κ B-Aktivierung z.B. mittels spezifischer Inhibitoren oder der Expression entsprechend mutierter I κ B- α -Varianten inhibiert werden (Gilmore *et al.* 2006, Jobin *et al.* 1998, Van Antwerp *et al.* 1996, Wang *et al.* 1996). Dabei wäre der Einfluss dieser Inhibition auf die VEGF-A-mRNA-Stabilität sowohl in Zellen, in denen das HCV-Replikon transient repliziert, als auch in der persistenten HCV-Zelllinie nach ÜE von TIA-1vI von Interesse.

TIA-1 ist bei transientser HCV-Replikation weder über eine Regulation der Gesamtmenge der I κ B- α -mRNA noch deren Degradation an der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs beteiligt (siehe Kapitel 3.4.3.1). Ein Einfluss von TIA-1 auf die I κ B- α -mRNA erschien zunächst plausibel, da die 3'UTR der humanen I κ B- α -mRNA drei Motive des Pentanukleotids AUUUA enthält, welches charakteristisch für die bereits erwähnten AREs ist, welche unter anderem von TIA-1 gebunden werden. Auch die Degradation von I κ B- α scheint nicht durch TIA-1 reguliert zu werden (siehe Kapitel 3.4.3.2). Es wurden jedoch Indikationen erhalten, dass TIA-1 bei transientser HCV-Replikation die I κ B- α -Translation inhibiert (siehe Kapitel 3.4.3.3). Dies steht in Übereinstimmung mit der für TIA-1 publizierten Funktion als Translations-Repressor (Avni *et al.* 1994, Cok *et al.* 2003, Damgaard *et al.* 2011, Kawai *et al.* 2006, Lopez de Silanes *et al.* 2005, Mazan-Mamczarz *et al.* 2006, Piecyk *et al.* 2000). In den meisten Studien wird die inhibitorische Wirkung von TIA-1 auf die Translation im Zusammenhang mit der Assemblierung von Stress Granula beschrieben (Anderson *et al.* 2002, Kedersha *et al.* 1999, Kedersha *et al.* 2000a, Kedersha *et al.* 2002b). Am Beispiel mehrerer ARE-enthaltender mRNAs [z.B.: *tumor necrosis factor- α* , *cyclooxygenase 2 (COX-2)*, *Cytochrom c*] wurde die Funktion von TIA-1 als spezifischer Translations-Repressor bereits untersucht (Cok *et al.* 2003, Kawai *et al.* 2006, Lopez de Silanes *et al.* 2005, Piecyk *et al.* 2000). An der Regulation der Translation der *Cytochrom c*-mRNA ist neben TIA-1 auch HuR beteiligt. Beide Proteine binden nicht-kompetitiv an unterschiedliche Bereiche der mRNA (auch in Abwesenheit von zellulärem

Stress). Während HuR die Translation der Cytochrom *c*-mRNA stimuliert, hat TIA1 eine inhibitorische Wirkung auf deren Translation (Kawai *et al.* 2006). Kawai *et al.* konnten zeigen, dass unter ER-Stress das Gleichgewicht der antagonistischen Wirkung von TIA-1 und HuR auf die Translation der Cytochrom *c*-mRNA beeinflusst wird. So ist die Interaktion von HuR mit der Cytochrom *c*-mRNA unter ER-Stress reduziert, während die Bindung von TIA-1 an die Cytochrom *c*-mRNA durch ER-Stress nicht beeinflusst wird. Dadurch überwiegt die Translations-reprimierende Wirkung des TIA-1 auf die Cytochrom *c*-mRNA. Es wurde ebenfalls bereits spekuliert, dass TIA-1 auch unabhängig von Stress als Translations-Inhibitor fungieren kann (Lopez de Silanes *et al.* 2005). Der molekulare Mechanismus dieser Translations-Inhibition ist jedoch noch unbekannt.

Eine Beteiligung von TIA-1 an der Regulation der I κ B- α -Translation wurde nur unter dem Einfluss der HCV-Replikation nachgewiesen (siehe Kapitel 3.4.3.3). In weiterführenden Studien soll untersucht werden, ob TIA-1 auch unter anderen zellulären Stress-Bedingungen einen Einfluss auf I κ B- α -Translation ausübt. Des Weiteren ist von Interesse, ob die beobachtete Translations-Inhibition einen für die I κ B- α -mRNA spezifischen Effekt darstellt, oder auf die generelle HCV-induzierte Inhibition der zellulären Translation zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck sollen Reporter-Konstrukte generiert werden, in welchen der regulatorische Einfluss der UTRs verschiedener zellulärer RNAs untersucht werden kann. Dabei erscheinen Aspekte wie der Einfluss von IRES-Elementen und ARE-Motiven in den jeweiligen UTRs auf die Translation von besonderem Interesse.

4.5 Die Regulation der VEGF-A-Expression

Den zentralen Gegenstand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen stellte die Degradation der VEGF-A-mRNA dar. Es erwies sich als entscheidend, ob bei der Berechnung der VEGF-A-mRNA-Halbwertszeit eine vollständige oder eine unvollständige Degradation der VEGF-A-mRNA zu Grunde gelegt wird. In vorangegangenen Studien, welche den Einfluss von Hypoxie auf die VEGF-A-mRNA-Degradation untersuchten, wurde die Halbwertszeit unter der Annahme einer vollständigen Degradation ermittelt (Dibbens *et al.* 1999, Ikeda *et al.* 1995, Levy *et al.* 1996, Stein *et al.* 1995, von Marschall *et al.* 2001). Die entsprechend dieses Berechnungsmodells ermittelte Halbwertszeit der VEGF-A-mRNA in naiven Huh7-Zellen steht in Übereinstimmung mit den Resultaten anderer Studien mit humanen Hepatom-Zelllinien (ca. 120 min) (von Marschall *et al.* 2001). Gemäß diesem Modell erhöhte die transiente HCV-Replikation in Huh7-Zellen die VEGF-A-mRNA-Halbwertszeit etwa um den Faktor 2 (im Vergleich zu naiven Huh7-Zellen) (siehe Kapitel 3.2). Es wurden zudem weitere virale RNAs identifiziert, welche eine analoge Erhöhung der VEGF-A-mRNA-Halbwertszeit induzieren können (siehe Kapitel 4.1 und 8.4). Da jedoch beobachtet wurde,

dass die VEGF-A-mRNA unter den gewählten experimentellen Bedingungen keiner vollständigen Degradation unterliegt, wird die Berechnung der VEGF-A-mRNA-Halbwertszeit unter Beachtung der unvollständigen Degradation präferiert. Entsprechend dieses Modells beeinflusst die HCV-Replikation nicht die Halbwertszeit der VEGF-A-mRNA, sondern reduziert offenbar den Anteil der VEGF-A-mRNA, welcher degradiert werden kann.

Die VEGF-A-Expression ist unter dem Einfluss von Hypoxie bereits eingehend untersucht worden. Die humane VEGF-A-mRNA wird von einer ca. 1000 nt langen 5'UTR und einer ca. 2000 nt langen 3'UTR flankiert. Sowohl in den UTRs, als auch innerhalb des VEGF-A-mRNA-ORFs wurden RNA-Elemente identifiziert, welche die Stabilität der VEGF-A-mRNA regulieren. Zu den wohl wichtigsten dieser RNA-Elemente zählen mehrere AREs (*adenosine-uridine-rich element*), die 126 nt lange *hypoxia stability region* (HSR), sowie das VEGF *regulatory segment* (VRS), welche in der 3'UTR lokalisiert sind. Interessanterweise erfordert die Hypoxie-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA die Kooperation von RNA-Elementen aus allen drei Regionen der RNA (5'UTR, ORF, 3'UTR). Zu den bereits identifizierten VEGF-A-mRNA-stabilisierenden *trans*-agierenden Faktoren gehören hnRNP L (*heterogeneous ribonucleoprotein*) (Shih *et al.* 1999), HuR (Levy 1998), MDM2 (*murine double minute 2*) (Zhou *et al.* 2011), NF90 (*nuclear factor 90*) (Vumbaca *et al.* 2008) und PAIP2 (*poly(A) binding protein interacting protein 2*) (Onesto *et al.* 2004, Onesto *et al.* 2006). Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss einiger dieser Proteine auf die HCV-induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung untersucht. Zu diesem Zweck wurden hnRNP L, HuR, MDM2 und PAIP2 mittels spezifischer siRNAs depletiert und die Zellen anschließend mit dem HCV-Replikon transfiziert. Es konnte jedoch für keines der Proteine ein Einfluss auf die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.6 Modell der HCV-induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung

Anhand der erhaltenen Ergebnisse, wird folgendes Modell postuliert, um die HCV-induzierte Signalkaskade zu erklären, welche in der Stabilisierung der VEGF-A-mRNA resultiert:

Die intrazelluläre Präsenz der HCV-RNA wird über die cytoplasmatischen Sensor-Proteine RIG I und PKR detektiert. Dabei erfolgt die Aktivierung von RIG I wahrscheinlich aufgrund der bereits identifizierten PAMPs in der 5'- und 3'UTR der HCV-RNA (Hornung *et al.* 2006, Pichlmair *et al.* 2006, Schmidt *et al.* 2009, Schnell *et al.* 2012, Yoneyama *et al.* 2004). Es wird postuliert, dass außerdem die virale IRES als entscheidende molekulare Determinante der viral-induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung fungiert. Sie repräsentiert ein PAMP, welches die Aktivierung der PKR und die nachfolgende Phosphorylierung von eIF2 α induziert (Arnaud *et al.* 2011, Shimoike *et al.* 2009, Toroney *et al.* 2010). Im Gegensatz zu der tran-

sienten HCV-Replikation induzierte die WNV-Replikation unter den gewählten experimentellen Bedingungen weder die Phosphorylierung von PKR, noch die Phosphorylierung von eIF2 α . Die von PKR und RIG I ausgehende Signaltransduktionskette, welche über verschiedene Proteine vermittelt wird, konvergiert bei der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie IRF-3, IRF-7 und NF- κ B. Diese Transkriptionsfaktoren können die Transkription verschiedener Gene, wie z.B. des *IFN β* -Gens, induzieren. Die Aktivität der PKR, bzw. die von ihr ausgelöste Translations-Inhibition ist an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt. TIA-1 ν l, welches in früheren Arbeiten als essentieller Faktor für die HCV-induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung identifiziert wurde, beeinflusst vermutlich ebenfalls die Aktivierung von NF- κ B, entweder als bisher nicht identifizierte Komponente der PKR-vermittelten Signalkaskade oder in einem unabhängigen, parallel dazu verlaufenden Prozess. Dabei hat TIA-1, zumindest unter dem Einfluss der transienten HCV-Replikation, offenbar eine inhibitorische Wirkung auf die Translation von I κ B- α und ist somit auch in die Regulation der *IFN β* -Transkription involviert.

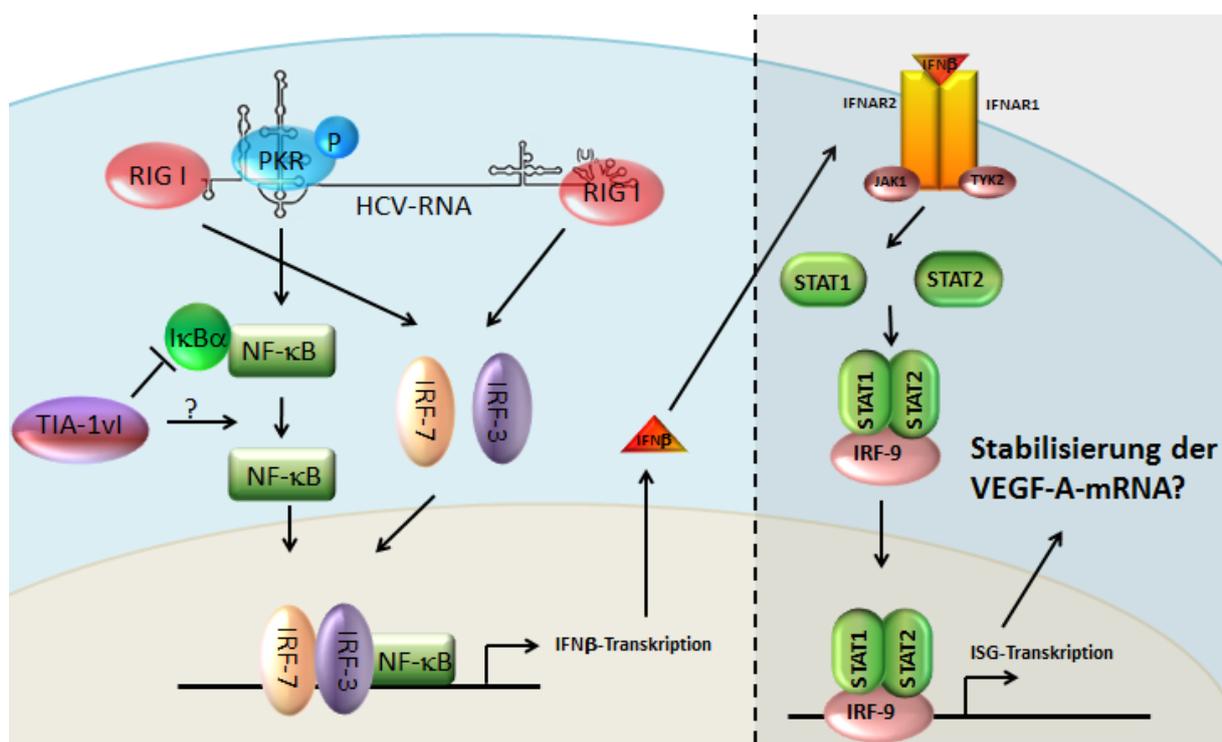


Abbildung 4.5: Modell der HCV-induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung. Die virale RNA wird von den Sensor-Proteinen PKR und RIG I erkannt, welche über weitere Proteine die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (IRF-3, IRF-7, NF- κ B) vermitteln. Die kürzere Isoform TIA-1 ν l ist offenbar in die PKR-vermittelte NF- κ B-Aktivierung involviert. NF- κ B bindet im Komplex mit weiteren Transkriptionsfaktoren an den Promotor des *IFN β* -Gens und induziert dessen Transkription. Sekretiertes IFN β bindet auf der Zelloberfläche an spezifische Rezeptoren und induziert die JAK/STAT-Signalkaskade, welche die Transkription hunderter verschiedener ISGs induzieren kann. Möglicherweise bewirkt eines dieser induzierten ISGs die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA. Alternativ könnte die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA auch eine direkte Folge der Translations-Inhibition darstellen.

Nach der Synthese und Sekretion von IFN β bindet dieses auf der Zelloberfläche an spezifische Rezeptoren (IFNAR) und induziert eine weitere Signalkaskade. Eine der ersten trans-

duzierenden Kinasen in dieser Kaskade stellt JAK1 dar, welche sich ebenfalls als essentiell für die HCV-induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung erwies. JAK1 ist an der Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren (u.a. STAT1, STAT2) beteiligt, welche die Transkription zahlreicher ISGs induzieren (im Komplex mit IRF-9). Ob einer der dabei induzierten Faktoren die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA bewirkt, konnte jedoch bisher nicht aufgeklärt werden. Es wäre ebenfalls denkbar, dass die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA eine direkte Folge der Translations-Inhibition darstellt.

5 Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Resultate indizieren, dass die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA eine Folge der zellulären antiviralen IFN β -Antwort darstellt. Um dies zu bestätigen, werden gegenwärtig Studien in transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Zellen durchgeführt, in denen mittels eines spezifischen anti-IFNAR-Antikörpers die vom Typ I-Interferon-Rezeptor ausgehende Signalkaskade inhibiert wird. Eine Abhängigkeit der HCV-induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung von der Funktionalität des IFNAR-Komplexes würde belegen, dass die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA über IFN β vermittelt wird und somit von diesem Interferon abhängig ist.

Der Fokus künftiger Untersuchungen sollte vor allem auf dem Einfluss von TIA-1 auf den NF- κ B-Signalweg liegen, da dieser bisher nicht beschrieben wurde. Dabei soll zum einen die Funktion von TIA-1 bei der Regulation der I κ B- α -Translation näher charakterisiert werden. Zum anderen sollen Studien in anderen Zelllinien und unter Verwendung alternativer Stimuli zur Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob die Beteiligung von TIA-1 an der NF- κ B-Aktivierung einen allgemeingültigen Mechanismus darstellt.

Von besonderem Interesse erscheint außerdem die Aufklärung des molekularen Mechanismus, welcher der Stabilisierung der VEGF-A-mRNA zu Grunde liegt. Zu diesem Zweck könnte zunächst untersucht werden, ob bestimmte Sequenzbereiche innerhalb der VEGF-A-mRNA existieren, welche für die HCV-induzierte Stabilisierung des Transkripts essentiell sind. Die Existenz von Sequenzmotiven, welche die Stabilität der VEGF-A-mRNA regulieren, wurde unter dem Einfluss von Hypoxie bereits beschrieben. Es wäre deshalb von Interesse, ob der Einfluss der HCV-Replikation auf die Stabilität der VEGF-A-mRNA über die gleichen oder andere Sequenzmotive vermittelt wird. Die Lokalisierung von für die HCV-induzierte Stabilisierung essentiellen Sequenzbereichen würde die Identifikation von putativen *in trans* agierenden Faktoren erleichtern.

Des Weiteren ist bereits bekannt, dass die HCV-induzierte mRNA-Stabilisierung nicht ausschließlich im Falle der VEGF-A-mRNA detektierbar ist, sondern auch bei anderen zellulären Transkripten. Mittels einer entsprechend konzipierten Microarray-Analyse wird gegenwärtig untersucht, welche zellulären mRNAs als Folge der transienten HCV-Replikation eine erhöhte Stabilität aufweisen und ob deren Stabilisierung ebenfalls von den als essentiell identifizierten Proteinen JAK1, PKR, RIG I und TIA-1 abhängig ist. Sollte dabei eine ausreichende Anzahl weiterer stabilisierter Transkripte identifiziert werden können, ermöglicht ein Vergleich der Nukleotid-Sequenzen, Sekundärstrukturen und/oder anderer Charakteristika dieser mRNAs möglicherweise die Definition eines entscheidenden Merkmals, welches für die HCV-

induzierte Stabilisierung dieser Transkripte essentiell ist. Von besonderem Interesse erscheint zudem, ob eine Korrelation zwischen der HCV-induzierten Stabilisierung zellulärer Transkripte und deren fortgesetzter Translation unter Phosphorylierung von eIF2 α besteht (eIF5B-vermittelt). Zu diesem Zweck soll die Translation solcher Transkripte untersucht werden, deren Degradation von der HCV-Replikation beeinflusst wird. Auch die Bedeutung von eIF5B für die HCV-induzierte Stabilisierung zellulärer Transkripte soll in künftigen Studien analysiert werden. Gegenwärtig wird u.a. die Translation der VEGF-A-mRNA mittels Polysomen-Analyse näher charakterisiert. Dabei sind sowohl der Einfluss der HCV-Replikation, als auch die Rolle von TIA-1 von Interesse.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit stellt eine Fortsetzung der von Fr. Dipl. Biol. Winkler (Mikrobielle Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführten Studien dar. In diesen konnte erstmals demonstriert werden, dass die Replikation des HCV-Replikons JFH1 die Degradation der zellulären VEGF-A-mRNA inhibiert. Des Weiteren identifizierte Fr. Dipl. Biol. Winkler das RNA-bindende Proteine TIA-1 als essentiellen Faktor für die HCV-induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA. Von besonderer Bedeutung war zudem der von ihr erbrachte Nachweis, dass diese mRNA-Stabilisierung unabhängig von der Formierung von Stress Granula ist (¹). Die zu Grunde liegenden Mechanismen, welche zur Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung führen, sowie die daran beteiligten zellulären und viralen Komponenten konnten jedoch nicht aufgeklärt werden. Des Weiteren konnte die Funktion von TIA-1 bei der HCV-induzierten VEGF-A-mRNA Stabilisierung nicht bestimmt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die aufgrund der HCV-Replikation induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung weiter charakterisiert und die viralen und zellulären molekularen Determinanten identifiziert, welche diese vermitteln. Die wesentlichen erzielten Resultate sollen im Folgenden zusammengefasst werden.

1. Die transiente HCV-Replikation in Huh7-Zellen erhöht nicht die Halbwertszeit der VEGF-A-mRNA (d.h. sie verringert nicht die Degradationsgeschwindigkeit), sondern reduziert den Anteil dieser zellulären mRNA, welcher der Degradation zugänglich ist.
2. Die entscheidende virale Determinante der HCV-induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung repräsentiert die virale RNA selbst, nicht die von ihr codierten Proteine.
3. Innerhalb der HCV-RNA konnte die in der 5'UTR lokalisierte IRES als essentielle Determinante für die Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung identifiziert werden. So induzierte die simultane Transfektion des WNV-Replikons mit der vollständigen HCV-IRES die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung.
4. Die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA stellt keinen HCV-spezifischen Effekt dar, sondern kann auch aufgrund der Replikation des nahe mit dem HCV-Replikon verwandten BVDV-Replikons induziert werden.
5. Die viral induzierte Stabilisierung der VEGF-A-mRNA stellt keinen Zelltyp-spezifischen Effekt dar, sondern konnte in mehreren verschiedenen Zelllinien (Huh7, HeLa, Hek293T-RExTM) beobachtet werden.
6. Durch RNAi-Experimente konnten die zellulären Sensor-Proteine PKR und RIG I als essentielle Komponenten für die HCV-induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung identifiziert werden. Zusätzlich konnte die Bedeutung von RIG I durch Studien in der

Huh7.5-Zelllinie (RIG I nicht funktional) bestätigt werden. Die transiente HCV-Replikation hatte in Huh7.5-Zellen keinen Einfluss auf die Degradation der VEGF-A-mRNA.

7. Die Aktivierung der PKR, bzw. die resultierende Phosphorylierung von eIF2 α , welche zur Inhibition der Translation führt, sind an der viral induzierten VEGF-A-mRNA-Stabilisierung beteiligt.
 - a. Die transiente Transfektion der Huh7-Zellen mit den Replikons des HCV und des BVDV, sowie deren replikationsdefizienten Derivaten (HCV-mut, BVDV-mut) induziert die Phosphorylierung der PKR, sowie ihres Substrates eIF2 α zum Zeitpunkt 12 h *p.t.*. Eine Phosphorylierung dieser beiden Proteine zum Zeitpunkt der maximalen viralen Replikation konnte nur bei transientser Replikation des HCV- bzw. BVDV-Replikons nachgewiesen werden. Dies korrelierte mit einer erhöhten VEGF-A-mRNA-Stabilität. Die transiente Transfektion mit den cap-abhängig translatierten WNV-, WNV-mut- und Sindbis-Replikons resultierte weder in der Aktivierung der PKR, noch in einer erhöhten Stabilität der VEGF-A-mRNA.
 - b. Die simultane Transfektion von Huh7-Zellen mit dem WNV-Replikon und der vollständigen HCV-IRES führte ebenfalls zur Phosphorylierung von PKR und eIF2 α (zum Zeitpunkt 12 h *p.t.*) und der Stabilisierung der VEGF-A-mRNA.
 - c. Auch bei einer alternativen Induktion der eIF2 α -Phosphorylierung durch Tunicamycin konnte bei transientser Replikation des WNV-Replikons die Stabilität der VEGF-A-mRNA erhöht werden. Die eIF2 α -Phosphorylierung scheint zu frühen Zeitpunkten der viralen Replikation von besonderer Bedeutung für die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung zu sein.
 - d. Durch Behandlung der persistent mit dem HCV-Replikon transfizierten Zelllinie mit Tunicamycin konnte die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung innerhalb einer bestimmten Zeitspanne rekonstituiert werden.
 - e. Die ÜE der konstitutiv aktiven Varianten von PKR und eIF2 α (PKR-Kinase-Domäne, eIF2 α S51D), nicht jedoch die der Wildtyp-Varianten, induziert in der persistenten HCV-Zelllinie die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA.
8. Die Phosphorylierung von eIF2 α ist nicht hinreichend zur Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung. So resultierte weder die Behandlung mit Tunicamycin, noch die ÜE der konstitutiv aktiven Varianten von PKR und eIF2 α in Huh7-Zellen in einer erhöhten Stabilität der VEGF-A-mRNA. Zur Induktion der VEGF-A-mRNA-Stabilisierung scheint zusätzlich die Replikation einer viralen RNA essentiell zu sein.

-
9. Die VEGF-A-mRNA-Stabilisierung steht in Zusammenhang mit der antiviral wirkenden IFN β -Antwort, welche durch die Sensor-Proteine PKR und RIG I induziert wird.
- Die transiente HCV-Replikation resultiert in Huh7-Zellen in einer erhöhten IFN β -Transkriptmenge.
 - Die ÜE von IFN β induziert eine erhöhte VEGF-A-mRNA-Stabilität in Huh7-Zellen und der persistenten HCV-Zelllinie und kann somit die Stabilisierung dieser mRNA unabhängig von einer viralen Replikation induzieren. Die Funktion der Replikation der viralen RNA für die Stabilisierung der VEGF-A-mRNA könnte somit in der IFN β -Induktion liegen.
 - Die HCV-induzierte VEGF-A-mRNA-Stabilisierung ist abhängig von JAK1, welche als Signal-transduzierende Kinase am Typ I-Interferon-Rezeptor IFNAR agiert.
10. Als neu identifizierte Funktion von TIA-1 konnte eine Beteiligung an der NF- κ B-vermittelten Induktion von IFN β demonstriert werden.
- Die transiente HCV-Replikation, nicht jedoch die WNV-Replikation aktiviert den NF- κ B-Signalweg.
 - In PKR- bzw. TIA-1-depletierten Huh7-Zellen kann der NF- κ B-Signalweg nicht durch die HCV-Replikation aktiviert werden.
 - Die ÜE der kürzeren TIA-1-Isoform (TIA-1vI) in der persistenten HCV-Zelllinie aktiviert ebenfalls den NF- κ B-Signalweg, nicht jedoch die der längeren Isoform TIA-1vII.
 - In RNAi-Studien wurde beobachtet, dass TIA-1 weder einen Einfluss auf die zelluläre I κ B- α -mRNA-Menge und -Stabilität, noch auf die Degradation von I κ B- α hat. Unter Verwendung von Luciferase-Reporter-Konstrukten konnte jedoch gezeigt werden, dass TIA-1 bei transienter HCV-Replikation einen Einfluss auf die I κ B- α -Translation ausübt.

7 Literaturverzeichnis

(¹) **Winkler, E.** Einfluss der RNA-Replikation des Hepatitis-C-Virus auf die zelluläre Genexpression des *vascular-endothelial growth-factors*. A. mikrobielle Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle (Saale). Voraussichtliche Einreichung 2015

Abe, M., Koga, H., Yoshida, T., Masuda, H., Iwamoto, H., Sakata, M., Hanada, S., Nakamura, T., Taniguchi, E., Kawaguchi, T., Yano, H., Torimura, T., Ueno, T. and Sata, M. (2012). Hepatitis C virus core protein upregulates the expression of vascular endothelial growth factor via the nuclear factor-kappaB/hypoxia-inducible factor-1alpha axis under hypoxic conditions. *Hepatol Res* 42(6): 591-600.

Adler, B., Adler, H., Pfister, H., Jungi, T. W. and Peterhans, E. (1997). Macrophages infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus release a factor(s) capable of priming uninfected macrophages for activation-induced apoptosis. *J Virol* 71(4): 3255-3258.

Aharon, T. and Schneider, R. J. (1993). Selective destabilization of short-lived mRNAs with the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor AU-rich 3' noncoding region is mediated by a cotranslational mechanism. *Mol Cell Biol* 13(3): 1971-1980.

Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4): 783-801.

Akiri, G., Nahari, D., Finkelstein, Y., Le, S. Y., Elroy-Stein, O. and Levi, B. Z. (1998). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene* 17(2): 227-236.

Allison, S. L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W., Kunz, C. and Heinz, F. X. (1995). Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol* 69(2): 695-700.

Anderson, P. and Kedersha, N. (2002). Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* 7(2): 213-221.

Anderson, P. and Kedersha, N. (2009). RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(6): 430-436.

Antic, D., Lu, N. and Keene, J. D. (1999). ELAV tumor antigen, Hel-N1, increases translation of neurofilament M mRNA and induces formation of neurites in human teratocarcinoma cells. *Genes Dev* 13(4): 449-461.

Arcondeguy, T., Lacazette, E., Millevoi, S., Prats, H. and Touriol, C. (2013). VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Res* 41(17): 7997-8010.

Arnaud, N., Dabo, S., Akazawa, D., Fukasawa, M., Shinkai-Ouchi, F., Hugon, J., Wakita, T. and Meurs, E. F. (2011). Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog* 7(10): e1002289.

Arnaud, N., Dabo, S., Maillard, P., Budkowska, A., Kalliampakou, K. I., Mavromara, P., Garcin, D., Hugon, J., Gagnon, A., Akazawa, D., Wakita, T. and Meurs, E. F. (2010). Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. *PLoS One* 5(5): e10575.

Aulak, K. S., Mishra, R., Zhou, L., Hyatt, S. L., de Jonge, W., Lamers, W., Snider, M. and Hatzoglou, M. (1999). Post-transcriptional regulation of the arginine transporter Cat-1 by amino acid availability. *J Biol Chem* 274(43): 30424-30432.

Avni, D., Shama, S., Loreni, F. and Meyuhas, O. (1994). Vertebrate mRNAs with a 5'-terminal pyrimidine tract are candidates for translational repression in quiescent cells: characterization of the translational cis-regulatory element. *Mol Cell Biol* 14(6): 3822-3833.

Baginski, S. G., Pevear, D. C., Seipel, M., Sun, S. C., Benetatos, C. A., Chunduru, S. K., Rice, C. M. and Collett, M. S. (2000). Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 7981-7986.

- Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J. and Jacobsen, H.** (1993). Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol* 67(7): 3835-3844.
- Bartenschlager, R. and Lohmann, V.** (2000). Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 14(2): 241-254.
- Bartenschlager, R., Lohmann, V., Wilkinson, T. and Koch, J. O.** (1995). Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J Virol* 69(12): 7519-7528.
- Basu, A., Beyene, A., Meyer, K. and Ray, R.** (2004). The hypervariable region 1 of the E2 glycoprotein of hepatitis C virus binds to glycosaminoglycans, but this binding does not lead to infection in a pseudotype system. *J Virol* 78(9): 4478-4486.
- Bates, D. O., Cui, T. G., Doughty, J. M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J. D., Peat, D., Gillatt, D. and Harper, S. J.** (2002). VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 62(14): 4123-4131.
- Beck, A. R., Medley, Q. G., O'Brien, S., Anderson, P. and Streuli, M.** (1996). Structure, tissue distribution and genomic organization of the murine RRM-type RNA binding proteins TIA-1 and TIAR. *Nucleic Acids Res* 24(19): 3829-3835.
- Behrens, S. E., Grassmann, C. W., Thiel, H. J., Meyers, G. and Tautz, N.** (1998). Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol* 72(3): 2364-2372.
- Behrens, S. E., Tomei, L. and De Francesco, R.** (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 15(1): 12-22.
- Benali-Furet, N. L., Chami, M., Houel, L., De Giorgi, F., Vernejoul, F., Lagorce, D., Buscail, L., Bartenschlager, R., Ichas, F., Rizzuto, R. and Paterlini-Brechot, P.** (2005). Hepatitis C virus core triggers apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. *Oncogene* 24(31): 4921-4933.
- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Bartosch, B., Cosset, F. L., Lavillette, D., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Valenzuela-Fernandez, A., Aldabe, R., Lopez-Cabrera, M. and Majano, P. L.** (2009). The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol* 83(16): 8012-8020.
- Bevilacqua, P. C. and Cech, T. R.** (1996). Minor-groove recognition of double-stranded RNA by the double-stranded RNA-binding domain from the RNA-activated protein kinase PKR. *Biochemistry* 35(31): 9983-9994.
- Bielefeldt-Ohmann, H., Smirnova, N. P., Tolnay, A. E., Webb, B. T., Antoniazzi, A. Q., van Campen, H. and Hansen, T. R.** (2012). Neuro-invasion by a 'Trojan Horse' strategy and vasculopathy during intrauterine flavivirus infection. *Int J Exp Pathol* 93(1): 24-33.
- Bigger, C. B., Brasky, K. M. and Lanford, R. E.** (2001). DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 75(15): 7059-7066.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. and Rouille, Y.** (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80(14): 6964-6972.
- Bley, N., Lederer, M., Pfalz, B., Reinke, C., Fuchs, T., Glass, M., Moller, B. and Huttelmaier, S.** (2015). Stress granules are dispensable for mRNA stabilization during cellular stress. *Nucleic Acids Res* 43(4): e26.
- Blight, K. J., McKeating, J. A. and Rice, C. M.** (2002). Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 76(24): 13001-13014.
- Bluyssen, A. R., Durbin, J. E. and Levy, D. E.** (1996). ISGF3 gamma p48, a specificity switch for interferon activated transcription factors. *Cytokine Growth Factor Rev* 7(1): 11-17.
- Bonnet, M. C., Weil, R., Dam, E., Hovanessian, A. G. and Meurs, E. F.** (2000). PKR stimulates NF-kappaB irrespective of its kinase function by interacting with the I kappa B kinase complex. *Mol Cell Biol* 20(13): 4532-4542.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

- Braunstein, S., Karpisheva, K., Pola, C., Goldberg, J., Hochman, T., Yee, H., Cangiarella, J., Arju, R., Formenti, S. C. and Schneider, R. J.** (2007). A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Mol Cell* 28(3): 501-512.
- Brockman, J. A., Scherer, D. C., McKinsey, T. A., Hall, S. M., Qi, X., Lee, W. Y. and Ballard, D. W.** (1995). Coupling of a signal response domain in I kappa B alpha to multiple pathways for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* 15(5): 2809-2818.
- Brown, E. A., Zhang, H., Ping, L. H. and Lemon, S. M.** (1992). Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res* 20(19): 5041-5045.
- Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G. and Siebenlist, U.** (1995). Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 267(5203): 1485-1488.
- Brown, L. F., Yeo, K. T., Berse, B., Yeo, T. K., Senger, D. R., Dvorak, H. F. and van de Water, L.** (1992). Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 176(5): 1375-1379.
- Buchan, J. R. and Parker, R.** (2009). Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* 36(6): 932-941.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G. and Ron, D.** (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415(6867): 92-96.
- Calisher, C. H. and Gould, E. A.** (2003). Taxonomy of the virus family Flaviviridae. *Adv Virus Res* 59: 1-19.
- Carmeliet, P.** (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3: 4-10.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. and Nagy, A.** (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380(6573): 435-439.
- Charleston, B., Fray, M. D., Baigent, S., Carr, B. V. and Morrison, W. I.** (2001). Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J Gen Virol* 82(Pt 8): 1893-1897.
- Cheng, Y., King, N. J. and Kesson, A. M.** (2004). Major histocompatibility complex class I (MHC-I) induction by West Nile virus: involvement of 2 signaling pathways in MHC-I up-regulation. *J Infect Dis* 189(4): 658-668.
- Chu, W. M., Ostertag, D., Li, Z. W., Chang, L., Chen, Y., Hu, Y., Williams, B., Perrault, J. and Karin, M.** (1999). JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* 11(6): 721-731.
- Cinatl, J., Jr., Michaelis, M., Fleckenstein, C., Bauer, G., Kabickova, H., Scholz, M., Rabenau, H. F. and Doerr, H. W.** (2006). West Nile virus infection induces interferon signalling in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(2): 645-651.
- Claffey, K. P., Shih, S. C., Mullen, A., Dziennis, S., Cusick, J. L., Abrams, K. R., Lee, S. W. and Detmar, M.** (1998). Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. *Mol Biol Cell* 9(2): 469-481.
- Clemens, M. J. and Elia, A.** (1997). The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res* 17(9): 503-524.
- Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L. W., Neufeld, G. and Levi, B. Z.** (1996). Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271(2): 736-741.
- Cok, S. J., Acton, S. J. and Morrison, A. R.** (2003). The proximal region of the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 is recognized by a multimeric protein complex containing HuR, TIA-1, TIAR, and the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U. *J Biol Chem* 278(38): 36157-36162.
- Cole, J. L.** (2007). Activation of PKR: an open and shut case? *Trends Biochem Sci* 32(2): 57-62.

- Coles, L. S., Bartley, M. A., Bert, A., Hunter, J., Polyak, S., Diamond, P., Vadas, M. A. and Goodall, G. J.** (2004). A multi-protein complex containing cold shock domain (Y-box) and polypyrimidine tract binding proteins forms on the vascular endothelial growth factor mRNA. Potential role in mRNA stabilization. *Eur J Biochem* 271(3): 648-660.
- Connor, J. H., Weiser, D. C., Li, S., Hallenbeck, J. M. and Shenolikar, S.** (2001). Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Mol Cell Biol* 21(20): 6841-6850.
- Courtney, S. C., Scherbik, S. V., Stockman, B. M. and Brinton, M. A.** (2012). West Nile virus infections suppress early viral RNA synthesis and avoid inducing the cell stress granule response. *J Virol* 86(7): 3647-3657.
- Cuddihy, A. R., Li, S., Tam, N. W., Wong, A. H., Taya, Y., Abraham, N., Bell, J. C. and Koromilas, A. E.** (1999). Double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR enhances transcriptional activation by tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol* 19(4): 2475-2484.
- Curatola, A. M., Nadal, M. S. and Schneider, R. J.** (1995). Rapid degradation of AU-rich element (ARE) mRNAs is activated by ribosome transit and blocked by secondary structure at any position 5' to the ARE. *Mol Cell Biol* 15(11): 6331-6340.
- Damgaard, C. K. and Lykke-Andersen, J.** (2011). Translational coregulation of 5'TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes Dev* 25(19): 2057-2068.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. and Stark, G. R.** (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264(5164): 1415-1421.
- de Veer, M. J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J. M., Silverman, R. H. and Williams, B. R.** (2001). Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* 69(6): 912-920.
- De Vries, S.** (2014). Identifizierung und Charakterisierung von VEGF-mRNA-bindenden Proteinen und ihr Einfluss auf die Translation der VEGF-mRNA in MCF-7-Zellen unter Hypoxie. Halle (Saale).
- de Weerd, N. A., Samarajiwa, S. A. and Hertzog, P. J.** (2007). Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem* 282(28): 20053-20057.
- Delcombel, R., Janssen, L., Vassy, R., Gammons, M., Haddad, O., Richard, B., Letourneur, D., Bates, D., Hendricks, C., Waltenberger, J., Starzec, A., Sounni, N. E., Noel, A., Deroanne, C., Lambert, C. and Colige, A.** (2013). New prospects in the roles of the C-terminal domains of VEGF-A and their cooperation for ligand binding, cellular signaling and vessels formation. *Angiogenesis* 16(2): 353-371.
- Dember, L. M., Kim, N. D., Liu, K. Q. and Anderson, P.** (1996). Individual RNA recognition motifs of TIA-1 and TIAR have different RNA binding specificities. *J Biol Chem* 271(5): 2783-2788.
- den Boon, J. A. and Ahlquist, P.** (2010a). Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu Rev Microbiol* 64: 241-256.
- den Boon, J. A., Diaz, A. and Ahlquist, P.** (2010b). Cytoplasmic viral replication complexes. *Cell Host Microbe* 8(1): 77-85.
- Deng, J., Lu, P. D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Sonenberg, N., Harding, H. P. and Ron, D.** (2004). Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 24(23): 10161-10168.
- Der, S. D., Yang, Y. L., Weissmann, C. and Williams, B. R.** (1997). A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7): 3279-3283.
- Dias, S., Shmelkov, S. V., Lam, G. and Rafii, S.** (2002). VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition. *Blood* 99(7): 2532-2540.
- Dibbens, J. A., Miller, D. L., Damert, A., Risau, W., Vadas, M. A. and Goodall, G. J.** (1999). Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation of multiple RNA elements. *Mol Biol Cell* 10(4): 907-919.

- Diebold, S. S., Montoya, M., Unger, H., Alexopoulou, L., Roy, P., Haswell, L. E., Al-Shamkhani, A., Flavell, R., Borrow, P. and Reis e Sousa, C.** (2003). Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* 424(6946): 324-328.
- Dolecki, G. J. and Connolly, D. T.** (1991). Effects of a variety of cytokines and inducing agents on vascular permeability factor mRNA levels in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 180(2): 572-578.
- Domanski, P., Fish, E., Nadeau, O. W., Witte, M., Plataniias, L. C., Yan, H., Krolewski, J., Pitha, P. and Colamonici, O. R.** (1997). A region of the beta subunit of the interferon alpha receptor different from box 1 interacts with Jak1 and is sufficient to activate the Jak-Stat pathway and induce an antiviral state. *J Biol Chem* 272(42): 26388-26393.
- Domingo, E., Martinez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J. C., Portela, A., Ortin, J., Lopez-Galindez, C., Perez-Brena, P., Villanueva, N., Najera, R. and et al.** (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene* 40(1): 1-8.
- Eckart, M. R., Selby, M., Masiarz, F., Lee, C., Berger, K., Crawford, K., Kuo, C., Kuo, G., Houghton, M. and Choo, Q. L.** (1993). The hepatitis C virus encodes a serine protease involved in processing of the putative nonstructural proteins from the viral polyprotein precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 192(2): 399-406.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. and Bienz, K.** (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76(12): 5974-5984.
- Egyhazi, E.** (1974). A tentative initiation inhibitor of chromosomal heterogeneous RNA synthesis. *J Mol Biol* 84(1): 173-183.
- Egyhazi, E.** (1976). Initiation inhibition and reinitiation of the synthesis of heterogenous nuclear RNA in living cells. *Nature* 262(5566): 319-321.
- El-Hage, N. and Luo, G.** (2003). Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. *J Gen Virol* 84(Pt 10): 2761-2769.
- Elbahesh, H., Scherbik, S. V. and Brinton, M. A.** (2011). West Nile virus infection does not induce PKR activation in rodent cells. *Virology* 421(1): 51-60.
- Ellis, L. M. and Hicklin, D. J.** (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 8(8): 579-591.
- Errett, J. S., Suthar, M. S., McMillan, A., Diamond, M. S. and Gale, M., Jr.** (2013). The essential, nonredundant roles of RIG-I and MDA5 in detecting and controlling West Nile virus infection. *J Virol* 87(21): 11416-11425.
- Favre, D., Studer, E. and Michel, M. R.** (1996). Semliki Forest virus capsid protein inhibits the initiation of translation by upregulating the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR). *Biosci Rep* 16(6): 485-511.
- Ferrara, N. and Bunting, S.** (1996). Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5(1): 35-44.
- Flint, S. J. E., L.W. ; Racaniello, V.R. ;Skalka, A.M.** (2009). Principles of Virology. Washington, ASM Press.
- Forch, P., Puig, O., Martinez, C., Seraphin, B. and Valcarcel, J.** (2002). The splicing regulator TIA-1 interacts with U1-C to promote U1 snRNP recruitment to 5' splice sites. *EMBO J* 21(24): 6882-6892.
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D. and Semenza, G. L.** (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16(9): 4604-4613.
- Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Ikeda, M., Lemon, S. M. and Gale, M., Jr.** (2003). Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 300(5622): 1145-1148.
- Fredericksen, B. L. and Gale, M., Jr.** (2006). West Nile virus evades activation of interferon regulatory factor 3 through RIG-I-dependent and -independent pathways without antagonizing host defense signaling. *J Virol* 80(6): 2913-2923.
- Fredericksen, B. L., Keller, B. C., Fornek, J., Katze, M. G. and Gale, M., Jr.** (2008). Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. *J Virol* 82(2): 609-616.

- Fredericksen, B. L., Smith, M., Katze, M. G., Shi, P. Y. and Gale, M., Jr.** (2004). The host response to West Nile Virus infection limits viral spread through the activation of the interferon regulatory factor 3 pathway. *J Virol* 78(14): 7737-7747.
- Frese, M., Pietschmann, T., Moradpour, D., Haller, O. and Bartenschlager, R.** (2001). Interferon-alpha inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway. *J Gen Virol* 82(Pt 4): 723-733.
- Friedrich, S.** (2014). Untersuchungen zur Funktion zellulärer RNA-Bindeproteine in der RNA-Replikation des West-Nil-Virus. m. B. Martin-Luther-Universität. Halle(Saale).
- Frolov, I. and Schlesinger, S.** (1994). Comparison of the effects of Sindbis virus and Sindbis virus replicons on host cell protein synthesis and cytopathogenicity in BHK cells. *J Virol* 68(3): 1721-1727.
- Gale, M., Jr., Blakely, C. M., Kwieciszewski, B., Tan, S. L., Dossett, M., Tang, N. M., Korth, M. J., Polyak, S. J., Gretch, D. R. and Katze, M. G.** (1998). Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 18(9): 5208-5218.
- Gale, M. J., Jr., Korth, M. J., Tang, N. M., Tan, S. L., Hopkins, D. A., Dever, T. E., Polyak, S. J., Gretch, D. R. and Katze, M. G.** (1997). Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230(2): 217-227.
- Garaigorta, U. and Chisari, F. V.** (2009). Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host Microbe* 6(6): 513-522.
- Gasparini, G.** (2000). Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 5 Suppl 1: 37-44.
- Geißler, R.** (2012). Untersuchungen zur Funktion der DEAD-Box-RNA-Helikase DDX3 in der cap- und IRES-abhängigen Translation. m. B. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle (Saale).
- Gelev, V., Aktas, H., Marintchev, A., Ito, T., Frueh, D., Hemond, M., Rovnyak, D., Debus, M., Hyberts, S., Usheva, A., Halperin, J. and Wagner, G.** (2006). Mapping of the auto-inhibitory interactions of protein kinase R by nuclear magnetic resonance. *J Mol Biol* 364(3): 352-363.
- Ghosh, A. K., Majumder, M., Steele, R., Ray, R. and Ray, R. B.** (2003). Modulation of interferon expression by hepatitis C virus NS5A protein and human homeodomain protein PTX1. *Virology* 306(1): 51-59.
- Ghosh, A. K., Majumder, M., Steele, R., Yaciuk, P., Chrivia, J., Ray, R. and Ray, R. B.** (2000). Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 275(10): 7184-7188.
- Ghosh, A. K., Steele, R., Meyer, K., Ray, R. and Ray, R. B.** (1999). Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 80 (Pt 5): 1179-1183.
- Ghosh, G., van Duyne, G., Ghosh, S. and Sigler, P. B.** (1995). Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature* 373(6512): 303-310.
- Gil, L. H., van Olphen, A. L., Mittal, S. K. and Donis, R. O.** (2006). Modulation of PKR activity in cells infected by bovine viral diarrhea virus. *Virus Res* 116(1-2): 69-77.
- Gilfoy, F. D. and Mason, P. W.** (2007). West Nile virus-induced interferon production is mediated by the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J Virol* 81(20): 11148-11158.
- Gilmore, T. D. and Herscovitch, M.** (2006). Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene* 25(51): 6887-6899.
- Giraud, E., Primo, L., Audero, E., Gerber, H. P., Koolwijk, P., Soker, S., Klagsbrun, M., Ferrara, N. and Bussolino, F.** (1998). Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273(34): 22128-22135.
- Gong, G., Waris, G., Tanveer, R. and Siddiqui, A.** (2001). Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17): 9599-9604.
- Gonzalez-Gallego, J., Garcia-Mediavilla, M. V. and Sanchez-Campos, S.** (2011). Hepatitis C virus, oxidative stress and steatosis: current status and perspectives. *Curr Mol Med* 11(5): 373-390.

- Gorchakov, R., Frolova, E., Williams, B. R., Rice, C. M. and Frolov, I.** (2004). PKR-dependent and -independent mechanisms are involved in translational shutoff during Sindbis virus infection. *J Virol* 78(16): 8455-8467.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K. and Moradpour, D.** (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77(9): 5487-5492.
- Graber, T. E. and Holcik, M.** (2007). Cap-independent regulation of gene expression in apoptosis. *Mol Biosyst* 3(12): 825-834.
- Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M. and Rice, C. M.** (1993a). A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(22): 10583-10587.
- Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M. and Rice, C. M.** (1993c). Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 67(5): 2832-2843.
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M. and Rice, C. M.** (1993b). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 67(3): 1385-1395.
- Grassmann, C. W., Yu, H., Isken, O. and Behrens, S. E.** (2005). Hepatitis C virus and the related bovine viral diarrhoea virus considerably differ in the functional organization of the 5' non-translated region: implications for the viral life cycle. *Virology* 333(2): 349-366.
- Griffin, S. D., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P. and Rowlands, D. J.** (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 535(1-3): 34-38.
- Guo, J. T., Hayashi, J. and Seeger, C.** (2005). West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha interferon. *J Virol* 79(3): 1343-1350.
- Hamdollah Zadeh, M. A., Amin, E. M., Hoareau-Aveilla, C., Domingo, E., Symonds, K. E., Ye, X., Heesom, K. J., Salmon, A., D'Silva, O., Betteridge, K. B., Williams, A. C., Kerr, D. J., Salmon, A. H., Oltean, S., Midgley, R. S., Ladomery, M. R., Harper, S. J., Varey, A. H. and Bates, D. O.** (2015). Alternative splicing of TIA-1 in human colon cancer regulates VEGF isoform expression, angiogenesis, tumour growth and bevacizumab resistance. *Mol Oncol* 9(1): 167-178.
- Han, A. P., Yu, C., Lu, L., Fujiwara, Y., Browne, C., Chin, G., Fleming, M., Leboulch, P., Orkin, S. H. and Chen, J. J.** (2001). Heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *EMBO J* 20(23): 6909-6918.
- Hanahan, D. and Folkman, J.** (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86(3): 353-364.
- Haque, S. J. and Williams, B. R.** (1994). Identification and characterization of an interferon (IFN)-stimulated response element-IFN-stimulated gene factor 3-independent signaling pathway for IFN-alpha. *J Biol Chem* 269(30): 19523-19529.
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. and Ron, D.** (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6(5): 1099-1108.
- Harhaj, N. S., Felinski, E. A., Wolpert, E. B., Sundstrom, J. M., Gardner, T. W. and Antonetti, D. A.** (2006). VEGF activation of protein kinase C stimulates occludin phosphorylation and contributes to endothelial permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(11): 5106-5115.
- Hassan, M., Selimovic, D., Ghozlan, H. and Abdel-kader, O.** (2009). Hepatitis C virus core protein triggers hepatic angiogenesis by a mechanism including multiple pathways. *Hepatology* 49(5): 1469-1482.
- Helaly, G. F. and Abou Shamaa, L. A.** (2006). Influence of hepatitis C virus infection on circulating levels of sICAM-1 and VEGF in patients with hepatitis C and hepatocellular carcinoma (HCC) and their role in enhancing detection of HCC. *Egypt J Immunol* 13(1): 27-38.
- Herbst, R. S., Onn, A. and Sandler, A.** (2005). Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 23(14): 3243-3256.
- Hershey, J. W.** (1989). Protein phosphorylation controls translation rates. *J Biol Chem* 264(35): 20823-20826.

- Hershey, J. W.** (1991). Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 60: 717-755.
- Hiasa, Y., Kamegaya, Y., Nuriya, H., Onji, M., Kohara, M., Schmidt, E. V. and Chung, R. T.** (2003). Protein kinase R is increased and is functional in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 98(11): 2528-2534.
- Hijkata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K. and Shimotohno, K.** (1993). Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 67(8): 4665-4675.
- Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T. and De Bruijn, E. A.** (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 56(4): 549-580.
- Hofmann, S., Cherkasova, V., Bankhead, P., Bukau, B. and Stoecklin, G.** (2012). Translation suppression promotes stress granule formation and cell survival in response to cold shock. *Mol Biol Cell* 23(19): 3786-3800.
- Honda, M., Brown, E. A. and Lemon, S. M.** (1996). Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* 2(10): 955-968.
- Hoofnagle, J. H.** (2002). Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36(5 Suppl 1): S21-29.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., Endres, S. and Hartmann, G.** (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314(5801): 994-997.
- Huez, I., Bornes, S., Bresson, D., Creancier, L. and Prats, H.** (2001). New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. *Mol Endocrinol* 15(12): 2197-2210.
- Huez, I., Creancier, L., Audigier, S., Gensac, M. C., Prats, A. C. and Prats, H.** (1998). Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol Cell Biol* 18(11): 6178-6190.
- Hugle, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H. G., Rice, C. M., Blum, H. E. and Moradpour, D.** (2001). The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 284(1): 70-81.
- Hussmann, K. L., Samuel, M. A., Kim, K. S., Diamond, M. S. and Fredericksen, B. L.** (2013). Differential replication of pathogenic and nonpathogenic strains of West Nile virus within astrocytes. *J Virol* 87(5): 2814-2822.
- Huxford, T., Huang, D. B., Malek, S. and Ghosh, G.** (1998). The crystal structure of the I κ B/NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation. *Cell* 95(6): 759-770.
- Ikeda, E., Achen, M. G., Breier, G. and Risau, W.** (1995). Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 270(34): 19761-19766.
- Isaacs, A. and Lindenmann, J.** (1957a). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147(927): 258-267.
- Isaacs, A., Lindenmann, J. and Valentine, R. C.** (1957b). Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147(927): 268-273.
- Itsui, Y., Sakamoto, N., Kurosaki, M., Kanazawa, N., Tanabe, Y., Koyama, T., Takeda, Y., Nakagawa, M., Kakinuma, S., Sekine, Y., Maekawa, S., Enomoto, N. and Watanabe, M.** (2006). Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication. *J Viral Hepat* 13(10): 690-700.
- Ivashkina, N., Wolk, B., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Penin, F. and Moradpour, D.** (2002). The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *J Virol* 76(24): 13088-13093.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R.** (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5(10): 987-995.
- Izquierdo, J. M. and Valcarcel, J.** (2007). Two isoforms of the T-cell intracellular antigen 1 (TIA-1) splicing factor display distinct splicing regulation activities. Control of TIA-1 isoform ratio by TIA-1-related protein. *J Biol Chem* 282(27): 19410-19417.

- Jackson, R. J., Hellen, C. U. and Pestova, T. V.** (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(2): 113-127.
- Jacobs, M. D. and Harrison, S. C.** (1998). Structure of an I κ B α /NF- κ B complex. *Cell* 95(6): 749-758.
- Jagus, R., Joshi, B. and Barber, G. N.** (1999). PKR, apoptosis and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 31(1): 123-138.
- Jain, R. G., Andrews, L. G., McGowan, K. M., Pekala, P. H. and Keene, J. D.** (1997). Ectopic expression of Hel-N1, an RNA-binding protein, increases glucose transporter (GLUT1) expression in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 17(2): 954-962.
- Jobin, C., Panja, A., Hellerbrand, C., Iimuro, Y., Didonato, J., Brenner, D. A. and Sartor, R. B.** (1998). Inhibition of proinflammatory molecule production by adenovirus-mediated expression of a nuclear factor κ B super-repressor in human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 160(1): 410-418.
- Jousse, C., Oyadomari, S., Novoa, I., Lu, P., Zhang, Y., Harding, H. P. and Ron, D.** (2003). Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2 α phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol* 163(4): 767-775.
- Juang, Y. T., Lowther, W., Kellum, M., Au, W. C., Lin, R., Hiscott, J. and Pitha, P. M.** (1998). Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(17): 9837-9842.
- Kabbinavar, F., Hurwitz, H. I., Fehrenbacher, L., Meropol, N. J., Novotny, W. F., Lieberman, G., Griffing, S. and Bergsland, E.** (2003). Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 21(1): 60-65.
- Kallio, P. J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H. and Poellinger, L.** (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO J* 17(22): 6573-6586.
- Kallio, P. J., Wilson, W. J., O'Brien, S., Makino, Y. and Poellinger, L.** (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274(10): 6519-6525.
- Kanda, T., Yokosuka, O., Nagao, K. and Saisho, H.** (2006). State of hepatitis C viral replication enhances activation of NF- κ B- and AP-1-signaling induced by hepatitis B virus X. *Cancer Lett* 234(2): 143-148.
- Kang, D. C., Gopalkrishnan, R. V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A. M. and Fisher, P. B.** (2002). mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2): 637-642.
- Kang, J. I., Kwon, S. N., Park, S. H., Kim, Y. K., Choi, S. Y., Kim, J. P. and Ahn, B. Y.** (2009). PKR protein kinase is activated by hepatitis C virus and inhibits viral replication through translational control. *Virus Res* 142(1-2): 51-56.
- Kang, S. M., Won, S. J., Lee, G. H., Lim, Y. S. and Hwang, S. B.** (2010). Modulation of interferon signaling by hepatitis C virus non-structural 5A protein: implication of genotypic difference in interferon treatment. *FEBS Lett* 584(18): 4069-4076.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M. and Wakita, T.** (2003). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125(6): 1808-1817.
- Katoh, O., Takahashi, T., Oguri, T., Kuramoto, K., Mihara, K., Kobayashi, M., Hirata, S. and Watanabe, H.** (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits apoptotic death in hematopoietic cells after exposure to chemotherapeutic drugs by inducing MCL1 acting as an antiapoptotic factor. *Cancer Res* 58(23): 5565-5569.
- Katoh, O., Tauchi, H., Kawaishi, K., Kimura, A. and Satow, Y.** (1995). Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 55(23): 5687-5692.
- Kaufman, R. J.** (1999). Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: a new role for an old actor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21): 11693-11695.

- Kawai, T., Fan, J., Mazan-Mamczarz, K. and Gorospe, M.** (2004). Global mRNA stabilization preferentially linked to translational repression during the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cell Biol* 24(15): 6773-6787.
- Kawai, T., Lal, A., Yang, X., Galban, S., Mazan-Mamczarz, K. and Gorospe, M.** (2006). Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR. *Mol Cell Biol* 26(8): 3295-3307.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O. and Akira, S.** (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6(10): 981-988.
- Kawakami, A., Tian, Q., Streuli, M., Poe, M., Edelhoff, S., Distech, C. M. and Anderson, P.** (1994). Intron-exon organization and chromosomal localization of the human TIA-1 gene. *J Immunol* 152(10): 4937-4945.
- Kedersha, N. and Anderson, P.** (2002a). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 30(Pt 6): 963-969.
- Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I. J., Stahl, J. and Anderson, P.** (2002b). Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA^{(i)(Met)})-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell* 13(1): 195-210.
- Kedersha, N., Cho, M. R., Li, W., Yacono, P. W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D. E. and Anderson, P.** (2000). Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol* 151(6): 1257-1268.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Golan, D. E. and Anderson, P.** (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169(6): 871-884.
- Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I. and Anderson, P.** (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* 147(7): 1431-1442.
- Keller, B. C., Fredericksen, B. L., Samuel, M. A., Mock, R. E., Mason, P. W., Diamond, M. S. and Gale, M., Jr.** (2006). Resistance to alpha/beta interferon is a determinant of West Nile virus replication fitness and virulence. *J Virol* 80(19): 9424-9434.
- Keller, B. C., Johnson, C. L., Erickson, A. K. and Gale, M., Jr.** (2007). Innate immune evasion by hepatitis C virus and West Nile virus. *Cytokine Growth Factor Rev* 18(5-6): 535-544.
- Kessler, D. S., Veals, S. A., Fu, X. Y. and Levy, D. E.** (1990). Interferon-alpha regulates nuclear translocation and DNA-binding affinity of ISGF3, a multimeric transcriptional activator. *Genes Dev* 4(10): 1753-1765.
- Kesson, A. M., Cheng, Y. and King, N. J.** (2002). Regulation of immune recognition molecules by flavivirus, West Nile. *Viral Immunol* 15(2): 273-283.
- Kesson, A. M. and King, N. J.** (2001). Transcriptional regulation of major histocompatibility complex class I by flavivirus West Nile is dependent on NF-kappaB activation. *J Infect Dis* 184(8): 947-954.
- Kevil, C. G., Payne, D. K., Mire, E. and Alexander, J. S.** (1998). Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem* 273(24): 15099-15103.
- Khawaja, A., Vopalensky, V. and Pospisek, M.** (2015). Understanding the potential of hepatitis C virus internal ribosome entry site domains to modulate translation initiation via their structure and function. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6(2): 211-224.
- Khromykh, A. A. and Westaway, E. G.** (1997). Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J Virol* 71(2): 1497-1505.
- Kim, J. H., Park, S. M., Park, J. H., Keum, S. J. and Jang, S. K.** (2011). eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions. *EMBO J* 30(12): 2454-2464.
- Kim, Y. K., Kim, C. S., Lee, S. H. and Jang, S. K.** (2002). Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochem Biophys Res Commun* 290(1): 105-112.
- Kimball, S. R.** (1999). Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol* 31(1): 25-29.

- Kindler, H. L., Friberg, G., Singh, D. A., Locker, G., Nattam, S., Kozloff, M., Taber, D. A., Karrison, T., Dachman, A., Stadler, W. M. and Vokes, E. E.** (2005). Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 23(31): 8033-8040.
- Koba, M. and Konopa, J.** (2005). [Actinomycin D and its mechanisms of action]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 59: 290-298.
- Koeller, D. M., Horowitz, J. A., Casey, J. L., Klausner, R. D. and Harford, J. B.** (1991). Translation and the stability of mRNAs encoding the transferrin receptor and c-fos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17): 7778-7782.
- Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V. and Hellen, C. U.** (2000). An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol* 74(14): 6242-6250.
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M. and Rice, C. M.** (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 70(6): 3363-3371.
- Kolykhalov, A. A., Mihalik, K., Feinstone, S. M. and Rice, C. M.** (2000). Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* 74(4): 2046-2051.
- Komar, A. A. and Hatzoglou, M.** (2005). Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J Biol Chem* 280(25): 23425-23428.
- Komar, A. A. and Hatzoglou, M.** (2011). Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle* 10(2): 229-240.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T. and Bartenschlager, R.** (2006). Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 80(11): 5308-5320.
- Kumar, A., Haque, J., Lacoste, J., Hiscott, J. and Williams, B. R.** (1994). Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(14): 6288-6292.
- Kumar, A., Yang, Y. L., Flati, V., Der, S., Kadereit, S., Deb, A., Haque, J., Reis, L., Weissmann, C. and Williams, B. R.** (1997). Deficient cytokine signaling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene: role of IRF-1 and NF-kappaB. *EMBO J* 16(2): 406-416.
- Kumthip, K., Chusri, P., Jilg, N., Zhao, L., Fusco, D. N., Zhao, H., Goto, K., Cheng, D., Schaefer, E. A., Zhang, L., Pantip, C., Thongsawat, S., O'Brien, A., Peng, L. F., Maneekarn, N., Chung, R. T. and Lin, W.** (2012). Hepatitis C virus NS5A disrupts STAT1 phosphorylation and suppresses type I interferon signaling. *J Virol* 86(16): 8581-8591.
- Kuramoto, K., Uesaka, T., Kimura, A., Kobayashi, M., Watanabe, H. and Katoh, O.** (2000). ZK7, a novel zinc finger gene, is induced by vascular endothelial growth factor and inhibits apoptotic death in hematopoietic cells. *Cancer Res* 60(2): 425-430.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lan, K. H., Lan, K. L., Lee, W. P., Sheu, M. L., Chen, M. Y., Lee, Y. L., Yen, S. H., Chang, F. Y. and Lee, S. D.** (2007). HCV NS5A inhibits interferon-alpha signaling through suppression of STAT1 phosphorylation in hepatocyte-derived cell lines. *J Hepatol* 46(5): 759-767.
- Laporte, J., Bain, C., Maurel, P., Inchauspe, G., Agut, H. and Cahour, A.** (2003). Differential distribution and internal translation efficiency of hepatitis C virus quasispecies present in dendritic and liver cells. *Blood* 101(1): 52-57.
- Laurent-Rolle, M., Boer, E. F., Lubick, K. J., Wolfenbarger, J. B., Carmody, A. B., Rockx, B., Liu, W., Ashour, J., Shupert, W. L., Holbrook, M. R., Barrett, A. D., Mason, P. W., Bloom, M. E., Garcia-Sastre, A., Khromykh, A. A. and Best, S. M.** (2010). The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. *J Virol* 84(7): 3503-3515.
- Le Guiner, C., Lejeune, F., Galiana, D., Kister, L., Breathnach, R., Stevenin, J. and Del Gatto-Konczak, F.** (2001). TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs. *J Biol Chem* 276(44): 40638-40646.

- Lee, A. H., Iwakoshi, N. N. and Glimcher, L. H.** (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 23(21): 7448-7459.
- Lemaire, P. A., Anderson, E., Lary, J. and Cole, J. L.** (2008). Mechanism of PKR Activation by dsRNA. *J Mol Biol* 381(2): 351-360.
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. and Ferrara, N.** (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246(4935): 1306-1309.
- Levy, A. P.** (1998). Hypoxic regulation of VEGF mRNA stability by RNA-binding proteins. *Trends Cardiovasc Med* 8(6): 246-250.
- Levy, A. P., Levy, N. S. and Goldberg, M. A.** (1996). Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* 271(5): 2746-2753.
- Levy, N. S., Chung, S., Furneaux, H. and Levy, A. P.** (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 273(11): 6417-6423.
- Lewis, S. M. and Holcik, M.** (2008). For IRES trans-acting factors, it is all about location. *Oncogene* 27(8): 1033-1035.
- Li, J., Perrella, M. A., Tsai, J. C., Yet, S. F., Hsieh, C. M., Yoshizumi, M., Patterson, C., Endege, W. O., Zhou, F. and Lee, M. E.** (1995). Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270(1): 308-312.
- Li, S., Ye, L., Yu, X., Xu, B., Li, K., Zhu, X., Liu, H., Wu, X. and Kong, L.** (2009). Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF-kappaB activation. *Virology* 391(2): 257-264.
- Liang, Y., Shilagard, T., Xiao, S. Y., Snyder, N., Lau, D., Cicalese, L., Weiss, H., Vargas, G. and Lemon, S. M.** (2009). Visualizing hepatitis C virus infections in human liver by two-photon microscopy. *Gastroenterology* 137(4): 1448-1458.
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A. and Rice, C. M.** (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309(5734): 623-626.
- Lindenbach, B. D. and Rice, C. M.** (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 59: 23-61.
- Lindenbach, B. D., Thiel, H.J., Rice, C.M.** (2007). Flaviviridae: The viruses and their replication. *Fields Virology*. D. M. Knipe, Howley, P.M. . Philadelphia, *Lippincott-Raven Publishers*. 5th Edition.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J. R., Coyne, C. B. and Wang, T.** (2009). Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83(4): 2011-2014.
- Liu, W. J., Wang, X. J., Clark, D. C., Lobigs, M., Hall, R. A. and Khromykh, A. A.** (2006). A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J Virol* 80(5): 2396-2404.
- Liu, W. J., Wang, X. J., Mokhonov, V. V., Shi, P. Y., Randall, R. and Khromykh, A. A.** (2005). Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. *J Virol* 79(3): 1934-1942.
- Liu, Y., Cox, S. R., Morita, T. and Kourembanas, S.** (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 77(3): 638-643.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. and Bartenschlager, R.** (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285(5424): 110-113.
- Loo, Y. M. and Gale, M., Jr.** (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34(5): 680-692.
- Lopez de Silanes, I., Galban, S., Martindale, J. L., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K., Indig, F. E., Falco, G., Zhan, M. and Gorospe, M.** (2005). Identification and functional outcome of mRNAs associated with RNA-binding protein TIA-1. *Mol Cell Biol* 25(21): 9520-9531.

- Lu, L., Han, A. P. and Chen, J. J.** (2001). Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *Mol Cell Biol* 21(23): 7971-7980.
- Lucas, M., Mashimo, T., Frenkiel, M. P., Simon-Chazottes, D., Montagutelli, X., Ceccaldi, P. E., Guenet, J. L. and Despres, P.** (2003). Infection of mouse neurones by West Nile virus is modulated by the interferon-inducible 2'-5' oligoadenylate synthetase 1b protein. *Immunol Cell Biol* 81(3): 230-236.
- Luik, P., Chew, C., Aittoniemi, J., Chang, J., Wentworth, P., Jr., Dwek, R. A., Biggin, P. C., Venien-Bryan, C. and Zitzmann, N.** (2009). The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(31): 12712-12716.
- Luo, G., Hamatake, R. K., Mathis, D. M., Racela, J., Rigat, K. L., Lemm, J. and Colonno, R. J.** (2000). De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J Virol* 74(2): 851-863.
- Madanecki, P., Kapoor, N., Bebok, Z., Ochocka, R., Collawn, J. F. and Bartoszewski, R.** (2013). Regulation of angiogenesis by hypoxia: the role of microRNA. *Cell Mol Biol Lett* 18(1): 47-57.
- Manabe, S., Fuke, I., Tanishita, O., Kaji, C., Gomi, Y., Yoshida, S., Mori, C., Takamizawa, A., Yosida, I. and Okayama, H.** (1994). Production of nonstructural proteins of hepatitis C virus requires a putative viral protease encoded by NS3. *Virology* 198(2): 636-644.
- Manche, L., Green, S. R., Schmedt, C. and Mathews, M. B.** (1992). Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol* 12(11): 5238-5248.
- Maniatis, T., Falvo, J. V., Kim, T. H., Kim, T. K., Lin, C. H., Parekh, B. S. and Wathelet, M. G.** (1998). Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63: 609-620.
- Marie, I., Durbin, J. E. and Levy, D. E.** (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J* 17(22): 6660-6669.
- Marusawa, H., Osaki, Y., Kimura, T., Ito, K., Yamashita, Y., Eguchi, T., Kudo, M., Yamamoto, Y., Kojima, H., Seno, H., Moriyasu, F. and Chiba, T.** (1999). High prevalence of anti-hepatitis B virus serological markers in patients with hepatitis C virus related chronic liver disease in Japan. *Gut* 45(2): 284-288.
- Mazan-Mamczarz, K., Lal, A., Martindale, J. L., Kawai, T. and Gorospe, M.** (2006). Translational repression by RNA-binding protein TIAR. *Mol Cell Biol* 26(7): 2716-2727.
- McAllister, C. S. and Samuel, C. E.** (2009). The RNA-activated protein kinase enhances the induction of interferon-beta and apoptosis mediated by cytoplasmic RNA sensors. *J Biol Chem* 284(3): 1644-1651.
- McAllister, C. S., Taghavi, N. and Samuel, C. E.** (2012). Protein kinase PKR amplification of interferon beta induction occurs through initiation factor eIF-2alpha-mediated translational control. *J Biol Chem* 287(43): 36384-36392.
- McKenna, S. A., Lindhout, D. A., Kim, I., Liu, C. W., Gelev, V. M., Wagner, G. and Puglisi, J. D.** (2007). Molecular framework for the activation of RNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 282(15): 11474-11486.
- Mee, C. J., Farquhar, M. J., Harris, H. J., Hu, K., Ramma, W., Ahmed, A., Maurel, P., Bicknell, R., Balfe, P. and McKeating, J. A.** (2010). Hepatitis C virus infection reduces hepatocellular polarity in a vascular endothelial growth factor-dependent manner. *Gastroenterology* 138(3): 1134-1142.
- Melen, K., Fagerlund, R., Nyqvist, M., Keskinen, P. and Julkunen, I.** (2004). Expression of hepatitis C virus core protein inhibits interferon-induced nuclear import of STATs. *J Med Virol* 73(4): 536-547.
- Merika, M., Williams, A. J., Chen, G., Collins, T. and Thanos, D.** (1998). Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell* 1(2): 277-287.
- Meyer, K., Beyene, A., Bowlin, T. L., Basu, A. and Ray, R.** (2004). Coexpression of hepatitis C virus E1 and E2 chimeric envelope glycoproteins displays separable ligand sensitivity and increases pseudotype infectious titer. *J Virol* 78(23): 12838-12847.
- Meyers, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H. J. and Kummerer, B. M.** (1996). Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. *J Virol* 70(12): 8606-8613.
- Mihm, S., Frese, M., Meier, V., Wietzke-Braun, P., Scharf, J. G., Bartenschlager, R. and Ramadori, G.** (2004). Interferon type I gene expression in chronic hepatitis C. *Lab Invest* 84(9): 1148-1159.

- Miller, K., McArdle, S., Gale, M. J., Jr., Geller, D. A., Tenoever, B., Hiscott, J., Gretch, D. R. and Polyak, S. J.** (2004). Effects of the hepatitis C virus core protein on innate cellular defense pathways. *J Interferon Cytokine Res* 24(7): 391-402.
- Miller, S. and Krijnse-Locker, J.** (2008). Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* 6(5): 363-374.
- Minks, M. A., West, D. K., Benvin, S. and Baglioni, C.** (1979). Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2',5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. *J Biol Chem* 254(20): 10180-10183.
- Mokas, S., Mills, J. R., Garreau, C., Fournier, M. J., Robert, F., Arya, P., Kaufman, R. J., Pelletier, J. and Mazroui, R.** (2009). Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition. *Mol Biol Cell* 20(11): 2673-2683.
- Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H. E., Bartenschlager, R., Penin, F. and Lohmann, V.** (2004). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 78(23): 13278-13284.
- Moradpour, D., Penin, F. and Rice, C. M.** (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5(6): 453-463.
- Moriishi, K. and Matsuura, Y.** (2007). Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev Med Virol* 17(5): 343-354.
- Morrey, J. D., Day, C. W., Julander, J. G., Blatt, L. M., Smee, D. F. and Sidwell, R. W.** (2004). Effect of interferon-alpha and interferon-inducers on West Nile virus in mouse and hamster animal models. *Antivir Chem Chemother* 15(2): 101-109.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J. and Rossmann, M. G.** (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3(1): 13-22.
- Muller, C. W., Rey, F. A., Sodeoka, M., Verdine, G. L. and Harrison, S. C.** (1995). Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* 373(6512): 311-317.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Munoz-Jordan, J. L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martinez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W. I. and Garcia-Sastre, A.** (2005). Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol* 79(13): 8004-8013.
- Munshi, N., Yie, Y., Merika, M., Senger, K., Lomvardas, S., Agalioti, T. and Thanos, D.** (1999). The IFN-beta enhancer: a paradigm for understanding activation and repression of inducible gene expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 64: 149-159.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. and Yuan, J.** (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403(6765): 98-103.
- Nanda, J. S., Saini, A. K., Munoz, A. M., Hinnebusch, A. G. and Lorsch, J. R.** (2013). Coordinated movements of eukaryotic translation initiation factors eIF1, eIF1A, and eIF5 trigger phosphate release from eIF2 in response to start codon recognition by the ribosomal preinitiation complex. *J Biol Chem* 288(8): 5316-5329.
- Nanduri, S., Carpick, B. W., Yang, Y., Williams, B. R. and Qin, J.** (1998). Structure of the double-stranded RNA-binding domain of the protein kinase PKR reveals the molecular basis of its dsRNA-mediated activation. *EMBO J* 17(18): 5458-5465.
- Nanduri, S., Rahman, F., Williams, B. R. and Qin, J.** (2000). A dynamically tuned double-stranded RNA binding mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. *EMBO J* 19(20): 5567-5574.
- Nasimuzzaman, M., Waris, G., Mikolon, D., Stupack, D. G. and Siddiqui, A.** (2007). Hepatitis C virus stabilizes hypoxia-inducible factor 1alpha and stimulates the synthesis of vascular endothelial growth factor. *J Virol* 81(19): 10249-10257.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. and Poltorak, Z.** (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13(1): 9-22.

- Neufeld, G., Tessler, S., Gitay-Goren, H., Cohen, T. and Levi, B. Z.** (1994). Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog Growth Factor Res* 5(1): 89-97.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P. and Ron, D.** (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* 153(5): 1011-1022.
- Oem, J. K., Jackel-Cram, C., Li, Y. P., Kang, H. N., Zhou, Y., Babiuk, L. A. and Liu, Q.** (2008). Hepatitis C virus non-structural protein-2 activates CXCL-8 transcription through NF-kappaB. *Arch Virol* 153(2): 293-301.
- Onesto, C., Berra, E., Grepin, R. and Pages, G.** (2004). Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *J Biol Chem* 279(33): 34217-34226.
- Onesto, C., Hannoun-Levi, J. M., Chamorey, E., Formento, J. L., Ramaioli, A. and Pages, G.** (2006). Vascular endothelial growth factor-A and Poly(A) binding protein-interacting protein 2 expression in human head and neck carcinomas: correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* 94(10): 1516-1523.
- Otto, G. A. and Puglisi, J. D.** (2004). The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* 119(3): 369-380.
- OuYang, B., Xie, S., Berardi, M. J., Zhao, X., Dev, J., Yu, W., Sun, B. and Chou, J. J.** (2013). Unusual architecture of the p7 channel from hepatitis C virus. *Nature* 498(7455): 521-525.
- Palumbo, E.** (2009). PEG-interferon in acute and chronic hepatitis C: a review. *Am J Ther* 16(6): 573-578.
- Pang, P. S., Jankowsky, E., Planet, P. J. and Pyle, A. M.** (2002). The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO J* 21(5): 1168-1176.
- Panniers, R., Rowlands, A. G. and Henshaw, E. C.** (1988). The effect of Mg²⁺ and guanine nucleotide exchange factor on the binding of guanine nucleotides to eukaryotic initiation factor 2. *J Biol Chem* 263(12): 5519-5525.
- Park, E. H., Lee, J. M., Blais, J. D., Bell, J. C. and Pelletier, J.** (2005). Internal translation initiation mediated by the angiogenic factor Tie2. *J Biol Chem* 280(22): 20945-20953.
- Park, H., Serti, E., Eke, O., Muchmore, B., Prokunina-Olsson, L., Capone, S., Folgori, A. and Rehmann, B.** (2012). IL-29 is the dominant type III interferon produced by hepatocytes during acute hepatitis C virus infection. *Hepatology* 56(6): 2060-2070.
- Park, J. E., Keller, G. A. and Ferrara, N.** (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4(12): 1317-1326.
- Pavlovic, D., Neville, D. C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R. A., Fischer, W. B. and Zitzmann, N.** (2003). The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10): 6104-6108.
- Perler, L., Schweizer, M., Jungi, T. W. and Peterhans, E.** (2000). Bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 prime uninfected macrophages for lipopolysaccharide-triggered apoptosis by interferon-dependent and -independent pathways. *J Gen Virol* 81(Pt 4): 881-887.
- Pertovaara, L., Kaipainen, A., Mustonen, T., Orpana, A., Ferrara, N., Saksela, O. and Alitalo, K.** (1994). Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 269(9): 6271-6274.
- Pestova, T. V., de Breyne, S., Pisarev, A. V., Abaeva, I. S. and Hellen, C. U.** (2008). eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II. *EMBO J* 27(7): 1060-1072.
- Pestova, T. V. and Hellen, C. U.** (1999). Internal initiation of translation of bovine viral diarrhoea virus RNA. *Virology* 258(2): 249-256.
- Pestova, T. V. and Kolupaeva, V. G.** (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* 16(22): 2906-2922.
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J. and Hellen, C. U.** (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 12(1): 67-83.

- Petersen, L. R. and Roehrig, J. T.** (2001). West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg Infect Dis* 7(4): 611-614.
- Peterson, D. T., Safer, B. and Merrick, W. C.** (1979). Role of eukaryotic initiation factor 5 in the formation of 80 S initiation complexes. *J Biol Chem* 254(16): 7730-7735.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F. and Reis e Sousa, C.** (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314(5801): 997-1001.
- Piecyk, M., Wax, S., Beck, A. R., Kedersha, N., Gupta, M., Maritim, B., Chen, S., Gueydan, C., Kruys, V., Streuli, M. and Anderson, P.** (2000). TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *EMBO J* 19(15): 4154-4163.
- Pisarev, A. V., Kolupaeva, V. G., Pisareva, V. P., Merrick, W. C., Hellen, C. U. and Pestova, T. V.** (2006). Specific functional interactions of nucleotides at key -3 and +4 positions flanking the initiation codon with components of the mammalian 48S translation initiation complex. *Genes Dev* 20(5): 624-636.
- Pisarev, A. V., Shirokikh, N. E. and Hellen, C. U.** (2005). Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites. *C R Biol* 328(7): 589-605.
- Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P. and Rice, C. M.** (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457(7231): 882-886.
- Poltorak, Z., Cohen, T., Sivan, R., Kandelis, Y., Spira, G., Vlodaysky, I., Keshet, E. and Neufeld, G.** (1997). VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 272(11): 7151-7158.
- Polyak, S. J., Paschal, D. M., McArdle, S., Gale, M. J., Jr., Moradpour, D. and Gretch, D. R.** (1999). Characterization of the effects of hepatitis C virus nonstructural 5A protein expression in human cell lines and on interferon-sensitive virus replication. *Hepatology* 29(4): 1262-1271.
- Puthenveetil, S., Whitby, L., Ren, J., Kelnar, K., Krebs, J. F. and Beal, P. A.** (2006). Controlling activation of the RNA-dependent protein kinase by siRNAs using site-specific chemical modification. *Nucleic Acids Res* 34(17): 4900-4911.
- Ramirez-Valle, F., Braunstein, S., Zavadil, J., Formenti, S. C. and Schneider, R. J.** (2008). eIF4GI links nutrient sensing by mTOR to cell proliferation and inhibition of autophagy. *J Cell Biol* 181(2): 293-307.
- Ranjith-Kumar, C. T., Kim, Y. C., Gutshall, L., Silverman, C., Khandekar, S., Sarisky, R. T. and Kao, C. C.** (2002). Mechanism of de novo initiation by the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase: role of divalent metals. *J Virol* 76(24): 12513-12525.
- Ripoli, M., D'Aprile, A., Quarato, G., Sarasin-Filipowicz, M., Gouttenoire, J., Scrima, R., Cela, O., Boffoli, D., Heim, M. H., Moradpour, D., Capitanio, N. and Piccoli, C.** (2010). Hepatitis C virus-linked mitochondrial dysfunction promotes hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated glycolytic adaptation. *J Virol* 84(1): 647-660.
- Ristimaki, A., Narko, K., Enholm, B., Joukov, V. and Alitalo, K.** (1998). Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem* 273(14): 8413-8418.
- Rivas-Estilla, A. M., Svitkin, Y., Lopez Lastra, M., Hatzoglou, M., Sherker, A. and Koromilas, A. E.** (2002). PKR-dependent mechanisms of gene expression from a subgenomic hepatitis C virus clone. *J Virol* 76(21): 10637-10653.
- Robertson, H. D. and Mathews, M. B.** (1996). The regulation of the protein kinase PKR by RNA. *Biochimie* 78(11-12): 909-914.
- Ross, A. S., Bhan, A. K., Pascual, M., Thiim, M., Benedict Cosimi, A. and Chung, R. T.** (2004). Pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin in the treatment of post-liver transplant recurrent hepatitis C. *Clin Transplant* 18(2): 166-173.
- Rowlands, A. G., Panniers, R. and Henshaw, E. C.** (1988). The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *J Biol Chem* 263(12): 5526-5533.

- Samali, A., Fitzgerald, U., Deegan, S. and Gupta, S.** (2010). Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Int J Cell Biol* 2010: 830307.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual.
- Sambrook, J., Russell, D.W.** (2001). Molecular cloning - a laboratory manual. New York, NY, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarnow, P.** (2003). Viral internal ribosome entry site elements: novel ribosome-RNA complexes and roles in viral pathogenesis. *J Virol* 77(5): 2801-2806.
- Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Nakaya, T., Taniguchi, T. and Tanaka, N.** (1998). Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett* 441(1): 106-110.
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N. and Taniguchi, T.** (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13(4): 539-548.
- Schmidt, A., Schwerd, T., Hamm, W., Hellmuth, J. C., Cui, S., Wenzel, M., Hoffmann, F. S., Michallet, M. C., Besch, R., Hopfner, K. P., Endres, S. and Rothenfusser, S.** (2009). 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(29): 12067-12072.
- Schmitt, M., Horbach, A., Kubitz, R., Frilling, A. and Haussinger, D.** (2004). Disruption of hepatocellular tight junctions by vascular endothelial growth factor (VEGF): a novel mechanism for tumor invasion. *J Hepatol* 41(2): 274-283.
- Schnell, G., Loo, Y. M., Marcotrigiano, J. and Gale, M., Jr.** (2012). Uridine composition of the poly-U/UC tract of HCV RNA defines non-self recognition by RIG-I. *PLoS Pathog* 8(8): e1002839.
- Scholle, F. and Mason, P. W.** (2005). West Nile virus replication interferes with both poly(I:C)-induced interferon gene transcription and response to interferon treatment. *Virology* 342(1): 77-87.
- Schweizer, M. and Peterhans, E.** (2001). Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *J Virol* 75(10): 4692-4698.
- Sehgal, P. B. and Tamm, I.** (1978). Halogenated benzimidazole ribosides, Novel inhibitors of RNA synthesis. *Biochem Pharmacol* 27(21): 2475-2485.
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K. and Chen, Z. J.** (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122(5): 669-682.
- Shi, P. Y., Tilgner, M. and Lo, M. K.** (2002). Construction and characterization of subgenomic replicons of New York strain of West Nile virus. *Virology* 296(2): 219-233.
- Shih, S. C. and Claffey, K. P.** (1999). Regulation of human vascular endothelial growth factor mRNA stability in hypoxia by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *J Biol Chem* 274(3): 1359-1365.
- Shima, D. T., Deutsch, U. and D'Amore, P. A.** (1995). Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett* 370(3): 203-208.
- Shimoike, T., McKenna, S. A., Lindhout, D. A. and Puglisi, J. D.** (2009). Translational insensitivity to potent activation of PKR by HCV IRES RNA. *Antiviral Res* 83(3): 228-237.
- Shiple, J. G., Vandergaast, R., Deng, L., Mariuzza, R. A. and Fredericksen, B. L.** (2012). Identification of multiple RIG-I-specific pathogen associated molecular patterns within the West Nile virus genome and antigenome. *Virology* 432(1): 232-238.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. and Keshet, E.** (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359(6398): 843-845.
- Silvera, D., Arju, R., Darvishian, F., Levine, P. H., Zolfaghari, L., Goldberg, J., Hochman, T., Formenti, S. C. and Schneider, R. J.** (2009a). Essential role for eIF4G1 overexpression in the pathogenesis of inflammatory breast cancer. *Nat Cell Biol* 11(7): 903-908.
- Silvera, D. and Schneider, R. J.** (2009b). Inflammatory breast cancer cells are constitutively adapted to hypoxia. *Cell Cycle* 8(19): 3091-3096.

- Silverman, E., Edwalds-Gilbert, G. and Lin, R. J.** (2003). DExD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene* 312: 1-16.
- Simmonds, P.** (1995). Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 21(2): 570-583.
- Simmonds, P.** (2013). The origin of hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 369: 1-15.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin, I. T., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A. J. and Widell, A.** (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42(4): 962-973.
- Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H. and Williams, B. R.** (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5(9): 834-839.
- Sobell, H. M.** (1985). Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(16): 5328-5331.
- Spriggs, K. A., Stoneley, M., Bushell, M. and Willis, A. E.** (2008). Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell* 100(1): 27-38.
- Stapleton, J. T., Fong, S., Muerhoff, A. S., Bukh, J. and Simmonds, P.** (2011). The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol* 92(Pt 2): 233-246.
- Stein, I., Itin, A., Einat, P., Skaliter, R., Grossman, Z. and Keshet, E.** (1998). Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol* 18(6): 3112-3119.
- Stein, I., Neeman, M., Shweiki, D., Itin, A. and Keshet, E.** (1995). Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol* 15(10): 5363-5368.
- Sudhakar, A., Ramachandran, A., Ghosh, S., Hasnain, S. E., Kaufman, R. J. and Ramaiah, K. V.** (2000). Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry* 39(42): 12929-12938.
- Sumpter, R., Jr., Loo, Y. M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M. and Gale, M., Jr.** (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 79(5): 2689-2699.
- Suswam, E. A., Li, Y. Y., Mahtani, H. and King, P. H.** (2005). Novel DNA-binding properties of the RNA-binding protein TIAR. *Nucleic Acids Res* 33(14): 4507-4518.
- Tai, D. I., Tsai, S. L., Chen, Y. M., Chuang, Y. L., Peng, C. Y., Sheen, I. S., Yeh, C. T., Chang, K. S., Huang, S. N., Kuo, G. C. and Liaw, Y. F.** (2000). Activation of nuclear factor kappaB in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 31(3): 656-664.
- Tan, S. L. and Katze, M. G.** (1999). The emerging role of the interferon-induced PKR protein kinase as an apoptotic effector: a new face of death? *J Interferon Cytokine Res* 19(6): 543-554.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Sugiyama, K. and Shimotohno, K.** (1996). Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 70(5): 3307-3312.
- Tanner, N. K. and Linder, P.** (2001). DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol Cell* 8(2): 251-262.
- Tautz, N., Tews, B. A. and Meyers, G.** (2015). The Molecular Biology of Pestiviruses. *Adv Virus Res* 93: 47-160.
- Taylor, D. R., Puig, M., Darnell, M. E., Mihalik, K. and Feinstone, S. M.** (2005). New antiviral pathway that mediates hepatitis C virus replicon interferon sensitivity through ADAR1. *J Virol* 79(10): 6291-6298.
- Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N. and Lai, M. M.** (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285(5424): 107-110.
- Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E. and Shatsky, I. N.** (2008). Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat Struct Mol Biol* 15(8): 836-841.

- Thakor, N. and Holcik, M.** (2012). IRES-mediated translation of cellular messenger RNA operates in eIF2alpha-independent manner during stress. *Nucleic Acids Res* 40(2): 541-552.
- Thanos, D. and Maniatis, T.** (1995). Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* 83(7): 1091-1100.
- Thomis, D. C., Doohan, J. P. and Samuel, C. E.** (1992). Mechanism of interferon action: cDNA structure, expression, and regulation of the interferon-induced, RNA-dependent P1/eIF-2 alpha protein kinase from human cells. *Virology* 188(1): 33-46.
- Tian, Q., Streuli, M., Saito, H., Schlossman, S. F. and Anderson, P.** (1991). A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 67(3): 629-639.
- Tokumoto, Y., Hiasa, Y., Horiike, N., Michitaka, K., Matsuura, B., Chung, R. T. and Onji, M.** (2007). Hepatitis C virus expression and interferon antiviral action is dependent on PKR expression. *J Med Virol* 79(8): 1120-1127.
- Torgerson, T. R., Colosia, A. D., Donahue, J. P., Lin, Y. Z. and Hawiger, J.** (1998). Regulation of NF-kappa B, AP-1, NFAT, and STAT1 nuclear import in T lymphocytes by noninvasive delivery of peptide carrying the nuclear localization sequence of NF-kappa B p50. *J Immunol* 161(11): 6084-6092.
- Toroney, R., Nallagatla, S. R., Boyer, J. A., Cameron, C. E. and Bevilacqua, P. C.** (2010). Regulation of PKR by HCV IRES RNA: importance of domain II and NS5A. *J Mol Biol* 400(3): 393-412.
- Tscherne, D. M., Jones, C. T., Evans, M. J., Lindenbach, B. D., McKeating, J. A. and Rice, C. M.** (2006). Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* 80(4): 1734-1741.
- Tsuzuki, Y., Fukumura, D., Oosthuysen, B., Koike, C., Carmeliet, P. and Jain, R. K.** (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha--> hypoxia response element--> VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res* 60(22): 6248-6252.
- Ucci, J. W., Kobayashi, Y., Choi, G., Alexandrescu, A. T. and Cole, J. L.** (2007). Mechanism of interaction of the double-stranded RNA (dsRNA) binding domain of protein kinase R with short dsRNA sequences. *Biochemistry* 46(1): 55-65.
- Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R. and Verma, I. M.** (1996). Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 274(5288): 787-789.
- Ventoso, I., Sanz, M. A., Molina, S., Berlanga, J. J., Carrasco, L. and Esteban, M.** (2006). Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev* 20(1): 87-100.
- von Marschall, Z., Cramer, T., Hocker, M., Finkenzeller, G., Wiedenmann, B. and Rosewicz, S.** (2001). Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut* 48(1): 87-96.
- von Roretz, C., Di Marco, S., Mazroui, R. and Gallouzi, I. E.** (2011). Turnover of AU-rich-containing mRNAs during stress: a matter of survival. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2(3): 336-347.
- Vumbaca, F., Phoenix, K. N., Rodriguez-Pinto, D., Han, D. K. and Claffey, K. P.** (2008). Double-stranded RNA-binding protein regulates vascular endothelial growth factor mRNA stability, translation, and breast cancer angiogenesis. *Mol Cell Biol* 28(2): 772-783.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R. and Liang, T. J.** (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11(7): 791-796.
- Wang, C., Pflugheber, J., Sumpter, R., Jr., Sodora, D. L., Hui, D., Sen, G. C. and Gale, M., Jr.** (2003). Alpha interferon induces distinct translational control programs to suppress hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 77(7): 3898-3912.
- Wang, C., Sarnow, P. and Siddiqui, A.** (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* 67(6): 3338-3344.
- Wang, C., Sarnow, P. and Siddiqui, A.** (1994). A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 68(11): 7301-7307.

- Wang, C. Y., Mayo, M. W. and Baldwin, A. S., Jr.** (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274(5288): 784-787.
- Welbourn, S., Green, R., Gamache, I., Dandache, S., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Meerovitch, K. and Pause, A.** (2005). Hepatitis C virus NS2/3 processing is required for NS3 stability and viral RNA replication. *J Biol Chem* 280(33): 29604-29611.
- Wiegand, J., Buggisch, P., Boecher, W., Zeuzem, S., Gelbmann, C. M., Berg, T., Kauffmann, W., Kallinowski, B., Cornberg, M., Jaeckel, E., Wedemeyer, H., Manns, M. P. and German, H. E. P. N. E. T. A. H. C. V. S. G.** (2006). Early monotherapy with pegylated interferon alpha-2b for acute hepatitis C infection: the HEP-NET acute-HCV-II study. *Hepatology* 43(2): 250-256.
- Williams, B. R.** (1991). Transcriptional regulation of interferon-stimulated genes. *Eur J Biochem* 200(1): 1-11.
- Williams, B. R.** (1999). PKR: a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18(45): 6112-6120.
- Williams, B. R.** (2001). Signal integration via PKR. *Sci STKE* 2001(89): re2.
- Wong, A. H., Tam, N. W., Yang, Y. L., Cuddihy, A. R., Li, S., Kirchhoff, S., Hauser, H., Decker, T. and Koromilas, A. E.** (1997). Physical association between STAT1 and the interferon-inducible protein kinase PKR and implications for interferon and double-stranded RNA signaling pathways. *EMBO J* 16(6): 1291-1304.
- Wu, S. and Kaufman, R. J.** (1997). A model for the double-stranded RNA (dsRNA)-dependent dimerization and activation of the dsRNA-activated protein kinase PKR. *J Biol Chem* 272(2): 1291-1296.
- Yaman, I., Fernandez, J., Liu, H., Caprara, M., Komar, A. A., Koromilas, A. E., Zhou, L., Snider, M. D., Scheuner, D., Kaufman, R. J. and Hatzoglou, M.** (2003). The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell* 113(4): 519-531.
- Yamane, D., Kato, K., Tohya, Y. and Akashi, H.** (2006). The double-stranded RNA-induced apoptosis pathway is involved in the cytopathogenicity of cytopathogenic Bovine viral diarrhea virus. *J Gen Virol* 87(Pt 10): 2961-2970.
- Yan, H., Krishnan, K., Lim, J. T., Contillo, L. G. and Krolewski, J. J.** (1996). Molecular characterization of an alpha interferon receptor 1 subunit (IFNaR1) domain required for TYK2 binding and signal transduction. *Mol Cell Biol* 16(5): 2074-2082.
- Yoneyama, M. and Fujita, T.** (2007). Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J Biol Chem* 282(21): 15315-15318.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A. and Fujita, T.** (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 175(5): 2851-2858.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. and Fujita, T.** (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5(7): 730-737.
- Yu, S. H., Nagayama, K., Enomoto, N., Izumi, N., Marumo, F. and Sato, C.** (2000). Intrahepatic mRNA expression of interferon-inducible antiviral genes in liver diseases: dsRNA-dependent protein kinase overexpression and RNase L inhibitor suppression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 32(5): 1089-1095.
- Zamanian-Daryoush, M., Mogensen, T. H., DiDonato, J. A. and Williams, B. R.** (2000). NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. *Mol Cell Biol* 20(4): 1278-1290.
- Zhang, L., Alter, H. J., Wang, H., Jia, S., Wang, E., Marincola, F. M., Shih, J. W. and Wang, R. Y.** (2013). The modulation of hepatitis C virus 1a replication by PKR is dependent on NF-kB mediated interferon beta response in Huh7.5.1 cells. *Virology* 438(1): 28-36.
- Zhang, X. J., Baase, W. A., Shoichet, B. K., Wilson, K. P. and Matthews, B. W.** (1995). Enhancement of protein stability by the combination of point mutations in T4 lysozyme is additive. *Protein Eng* 8(10): 1017-1022.
- Zhou, S., Gu, L., He, J., Zhang, H. and Zhou, M.** (2011). MDM2 regulates vascular endothelial growth factor mRNA stabilization in hypoxia. *Mol Cell Biol* 31(24): 4928-4937.

Zitzmann, N., Mehta, A. S., Carrouee, S., Butters, T. D., Platt, F. M., McCauley, J., Blumberg, B. S., Dwek, R. A. and Block, T. M. (1999). Imino sugars inhibit the formation and secretion of bovine viral diarrhoea virus, a pestivirus model of hepatitis C virus: implications for the development of broad spectrum anti-hepatitis virus agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21): 11878-11882.

8 Anhang

Die Experimente bezüglich dem Nachweis der viralen Replikation (HCV- und WNV-Replikonsystem), der Etablierung der siRNA-vermittelten Depletion von PKR und RIG I, der Transfektion von Huh7.5-Zellen, der siRNA-vermittelten Depletion von JAK1 in transient mit dem HCV-Replikon transfizierten Huh7-Zellen, sowie der VEGF-A-mRNA-Stabilität in Huh7-Zellen und der persistenten Zelllinie nach Behandlung mit Tunicamycin sind unter Beteiligung von Fr. Dipl. Biol. Winkler entstanden.

8.1 Verwendete Oligonukleotide und siRNAs

Die Synthese der Oligonukleotide für PCR-Amplifikationen und Sequenzierreaktionen, sowie der siRNAs erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D). Die Sequenzen und Verwendungszwecke der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8.1 zusammengefasst. Die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs wurden in dem vom Hersteller bereitgestellten Puffer (6 mM HEPES; 20 mM KCl; 0,2 mM MgCl₂; pH 7,3) gelöst (100 pmol/μl) und bei -20°C gelagert. Die Sequenzen der verwendeten siRNAs können ebenfalls Tabelle 8.1 entnommen werden.

Tabelle 8.1: verwendete Oligonukleotide und siRNAs

Name	Sequenz (5´-3´-Orientierung)	Verwendungszweck
qRT-PCR-Primer		
BVDV-f	CACATCTTAACCTGGACAGG	Nachweis der BVDV-RNA: Primer <i>forward</i>
BVDV-r	TATACTGGTTCCTCCACTCC	Nachweis der BVDV-RNA: Primer <i>reverse</i>
CHOP-f	CAGATGAAAATGGGGGTACCTA	Nachweis der humanen CHOP-mRNA: Primer <i>forward</i>
CHOP-r	TCAAGAGTGGTGAAGATTTTGAT	Nachweis der humanen CHOP-mRNA: Primer <i>reverse</i>
GAPDH-f	AGCCTCAAGATCATCAGCAATGC	Nachweis der humanen GAPDH-mRNA: Primer <i>forward</i>
GAPDH-r	ATGGCATGGACTGTGGTCATG	Nachweis der humanen GAPDH-mRNA: Primer <i>reverse</i>
GRP78-f	GTTCTTGCCGTTCAAGGTGG	Nachweis der humanen GRP78-mRNA: Primer <i>forward</i>
GRP78-r	TGGTACACTAACAACCTGCAGT	Nachweis der humanen GRP78-mRNA: Primer <i>reverse</i>
IFNβ-f	AGGAGGACGCCGCATTGACC	Nachweis der humanen IFNβ-mRNA: Primer <i>forward</i>
IFNβ-r	GATGATAGACATTAGCCAGGAGGT TCTCAAC	Nachweis der humanen IFNβ-mRNA: Primer <i>reverse</i>
IkBα-f	GTCAAGGAGCTGCAGGAGAT	Nachweis der humanen IkB-α-mRNA: Primer <i>forward</i>
IkBα-r	ATGGCCAAGTGCAGGAAC	Nachweis der humanen IkB-α-mRNA: Primer <i>reverse</i>
JAK1-f	TGCGCACGGATAACATCA	Nachweis der humanen JAK1-mRNA: Primer <i>forward</i>
JAK1-r	CACCAGCAGGTTGGAGATTT	Nachweis der humanen JAK1-mRNA: Primer <i>reverse</i>
JFH1-NS3-f	TCGACGTTGTTACAAGGTCTCC	Nachweis der HCV-NS3-RNA: Primer <i>forward</i>
JFH1-NS3-r	CTGCCAGTTGGAGCATGC	Nachweis der HCV-NS3-RNA: Primer <i>reverse</i>
Sindbis-f	GCCAGTAGTAAACGTAGACG	Nachweis der Sindbis-RNA: Primer <i>forward</i>
Sindbis-r	CATGGTCATTTGGAGTGACC	Nachweis der Sindbis-RNA: Primer <i>reverse</i>
VEGF-f	GTACCCTGATGAGATCGAGTAC	Nachweis der humanen VEGF-A-mRNA (erkennt alle VEGF-A-Isoformen): Primer <i>forward</i>
VEGF-r	GGCCTTGGTGAGGTTTGATC	Nachweis der humanen VEGF-A-mRNA (erkennt alle VEGF-A-Isoformen): Primer <i>reverse</i>
WNV-NS5-f	AGAGTTCGGAAGGCCAAG	Nachweis der WNV-NS5-RNA: Primer <i>forward</i>
WNV-NS5-r	CAGAGCCTCGAACTCCAGAA	Nachweis der WNV-NS5-RNA: Primer <i>reverse</i>
XBP1-f	TTACGAGAGAAAACCTCATGGCC	Nachweis der humanen XBP1-mRNA (beide Spleiß-Varianten): Primer <i>forward</i>
XBP1-r	GGGTCCAAGTTGTCCAGAATGC	Nachweis der humanen XBP1-mRNA (beide Spleiß-Varianten): Primer <i>reverse</i>
reverse-Primer für cDNA-Erststrangsynthese		
BVDV-RT	CAGCTAAAGTGCTGTGTGC	cDNA-Synthese (BVDV- und BVDV -mut-RNA)
JFH-RT	CGCTCTAAGCTGACGGTG	cDNA-Synthese (HCV- und HCV-mut-RNA)

Oligo(dT)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	cDNA-Synthese (polyadenylierte RNA)
Sindbis-RT	ATTGTCTACCTCATACCGGG	cDNA-Synthese (Sindbis-RNA)
WNV-RT	CGCAGACTGCACTCTCCG	cDNA-Synthese (WNV- und WNV-mut-RNA)
Klonierungs-Primer		
eIF2 α -f	CGGGATCCATGCCGGGTCTAAGTTG TAG	Klonierung von eIF2 α (WT) in pcDNA3: Primer <i>forward</i> , enthält Erkennungssequenz für BamHI
eIF2 α -r	ACCGCTCGAGTTAATCTTCAGCTTT GGCTTC	Klonierung von eIF2 α (WT) in pcDNA3: Primer <i>reverse</i> , enthält Erkennungssequenz für XhoI
eIF2 α _S51D-f	GGCATGATTCTTCTTAGTGAATTAG ACAGAAGGCGTATCCGTTTC	Generierung von pcDNA3_eIF2 α S51D: Primer <i>forward</i>
eIF2 α _S51D-r	GAACGGATACGCCTTCTGTCTAATT CACTAAGAAGAATCATGCC	Generierung von pcDNA3_eIF2 α S51D: Primer <i>reverse</i>
FLAG-f	GATCCGATTACAAGGATGACGACGA TAAGTAAC	Klonierung von C-terminalem FLAG-tag: Primer <i>forward</i> , Ligation über BamHI
FLAG-r	TCGAGTTACTTATCGTCGTCATCCT TGTAATCG	Klonierung von C-terminalem FLAG-tag: Primer <i>reverse</i> , Ligation über XhoI
HCV_IRES-f	CGGGATCCACCTGCCCTAATAGGG GC	Klonierung der HCV-IRES-Fragmente in pcDNA3: Primer <i>forward</i> , enthält Erkennungssequenz für BamHI
HCV_IRES_SL1-2-r	ACCGCTCGAGGGTCTGGAGGCAG TAC	Klonierung des HCV-IRES-Fragments SL1-2 (umfasst <i>stem loops</i> I und II) in pcDNA3: Primer <i>reverse</i> , enthält Erkennungssequenz für XhoI
HCV_IRES_SL1-3-r	ACCGCTCGAGTCTACGAGACCTCCC GGG	Klonierung des HCV-IRES-Fragments SL1-3 (umfasst <i>stem loops</i> I, II und III) in pcDNA3: Primer <i>reverse</i> , enthält Erkennungssequenz für XhoI
HCV_IRES_SL1-4-r	ACCGCTCGAGGGCGACGGTTGGTGT TTC	Klonierung des HCV-IRES-Fragments SL1-4 (umfasst <i>stem loops</i> I, II, III und IV) in pcDNA3: Primer <i>reverse</i> , enthält Erkennungssequenz für XhoI
HDVr-f	AGGGGGTCCGGCATGGCATCTCCACC TCCTCGCGGTCCGACCTGGGCTAC	Generierung des HDV-Ribozyms: Primer <i>forward</i>
HDVr-r	GGGCTTCTCCCTTAGCCTACCGAAG TAGCCAGGTCCGACCGCGAGGA	Generierung des HDV-Ribozyms: Primer <i>reverse</i>
I κ B- α -5'UTR-f	CCCAAGCTTAGCCACAGCAGTCCG TG	Generierung der I κ B- α -5'UTR für Fusion mit <i>firefly</i> -Luciferase: Primer <i>forward</i> , enthält Erkennungssequenz für HindIII
I κ B- α -5'UTR-r	GACCATGAAGACCGGGCGCGGACGA GCTGCGGG	Generierung der I κ B- α -5'UTR für Fusion mit <i>firefly</i> -Luciferase: Primer <i>reverse</i> , enthält Erkennungssequenz für BpI
I κ B- α -Luci-f	GACCATGAAGACCGCGCCATGGAAG ACGCCAAAACATAAAGAAAGG	Generierung der <i>firefly</i> -Luciferase für Fusion mit I κ B- α -UTRs: Primer <i>forward</i> , enthält Erkennungssequenz für BpI
I κ B- α -Luci-r	GACCATGAAGACCGGCGCTTACAAT TTGGACTTTCCGCCCTTC	Generierung der <i>firefly</i> -Luciferase für Fusion mit I κ B- α -UTRs: Primer <i>reverse</i> , enthält Erkennungssequenz für BpI
I κ B- α -3'UTR-f	GACCATGAAGACCGGCGCAAAGGGG CTGAAAGAAC	Generierung der I κ B- α -3'UTR für Fusion mit <i>firefly</i> -Luciferase: Primer <i>forward</i> , enthält Erkennungssequenz für BpI
I κ B- α -3'UTR-r	ACCGCTCGAGTTTTTTTTTTTTTCA TTTTGTAATAATCTG	Generierung der I κ B- α -3'UTR für Fusion mit <i>firefly</i> -Luciferase: Primer <i>reverse</i> , enthält Erkennungssequenz für XhoI
PKR_KD-f	CGGGATCCATGTCAGTGAAATCTGA CTACCTGTCC	Klonierung der konstitutiv aktiven PKR-Variante (PKR-KD): Primer <i>forward</i> , enthält Erkennungssequenz für BamHI, sowie Startcodon (ATG, gelb markiert)
PKR_KD-r	ACCGCTCGAGTTATTACTAACATGT GTGTCGTTTCAATTTTC	Klonierung der konstitutiv aktiven PKR-Variante (PKR-KD): Primer <i>reverse</i> , enthält Erkennungssequenz für XhoI, sowie 2 Stopcodons (TAATAA, gelb markiert)
PKR_WT-f	CCCAAGCTTATGGCTGGTATCTTT CAGCAG	Klonierung von PKR (WT) in pcDNA3: Primer <i>forward</i> , enthält Erkennungssequenz für HindIII
PKR_WT-r	CGGGATCCACATGTGTGTCGTTTCAT TTTTCTCTGG	Klonierung von PKR (WT) in pcDNA3: Primer <i>reverse</i> , enthält Erkennungssequenz für BamHI
T7-f	AATTCTAATACGACTCACTATA GGGG	Klonierung der T7-Promotor-Sequenz: Primer <i>forward</i>
T7-r	GATCCCCCTATAGTGAGTCGTA TTAG	Klonierung der T7-Promotor-Sequenz: Primer <i>reverse</i>

siRNAs		
siRIG-I human	GGAAGAGGTGCAGTATATT	siRNA-vermittelte Depletion des humanen RIG I
siPKR human	CAGCCAAAUUAGCUGUUGA	siRNA-vermittelte Depletion des humanen PKR
siGFP	GGCUACGUCCAGGAGCGCA	Kontroll-siRNA
siJAK1 human	GCCUGAGAGUGGAGGUAAC	siRNA-vermittelte Depletion des humanen JAK1
siTIA-1 human	AUUCGAGUCUUCCAGAU	siRNA-vermittelte Depletion des humanen TIA-1 (beide Isoformen)

Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind durch Unterstreichung hervorgehoben.

8.2 Verwendete Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 8.2 zusammengefasst.

Tabelle 8.2: verwendete Antikörper

Antikörper	Anwendung	Firma	Bestellnr.
primäre Antikörper			
Anti-BVDV-NS3	WB (1:1000), IF (1:100)	Prof. Dr. E.J. Dubovi, Cornell University, NY, USA	-
Anti-eIF2 α	WB (1:500)	Santa Cruz, USA	sc -11386
Anti-eIF2 α -P	WB (1:500)	Santa Cruz, USA	sc -101670
Anti-FLAG	WB (1:1000)	Agilent, USA	200472-21
Anti-GAPDH	WB (1:10000)	Santa Cruz, USA	sc-47724
Anti-HCV-NS5A	WB (1:1000); IF (1:500)	Eurogentec, Belgien	-
Anti-HCV-NS5B	WB (1:1000); IF (1:500)	Eurogentec, Belgien	-
Anti-I κ B- α	WB (1:500); IP	Santa Cruz, USA	sc-371
Anti-LaminA	WB (1:1000)	Sigma-Aldrich, USA	L1293
Anti-NF κ B	WB (1:500); IP	Santa Cruz, USA	sc -372
Anti-PKR	WB (1:500)	Cell Signaling, UK	3072
Anti-PKR-P	WB (1:500)	Santa Cruz, USA	sc -101784
Anti-RIG I	WB (1:500)	Santa Cruz, USA	sc -376882
Anti-TIA-1	WB (1:1000); IF (1:200)	Santa Cruz, USA	sc -1751
Anti-Vinculin	WB (1:2000)	Sigma-Aldrich, USA	V9131
Anti-WNV-NS5	WB (1:2000), IF (1:1000)	Eurogentec, Belgien	-
sekundäre Antikörper			
Anti-mouse IgG, Alexa Fluor 555	IF (1:500)	life technologies™ (Carlsbad, USA)	A-21422
Anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488	IF (1:500)	life technologies™ (Carlsbad, USA)	A-11008
Anti-mouse IgG, IRDye® 680LT/800CW	WB (1:5000-1:15000)	Li-Cor, Lincoln, USA	925-68022/ 925-32212
Anti-rabbit IgG, IRDye® 680LT/800CW	WB (1:5000-1:15000)	Li-Cor, Lincoln, USA	925-68023/ 925-32213
Anti-goat IgG, IRDye® 800CW	WB (1:5000-1:15000)	Li-Cor, Lincoln, USA	925-32214

8.3 Verwendete Plasmide und deren Konstruktion

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 8.3 zusammengefasst.

Tabelle 8.3: verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Charakteristika	Referenz/Herkunft
Expressions- und Klonierungsvektoren			
pBlueskript II SK+	Amp ^r	Klonierungsvektor	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
pcDNA™3.1	Amp ^r , Neo ^r	Expressionsvektor	life technologies™ (Carlsbad, CA, USA)

pcDNA5/TO	Amp ^r	Expressionsvektor	life technologies™ (Carlsbad, CA, USA)
pBlue_VEGF-Luci	Amp ^r	<i>firefly</i> -Luciferase in pBluescript KS+, flankiert von 5' und 3' UTR des humanen VEGF-A	Dr. Sebastian de Vries, (De Vries 2014)
pcDNA3_eIF2α	Amp ^r , Neo ^r	Expressionsvektor; eIF2α, human (Wildtyp) in pcDNA3	diese Arbeit
pcDNA3_eIF2α S51D	Amp ^r , Neo ^r	Expressionsvektor; eIF2α, human, pseudophosphoryliert (S51D) in pcDNA3	diese Arbeit
pcDNA3-ff-Luci- IkB-α-UTRs	Amp ^r , Neo ^r	<i>firefly</i> -Luciferase in pcDNA3, flankiert von 5' und 3' UTR des humanen IkB-α	diese Arbeit
pcDNA3-HCV- IRES-SL1-2	Amp ^r , Neo ^r	<i>stemloops</i> I bis II der HCV-IRES in pcDNA3 (Nukletid 1-132)	diese Arbeit
pcDNA3-HCV- IRES-SL1-3	Amp ^r , Neo ^r	<i>stemloops</i> I bis III der HCV-IRES in pcDNA3 (Nukletid 1-331)	diese Arbeit
pcDNA3-HCV- IRES-SL1-4	Amp ^r , Neo ^r	<i>stemloops</i> I bis IV der HCV-IRES in pcDNA3 (Nukletid 1-397)	diese Arbeit
pcDNA3_PKR	Amp ^r , Neo ^r	Expressionsvektor, PKR, human (Wildtyp) in pcDNA3 mit N-terminalem FLAG- <i>tag</i>	Dipl. Biol. Eileen Winkler *
pcDNA3_PKR-KD	Amp ^r , Neo ^r	Expressionsvektor; PKR, human, Deletion der dsRBD (Aminosäureposition 2-170) in pcDNA3	diese Arbeit
pcDNA5/TO-IFNβ	Amp ^r	Expressionsvektor; IFNβ, human	Dr. René Geißler*
pFLAG-TIA-1vl	Amp ^r , Neo ^r	Expressionsvektor; TIA-1-Isoform 1 (kurz) in pcDNA3 mit N-terminalem FLAG- <i>tag</i>	Dipl. Biol. Eileen Winkler *
pFLAG-TIA-1vll	Amp ^r , Neo ^r	Expressionsvektor; TIA-1-Isoform 2 (lang) in pcDNA3 mit N-terminalem FLAG- <i>tag</i>	Dipl. Biol. Eileen Winkler *
pIRES2-eGFP	Kan ^r , Neo ^r	Expressionsvektor	Clontech laboratories, Mountain View, USA
pIRES2-eGFP-T7	Kan ^r , Neo ^r	pIRES2-eGFP-Expressionsvektor mit T7-Promotor-Sequenz <i>upstream</i> der EMCV-IRES	diese Arbeit
pVEGF-3'UTR	Amp ^r	humane VEGF-A-3'UTR in pBluescript	Dr. Sebastian de Vries (Martin-Luther-Universität, Halle, D)
pVEGF-5'UTR	Amp ^r	humane VEGF-A-5'UTR in pBluescript	Susan Weinlich (Martin-Luther-Universität, Halle, D)
Für virale Replikon-RNAs codierende Plasmide			
HCV-JFH-pUC18	Amp ^r	Derivat des pSGR-JFH1-Replikon (Kato <i>et al.</i> 2003) mit HDV-Ribozym (HDVr) <i>downstream</i> der 3'UTR	Dr. René Geißler* (pSGR-JFH1: Prof. Dr. Takaji Wakita, NIID, Tokyo; <i>mta</i>), (Geißler 2012)
HCV-GND-pUC18	Amp ^r	Derivat des pSGR-JFH1-Replikon (Kato <i>et al.</i> 2003) mit HDV-Ribozym (HDVr) <i>downstream</i> der 3'UTR und Aminosäureaustausch in NS5B _{D318N} , replikationsdefizient	Dr. René Geißler*, (Geißler 2012)
pDI9c		codiert für DI9c-Replikon (BVDV, Stamm: cp7)	Dr. Claus W. Grassmann, (Behrens <i>et al.</i> 1998)
pDI9c-mut		codiert für DI9c-Replikon (BVDV, Stamm: cp7) mit Aminosäureaustausch NS5B _{D448T} und NS5B _{D449R} , replikationsdefizient	Dr. Claus W. Grassmann, (Behrens <i>et al.</i> 1998)
pDI9c-HDVr	Amp ^r	Derivat des pDI9c, codiert für DI9c-Replikon, mit HDV-Ribozym (HDVr) <i>downstream</i> der 3'UTR	diese Arbeit
pDI9c-mut-HDVr	Amp ^r	Derivat des pDI9c, codiert für DI9c-Replikon, mit HDV-Ribozym (HDVr) <i>downstream</i> der 3'UTR und Aminosäureaustausch NS5B _{D448T} und NS5B _{D449R} , replikationsdefizient	diese Arbeit
pSinRep5	Amp ^r	Expressionsvektor, codiert für Sindbis-Replikon	life technologies™ (Carlsbad, CA, USA)
pWNV-HDVr	Amp ^r	Derivat des pWNV-Replikon Stamm NY2000-crow3356 (Shi <i>et al.</i> 2002) mit HDV-Ribozym (HDVr) <i>downstream</i> der 3'UTR	Dr. Susann Friedrich*, (Friedrich 2014)
pWNV-mut-HDVr	Amp ^r	Derivat des pWNV-Replikon Stamm NY2000-crow3356 (Shi <i>et al.</i> 2002) mit HDV-Ribozym (HDVr) <i>downstream</i> der 3'UTR und Aminosäureaustausch in NS5 _{D669A} , replikationsdefizient	Dr. Susann Friedrich*, (Friedrich 2014)

*Mitarbeiter/in der Arbeitsgruppe Mikrobielle Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg

Plasmidkonstruktion

pcDNA3-Expressionskonstrukte: Der pcDNA3-Expressionsvektor ermöglicht die konstitutive Genexpression in humanen Zellen. Er vermittelt eine Resistenz gegenüber Ampicillin, wodurch die Vermehrung und Selektion in *E. coli*-Zellen erleichtert wird.

pcDNA3_eIF2 α : Die für das humane eIF2 α codierende Sequenz wurde durch RT-PCR von Gesamt-RNA aus Huh7-Zellen mit den Primern eIF2 α -f und eIF2 α -r amplifiziert und über die BamHI- und XhoI-Restriktionsschnittstellen in den pcDNA3-Vektor ligiert.

pcDNA3_PKR: Die für die humane PKR codierende Sequenz wurde durch RT-PCR von Gesamt-RNA aus Huh7-Zellen mit den Primern PKR_WT-f und PKR_WT-r amplifiziert und über die HindIII- und BamHI-Restriktionsschnittstellen in den pcDNA3-Vektor ligiert. In einer weiteren PCR wurde unter Verwendung der Primer FLAG-f und FLAG-r die für den FLAG-tag codierende Sequenz ebenfalls amplifiziert und über die BamHI und XhoI-Schnittstellen an das 3'Ende der für die PKR codierenden Sequenz ligiert, wodurch bei Expression dieser Sequenz ein PKR-FLAG-Fusionsprotein (FLAG C-terminal) synthetisiert wird. Dieses Plasmid wurde von Fr. Dipl. Biol. Eileen Winkler zur Verfügung gestellt.

pcDNA3_PKR_KD: Die für die Aminosäuren 171-551 der humanen PKR codierende Sequenz wurde von pcDNA3_PKR durch PCR mit den Primern PKR_KD-f und PKR_KD-r amplifiziert und über die BamHI- und XhoI-Restriktionsschnittstellen in den pcDNA3-Vektor ligiert. Mittels der verwendeten Primer wurden zusätzlich ein Translationsstartcodon (*forward*-Primer, *upstream* der für die PKR codierenden Region), sowie zwei Translationsstopcodons (*reverse*-Primer, *downstream* der für die PKR codierenden Region) eingeführt.

pcDNA3_eIF2 α S51D: Dieses Plasmid codiert für eine phosphomimetische Variante des humanen eIF2 α . Die Generierung des Plasmids erfolgte mittels ortsgerichteter Mutagenese unter Verwendung der Primer eIF2 α _S51D-f und eIF2 α _S51D-r und der DNA des pcDNA3_eIF2 α -Plasmids als Template. Dabei wurde durch die ortsgerichtete Mutagenese ein Serin an Aminosäureposition 51 des humanen eIF2 α gegen ein Aspartat substituiert.

pcDNA3_HCV-IRES_SL1-2/ pcDNA3_HCV-IRES_SL1-3/ pcDNA3_HCV-IRES_SL1-4: Mittels PCR wurden für bestimmte Fragmente der HCV-IRES codierende Sequenzbereiche von HCV-JFH-pUC18 amplifiziert. Die generierten Konstrukte codieren alle für am 3'Ende verkürzte subgenomische virale RNA-Moleküle, welche das authentische 5'Ende der viralen RNA codieren. Für die Amplifikation wurde als *forward*-Primer jeweils HCV_IRES-f verwendet, welcher zusätzlich für die BamHI-Erkennungssequenz codiert. Als *reverse*-Primer dienen HCV_IRES_SL1-2-r (pcDNA3_HCV-IRES_SL1-2: codiert für stem loops I und II der HCV-IRES), HCV_IRES_SL1-3-r (pcDNA3_HCV-IRES_SL1-3: codiert für stem loops I, II und III der HCV-IRES) und HCV_IRES_SL1-4-r (pcDNA3_HCV-IRES_SL1-4: codiert für stem loops I, II, III und IV der HCV-IRES). Die *reverse*-Primer codieren zusätzlich für die XhoI-Erkennungssequenz. Die generierten PCR-Produkte wurden über die BamHI- und XhoI-Restriktionsschnittstellen in den pcDNA3-Vektor ligiert.

Sonstige Plasmide:

pBlue_VEGF-Luc: Dieses Konstrukt wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Sebastian de Vries. Es basiert auf dem Klonierungsvektor pBluscript KS+ und beinhaltet die für die firefly-Luciferase codierende Sequenz, welche von der humanen VEGF-A-5'UTR und -3'UTR flankiert wird.

pcDNA3-ff-Luci-I κ B- α -UTRs: Mittels PCR wurden durch RT-PCR von Gesamt-RNA aus Huh7-Zellen mit den Primern I κ B- α -5'UTR-f und I κ B- α -5'UTR-r die 5'UTR und mit den Primern I κ B- α -3'UTR-f und I κ B- α -3'UTR-r die 3'UTR des humanen I κ B- α amplifiziert. Des Weiteren wurde von pBlue_VEGF-Luci durch PCR mit den Primern I κ B- α -Luci-f und I κ B- α -Luci-r die für die *firefly*-Luciferase codierende Sequenz amplifiziert. Durch Restriktionshydrolyse der resultierenden PCR-Produkte mittels Bpil wurden komplementäre Überhänge generiert, die die Fusion der Fragmente in der Orientierung 5'UTR I κ B- α - *firefly*-Luciferase - 3'UTR I κ B- α ermöglichten. Mittels der von den Primern I κ B- α -5'UTR-f und I κ B- α -3'UTR-r codierten Restriktionsschnittstellen für HindIII und XhoI wurde diese Sequenz schließlich in den pcDNA3-Vektor ligiert.

pDI9c-HDVr und pDI9c-mut-HDVr: Diese Konstrukte wurden mittels Subklonierung generiert und stellen Derivate der von Dr. C. W. Grassmann (Behrens *et al.* 1998) zur Verfügung gestellten Plasmide pDI9c und pDI9c-mut dar. Dazu wurden zunächst die Plasmide pDI9c und pDI9c-mut mittels der Restriktionsendonukleasen ClaI und SmaI geschnitten und die resultierenden 1224 bp umfassenden Fragmente in den Klonierungsvektor pBlueskript II SK+ (ebenfalls mit ClaI und SmaI geschnitten) ligiert. Die erhaltenen Subklone (pBlue_DI9c, pBlue_DI9c-mut) wurden mittels SmaI linearisiert. Unter Verwendung der Primer HDVr-f und HDVr-r wurde die für ein Ribozym des Hepatitis-Delta-Virus codierende Sequenz (Länge: 67 bp) mittels PCR amplifiziert und in die linearisierten Plasmide pBlue_DI9c, pBlue_DI9c-mut ligiert. Die resultierenden Plasmide wurden wiederum mit den Restriktionsendonukleasen ClaI und SmaI geschnitten und die resultierenden, 1291 bp umfassenden Fragmente isoliert. Diese wurden mit den bei Restriktionshydrolyse der Plasmide pDI9c und pDI9c-mut mit ClaI und SmaI generierten größeren Fragmenten (ca. 8,8 kb; umfasst Vektor, sowie die für die Replikons DI9c- bzw. DI9c-mut codierende Sequenz, abzüglich der jeweiligen Sequenzbereiche, welche von den ClaI- und SmaI-Erkennungssequenzen flankiert werden) ligiert.

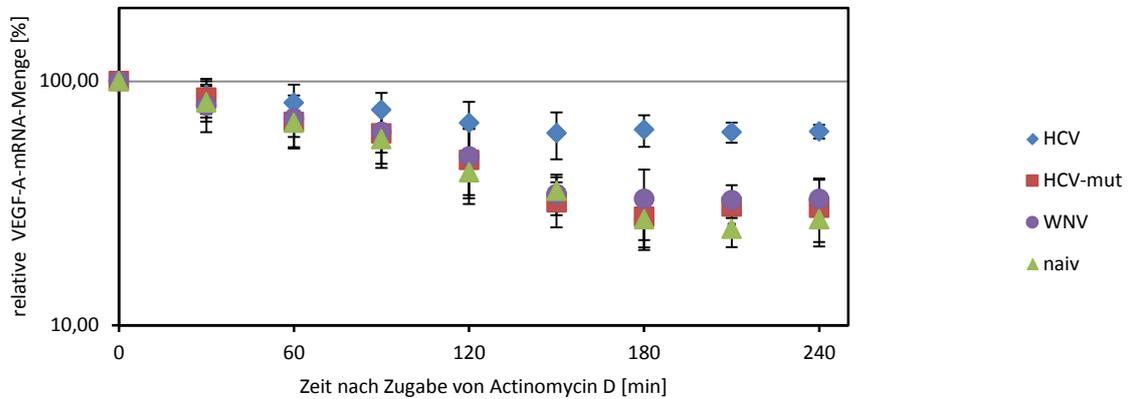
pIRES2-eGFP-T7: Der Expressionsvektor pIRES2-eGFP wurde mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI geschnitten und das resultierende größere Vektorfragment isoliert. Unter Verwendung der Primer T7-f und T7-r wurde die für den T7-Promotor codierende Sequenz generiert und mit dem präparierten pIRES2-eGFP-Vektorfragment ligiert. Die T7-Promotor-Sequenz ermöglicht die *in vitro* Transkription der eGFP-RNA.

8.4 VEGF-A-mRNA-Halbwertszeit

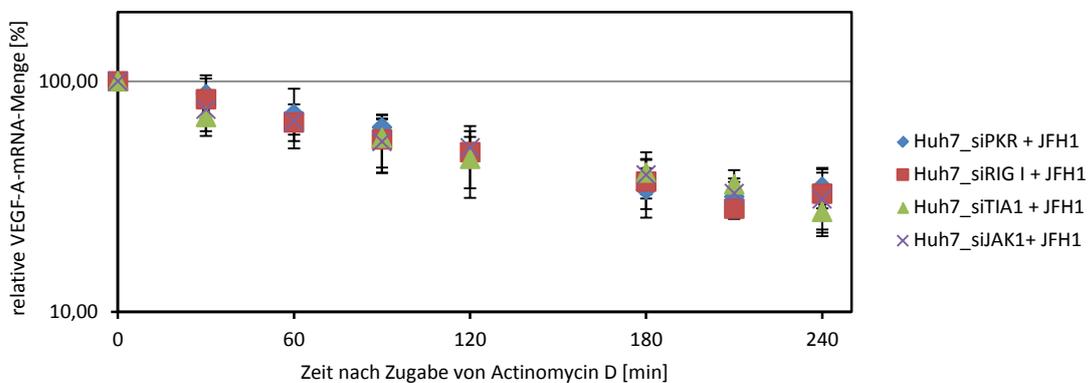
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die *in vivo* Degradation der VEGF-A-mRNA in Huh7-Zellen 48 h nach der transienten Transfektion mit diversen RNAs mittels Actinomycin D-Assay untersucht (vgl. Kapitel 3.2). Durch halblogarithmisches Auftragen der berechneten relativen Transkriptmengen gegen die Zeit nach erfolgter Actinomycin D-Zugabe kann die Halbwertszeit der VEGF-A-mRNA mittels exponentieller Regression bestimmt werden. Bei der Berechnung der Halbwertszeiten erwies sich die Berechnungsmethode als entscheidend. Innerhalb des Zeitraumes von 0-180 min nach der Zugabe von Actinomycin D konnte eine kontinuierliche Degradation der VEGF-A-mRNA beobachtet wer-

den. Bei ausschließlicher Betrachtung der Daten innerhalb dieses Zeitraums und unter der idealisierten Annahme, dass die VEGF-A-mRNA einer vollständigen Degradation unterliegt, wurden die Halbwertszeiten entsprechend der Formel $y = a * e^{b*x}$ berechnet (vgl. Tabelle 8.4, $t_{1/2VD}$).

A



B



C

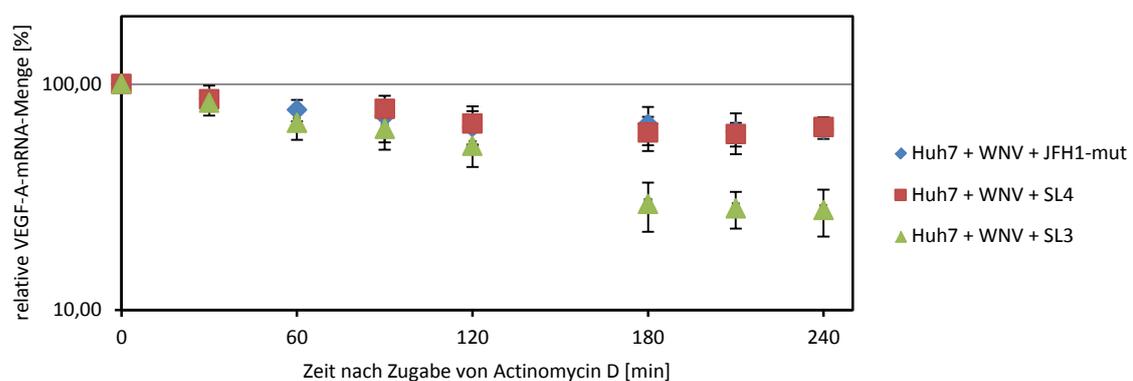


Abbildung 8.1: Halbwertszeiten der VEGF-A-mRNA *in vivo*. Die Actinomycin D-Assays zur Untersuchung der VEGF-A-mRNA-Degradation *in vivo* wurden 48 h *p.t.* durchgeführt. Dabei wurden über einen Zeitraum von 240 min Proben entnommen. Die Berechnung der relativen Transkriptmengen erfolgte mittels qRT-PCR. Für jeden Probenatz wurde die gemessene VEGF-A-mRNA-Menge zum Zeitpunkt 0 min als 100% definiert. Die Transkriptmengen der übrigen Zeitwerte sind als Relativwerte, bezogen auf den 100%-Wert, angegeben. Zur Ermittlung der VEGF-A-mRNA-Halbwertszeit wurden die relativen Transkriptmengen halblogarithmisch gegen die Zeit nach Actinomycin D-Zugabe aufgetragen.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die VEGF-A-mRNA *in vivo* keiner vollständigen Degradation unterliegt, sondern die detektierbare Transkriptmenge ab 180 min nach Zugabe von Actinomycin D weitgehend konstant bleibt. Bei Betrachtung aller Daten zwischen 0 und 240 min nach Zugabe von Actinomycin D und unter Beachtung der unvollständigen Degradation wurden die Halbwertszeiten

entsprechend der Formel $y = a * e^{b*x} + c$ berechnet (vgl. Tabelle 8.4, $t_{1/2off}$). Die resultierenden Halbwertszeiten sind in Tabelle 8.4 zusammengefasst. Abbildung 8.1 zeigt die zu Grunde liegenden Diagramme.

Tabelle 8.4. VEGF-A-mRNA-Halbwertszeiten

transfizierte RNA	$t_{1/2off}$	$t_{1/2vD}$
∅ (Huh7 naiv)	77 ± 10	97 ± 9
HCV	71 ± 12	227 ± 7
HCV-mut	92 ± 11	102 ± 4
WNV	95 ± 8	108 ± 15
siJAK1 + HCV	69 ± 19	119 ± 1
siPKR + HCV	100 ± 23	126 ± 6
siRIG I + HCV	78 ± 3	112 ± 6
siTIA-1 + HCV	67 ± 4	120 ± 14
WNV + HCV-mut	79 ± 16	222 ± 2
WNV + SL1-4	75 ± 1	226 ± 5
WNV + SL1-3	100 ± 4	116 ± 2

$t_{1/2off}$ – Halbwertszeit unter Berücksichtigung einer residualen mRNA-Menge (*offset*)

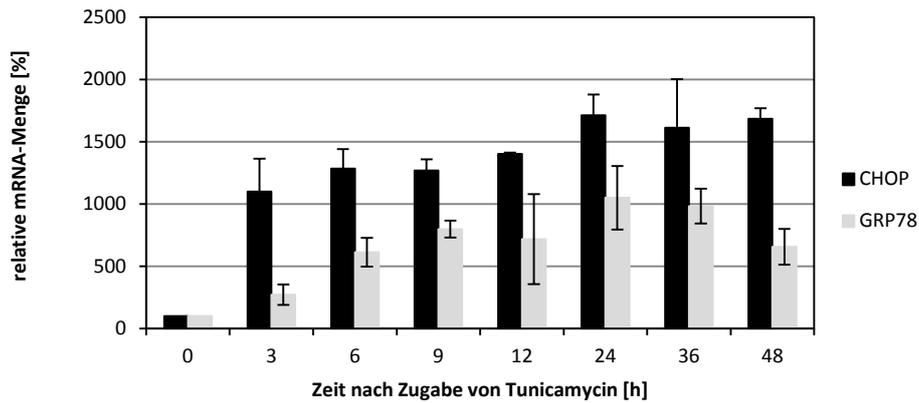
$t_{1/2vD}$ – Halbwertszeit unter der Annahme einer vollständigen mRNA-Degradation

8.5 Nachweis von ER-Stress in Huh7-Zellen

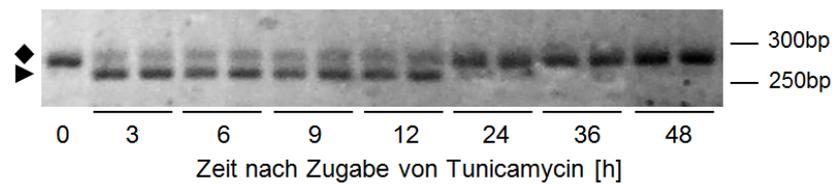
Zum Nachweis der ER-Stress-Induktion durch Tunicamycin wurden die Transkript-Mengen von GRP78 und CHOP in naiven, sowie in mit Tunicamycin stimulierten Huh7-Zellen mittels qRT-PCR quantifiziert (3 - 48 h nach Applikation von Tunicamycin). Sowohl GRP78, als auch CHOP sind in die ER-Stress-Antwort involviert und stellen gängige Marker zum Nachweis einer ER-Stress-Induktion dar (Samali *et al.* 2010).

Beide Transkripte lagen in den mit Tunicamycin stimulierten Zellen im Vergleich zu den naiven Zellen in stark erhöhten Mengen vor (Abbildung 8.2 A). Dabei wurde bei CHOP im Vergleich zu GRP78 eine stärkere und schnellere Induktion der Transkription beobachtet. Beide Transkripte lagen auch 48 h nach der Stimulation der Zellen mit Tunicamycin noch in stark erhöhten Quantitäten vor. Zusätzlich wurde das Spleißen der (XBP1)-mRNA untersucht. Auch der Nachweis dieses Spleiß-Vorganges zählt zu den gängigen Methoden zum Nachweis von ER-Stress (Samali *et al.* 2010). Mittels RT-PCR konnte unter Verwendung geeigneter Primer nachgewiesen werden, dass in den mit Tunicamycin stimulierten Huh7-Zellen zwei XBP1-Transkripte existieren (Abbildung 8.2 B). Das kürzere der beiden Transkripte konnte zwischen 3 h und 12 h nach Stimulieren der Zellen mit Tunicamycin nachgewiesen werden und repräsentiert die durch ERN1 geschnittene RNA. Des Weiteren erscheint die Menge des längeren Transkripts in diesem Zeitraum reduziert. Es ist jedoch anzumerken, dass die verwendete Methode für Quantifizierungen ungeeignet ist. Auch die Phosphorylierung von eIF2 α wurde zum Nachweis der ER-Stress-Induktion untersucht. Dabei wurde der Zeitraum von 0 - 24 h nach Tunicamycin-Zugabe betrachtet. Wie Abbildung 8.2 C zu entnehmen ist, konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung der Huh7-Zellen mit Tunicamycin die Phosphorylierung von eIF2 α induziert. Aus den erhaltenen Daten kann geschlussfolgert werden, dass durch Stimulation der Huh7-Zellen mit Tunicamycin ER-Stress induziert werden kann.

A



B



C

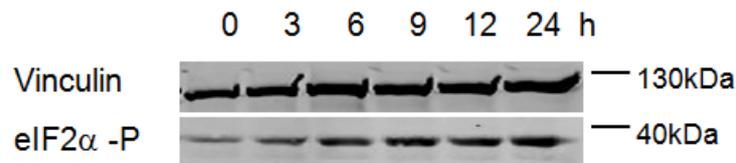


Abbildung 8.2: Nachweis von ER-Stress in Huh7-Zellen nach Behandlung mit Tunicamycin.: In Huh7-Zellen wurde durch Behandlung mit Tunicamycin ER-Stress induziert und die Zellen zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten geerntet. (A) Die relativen Transkriptmengen der ER-Stress-Marker CHOP und GRP78 wurden mittels qRT-PCR quantifiziert. Die gemessenen Transkriptmengen vor der Zugabe von Tunicamycin wurden als 100% definiert. (B) Repräsentatives 2%iges Agarosegel von PCR-Reaktionen zum Nachweis des XBP1-Transkripts. Unter Verwendung geeigneter Primer können mittels RT-PCR sowohl die ungespleißte (angedeutet durch Raute) als auch die gespleißte Variante (angedeutet durch Pfeilspitze) des XBP1-Transkripts nachgewiesen werden. Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte mittels Ethidiumbromid unter Anregung durch UV-Licht. (C) Repräsentativer Western Blot von Vinculin und eIF2 α -P zum Nachweis der eIF2 α -Phosphorylierung.

Publikationsliste

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Renner, I., Funk, N., Geissler, R., Friedrich, S., Penzel, A. and Behrens, S. E. (2014). Antiviral interferon-beta signaling induced by designed transcription activator-like effectors (TALE). *PLoS One* 9(12): e114288.

Winkler, E.* , Penzel, A.* , Poshtgohian Madi, A., Geißler, R., Aurich, H., Mensch, A., Stöhr, N., Friedrich, S., Hüttelmaier, S., Behrens, S.E. Hepatitis C virus RNA replication causes mRNA stabilization of vascular endothelial growth factor, which essentially involves one isoform of T-cell-restricted intracellular-antigen. Manuskript in Vorbereitung
**contributed equally to this paper*

Tagungsbeiträge

Penzel, A., Winkler, E., Poshtgohian Madi, A., Friedrich, S. & Behrens, S.E.: HCV-induced stabilization of the VEGF-A-mRNA is associated with the innate immune response. "25. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie", 18.03.2015-21.03.2015, Bochum

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Sven-Erik Behrens für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Abteilung anfertigen zu können. Des Weiteren möchte ich ihm für sein Vertrauen in mich und seine stetige Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, sowie Herrn Prof. Dr. Gregor Meyers danke ich recht herzlich für die freundliche Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung Mikrobielle Biotechnologie möchte ich mich für die angenehme Atmosphäre, die vielen anregenden Diskussionen und die konstruktive Zusammenarbeit bedanken. Hervorzuheben sind dabei die Mitarbeiter von Labor 513, die wesentlich dazu beigetragen haben, dass das Arbeiten stets auch Spaß gemacht hat. Christine Hamann danke ich für die Unterstützung in der Zellkultur.

Bei Eileen Winkler und Aniseh Poshtgohian Madi möchte ich mich besonders für die produktive Zusammenarbeit auf dem von uns gemeinsam bearbeiteten Projekt bedanken. Susann Friedrich, René Geißler und Eileen Winkler gilt mein Dank für diverse zur Verfügung gestellte Plasmide.

Herrn PD Dr. Ralph Golbik, Dr. René Geißler, Aniseh Poshtgohian Madi und Paul Knick danke ich für das zur Verfügung stellen diverser gereinigter Proteine.

Mein spezieller Dank gilt Dr. Susann Friedrich und Dr. Jana Schuck für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und ganz besonders Konrad für ihr Verständnis und die fortwährende Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Anika Penzel
 Geburtsdatum 22.11.1984
 Geburtsort Schkeuditz
 Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1995-2004 Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium , Merseburg
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1991-1995 Thomas-Müntzer Grundschule , Schkeuditz

Studium

2004-2009 Diplom-Studium (Biologie)
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Diplomarbeit: Replikations- und Interaktionsstudien mit gereinigter TBSV-Replikase und Hsc70
 Abschluss: Diplom-Biologin

Praktika und Arbeitserfahrung

Seit 02/2012 wissenschaftliche Mitarbeiterin Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Mikrobielle Biotechnologie
 Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens
 Projekt: Untersuchungen zum Einfluss der HCV-Replikation auf die zelluläre Genexpression

11/2009-02/2012 wissenschaftliche Mitarbeiterin Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Mikrobielle Biotechnologie
 Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens
 Projekt: Entwicklung neuer Strategien zur RNA-Vakzinierung

06/2007 – 08/2007,
 10/2007 – 12/2007 und
 04/2008 – 11/2008 wissenschaftliche Mitarbeiterin Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik, Abteilung Entwicklungsgenetik

03/2006 - 05/2006 und
 01/2007 - 12/2007 wissenschaftliche Mitarbeiterin Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik, Abteilung Pflanzengenetik

Halle (Saale), den 14.07.2015

Anika Penzel

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und alle im Wortlaut oder wesentlichen Inhalt übernommenen Formulierungen gemäß den Richtlinien wissenschaftlicher Arbeiten gekennzeichnet habe. Des Weiteren versichere ich, dass die Dissertation ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt wurde und ich mich erstmals für die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Halle (Saale), den 14.07.2015

Anika Penzel