



Hochschule Anhalt
Anhalt University of Applied Sciences



Untersuchung des humanen Proteins NF110 als Bindungspartner viraler RNAs

Abschlussarbeit zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science (M. Sc.)

vorgelegt von

Alexandra Prokoph
geboren am 28.05.1992
in Dessau

durchgeführt am

Institut für Biochemie und Biotechnologie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Erstgutachter:

Prof. Dr. habil. Hans-Jürgen Mägert
Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik
Hochschule Anhalt

Zweitgutachter:

PD Dr. habil. Ralph Golbik
Arbeitsgruppe Mikrobielle Biotechnologie
Institut für Biochemie und Biotechnologie

Abgabetermin:

16.11.2015

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Abschlussarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die vorliegende Abschlussarbeit nur in diesem und keinem anderen Prüfungsverfahren eingereicht habe. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Dessau-Roßlau, den 16.11.2015

Alexandra Prokoph

Danksagung

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Hans-Jürgen Mägert für die Begutachtung meiner Abschlussarbeit danken. In insgesamt 10 gemeinsamen Semestern hat er mich in die Welt der Gentechnik, Zellkulturtechnik und zellulären Signaltransduktion entführt, mich für den Blick ins molekulare Detail begeistert und mir stets mit Witz und Humor jeden noch so komplexen Stoffwechselweg nahe gebracht. Dafür möchte ich mich recht herzlich bedanken.

Für die Möglichkeit meine Abschlussarbeit in der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Biotechnologie“ anzufertigen, möchte ich Prof. Dr. Sven-Erik Behrens danken. Durch die Besprechungen und Seminare konnte ich mir einen Einblick in die Virologie verschaffen, wofür ich mich an dieser Stelle nochmals bedanken möchte.

Außerdem möchte ich meinen höchsten Dank PD Dr. Ralph Golbik für seine ausgezeichnete Betreuung aussprechen. Mein Dank gilt vor allem der hervorragenden Einweisung in die Thematik und bei den Geräten sowie seiner Akribie und Leidenschaft für die Proteinbiochemie und Enzymologie. Ohne seine wertvollen Ratschläge, Kniffe und Hilfestellungen wäre ich nicht zur Erstellung dieser Arbeit in der Lage gewesen. Vielen herzlichen Dank für die Geduld und Hilfe.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich Christine Hamann aussprechen. Auch sie stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite und konnte mir so manchen Trick verraten, der in keinem Handbuch steht. Auch für die Vorbereitung des NF110-Ausgangsmaterials möchte ich ihr meinen größten Dank aussprechen.

Mein spezieller Dank gilt Dr. Susann Friedrich, Dr. Hauke Lilie, Tobias Schmidt und Robert Pertermann, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten. Der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Biotechnologie“ danke ich für die fachlichen als auch witzigen Gespräche beim Mittagessen und Grillfest.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Danksagung	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Theoretische Grundlagen und Zielstellung	- 1 -
1.1 Das Protein NF110	- 1 -
1.1.1 <i>Nuclear Factor</i> 110 – ein Mitglied der NFAR-Proteine.....	- 1 -
1.1.2 Struktur motive von NF110 und ihre Wirkung.....	- 2 -
1.2 Biologische Funktion von NF110	- 7 -
1.2.1 NF110 als Interaktionspartner für Nukleinsäuren und Proteine	- 7 -
1.2.2 NF110 als Interaktionspartner für virale RNAs	- 11 -
1.2.3 NF110 als Faltungshelfer für RNAs.....	- 14 -
1.3 Zielstellung der Arbeit.....	- 17 -
2 Materialien und Geräte	- 18 -
2.1 Materialien.....	- 18 -
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	- 18 -
2.1.2 Oligonukleotide	- 18 -
2.1.3 Geräte	- 19 -
2.1.4 Software.....	- 20 -
3 Methoden	- 21 -
3.1 Chromatographische Methoden	- 21 -
3.1.1 Kationenaustauschchromatographie.....	- 21 -
3.1.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC).....	- 22 -
3.1.3 Affinitätschromatographie.....	- 23 -
3.1.4 Größenausschlusschromatographie bzw. Gelfiltration	- 24 -
3.2 Proteintechnische Methoden.....	- 25 -
3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	- 25 -
3.2.2 Dialyse der Proteinlösung	- 27 -
3.2.3 Einengen mittels Zentrifugalkonzentrator	- 27 -
3.2.4 Proteinfällung mit Trichloressigsäure	- 27 -
3.2.5 Dialyse zur Rückfaltung von NF110	- 28 -

3.3	Biophysikalische Methoden	- 28 -
3.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	- 28 -
3.3.2	Messung der Lichtstreuung	- 29 -
3.3.3	Analytische Ultrazentrifugation	- 29 -
3.3.4	Fluoreszenzphotometrische Bestimmung der Bindung von RNA	- 29 -
3.3.5	Herstellung radioaktiv markierter RNA	- 31 -
3.3.6	Filterbindungsassay	- 32 -
4	Ergebnisse	- 34 -
4.1	Chromatographische Reinigung von NF110	- 34 -
4.1.1	Kationenaustauschchromatographie - „ <i>Capture</i> “	- 34 -
4.1.2	Größenausschlusschromatographie - „ <i>Intermediate</i> “	- 35 -
4.1.3	Hydrophobe Interaktionschromatographie	- 36 -
4.1.4	Affinitätschromatographie – „ <i>Polishing</i> “	- 37 -
4.1.5	Übersicht zur erweiterten Reinigungsstrategie für NF110	- 38 -
4.2	Proteinchemische Charakterisierung von NF110	- 39 -
4.2.1	Reinheitsprüfung	- 39 -
4.2.2	Stabilisierung durch L-Arginin	- 40 -
4.2.3	Bestimmung der Aggregationstendenz	- 41 -
4.3	Bindung von RNA durch NF110	- 43 -
4.3.1	Bestimmung der Dissoziationskonstanten über Fluoreszenzmessung	- 43 -
4.3.2	Bestimmung der Dissoziationskonstanten über Filterbindungsassays	- 45 -
4.3.3	Auswertung über Lineare Freie Enthalpiebeziehung (LFER)	- 48 -
5	Diskussion	- 51 -
5.1	Proteinreinigung und Stabilität	- 51 -
5.2	NF110 als RNA-bindendes Protein	- 52 -
5.3	L-Arginin – Fluch oder Segen !?	- 54 -
6	Zusammenfassung und Ausblick	- 57 -
7	Literaturverzeichnis	- 60 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur motive von NF90 und NF110.	- 2 -
Abbildung 2: Röntgenkristallstruktur des NF45-NF90 Dimerisationsdömanen- Komplex.	- 3 -
Abbildung 3: Röntgenkristallstruktur des dsRBM II aus NF110.	- 4 -
Abbildung 4: NF90/NF110-RNA-Interaktom.....	- 8 -
Abbildung 5: NF90/NF110-Protein-Interaktom.....	- 10 -
Abbildung 6: Modell für die Zirkulation viraler RNA bedingt durch die Bindung von NFAR-Proteinen.....	- 12 -
Abbildung 7: Struktur der 5`-FAM-EX-5 markierten Oligonukleotide.....	- 30 -
Abbildung 8: Chromatogramm der Kationenaustauschchromatographie von denaturiertem NF110 und SDS-PAG ausgewählter Fraktionen.....	- 35 -
Abbildung 9: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von nativer NF110-Lösung und SDS-PAG ausgewählter Fraktionen.....	- 36 -
Abbildung 10: Chromatogramm der Affinitätschromatographie einer nativen NF110-Lösung und SDS-PAG ausgewählter Fraktionen.	- 37 -
Abbildung 11: Übersicht zur erweiterten Reinigungsstrategie von NF110.	- 38 -
Abbildung 12: Absorptionsspektrum einer gereinigten NF110-Lösung.	- 39 -
Abbildung 13: Untersuchung des Einflusses von L-Arginin auf die Stabilisierung bzw. Aggregationsneigung von NF110.....	- 41 -
Abbildung 14: Untersuchung der Aggregationsneigung von NF110 in Abhängigkeit von L-Arginin mittels analytischer Ultrazentrifugation.	- 42 -
Abbildung 15: Bindung von NF110 an verschiedene Oligonukleotide und Vergleich des Messsystems mit bzw. ohne Zusatz von L-Arginin.....	- 43 -

Abbildung 16: Test verschiedener Bedingungen zur Optimierung der Filterbindungsassays	- 46 -
Abbildung 17: Bestimmung der Dissoziationskonstante von NF110 und 16 ssRNA mittels Filterbindungsassay.....	- 48 -
Abbildung 18: Untersuchung des Einfluss von L-Arginin auf die Messung und LFER.....	- 49 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide.....	- 18 -
Tabelle 2: Verwendete Geräte	- 19 -
Tabelle 3: Verwendete Software	- 20 -
Tabelle 4: Zusammensetzung der Puffer A und B für die Kationenaustauschchromatographie.....	- 21 -
Tabelle 5: Zusammensetzung der Puffer A und B für die HIC.....	- 22 -
Tabelle 6: Zusammensetzung der Puffer A und B für die Affinitätschromatographie	- 23 -
Tabelle 7: Zusammensetzung des Laufpuffers für die Gelfiltration.....	- 24 -
Tabelle 8: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele.	- 25 -
Tabelle 9: Zusammensetzung der Materialien für die SDS-PAGE.....	- 26 -
Tabelle 10: Zusammensetzung des Rückfaltungspuffers.....	- 28 -
Tabelle 11: Zusammensetzung des Ansatzes zur radioaktiven Markierung.....	- 31 -
Tabelle 12: Zusammensetzung des Assaypuffers mit und ohne L-Arginin.....	- 32 -
Tabelle 13: Dissoziationskonstanten für die Bindung von NF110 zu diversen Nukleinsäuren.....	- 44 -
Tabelle 14: Vergleich der Dissoziationskonstanten [nM] von NF110 und NF90....	- 54 -

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Masseprozent
ϵ_{λ}	molarer Extinktionskoeffizient ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BVDV	bovines Virusdiarrhoe Virus
c	Konzentration ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
CV	Säulenvolumen, <i>column volume</i>
d	Schichtdicke (cm)
ds	doppelsträngig, <i>double stranded</i>
dsRBM	Bindungsmotiv für doppelsträngige RNAs
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E_{λ}	Extinktion, optische Dichte
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
FAM - Ex - 5	<i>Fluorescein – extended linker arm – 5-isomer</i>
Gdm-Cl	Guanidiniumchlorid
Gdm-SCN	Guanidiniumthiocyanat
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
<i>ILF3</i>	<i>interleukin enhancer-binding factor 3</i>
LFER	<i>linear free energy relationship</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NF	nuklearer Faktor, <i>nuclear factor</i>
NFAR	<i>nuclear factor associated with dsRNA</i>
NTR	nicht-translatierte Region, <i>non-translated region</i>
ORF	offener Leserahmen, <i>open reading frame</i>

PAG	Polyacrylamid-Gel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
poly I:C	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig, <i>single stranded</i>
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
vorl.	vorliegende
ZFD	Zinkfingerdomäne

1 Theoretische Grundlagen und Zielstellung

1.1 Das Protein NF110

1.1.1 *Nuclear Factor 110* – ein Mitglied der NFAR-Proteine

Beim Protein *nuclear factor 110* (NF110) handelt es sich um eine C-terminal verlängerte Isoform von NF90. Beide gehören zu einer Proteinfamilie, welche die Expressionsprodukte des humanen *ILF3*-Gens (*interleukin enhancer-binding factor 3*) umfasst (Duchange *et al.*, 2000; Saunders *et al.*, 2001).

Dieses Gen befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 19 und durch alternatives Spleißen seines Transkripts können neben den Proteinen NF110 und NF90 auch noch weitere Proteine entstehen (Marcoulatos *et al.*, 2000). Neben der Benennung nach dem Molekulargewicht von 90 kDa bzw. 110 kDa werden NF90 und NF110 auch als NFAR1 bzw. NFAR2 (*nuclear factor associated with dsRNA 1/2*) bezeichnet (Saunders *et al.*, 2001).

Die NFAR-Proteine bilden eine Gruppe sogenannter Wirtsfaktoren, welche eine entscheidende Rolle bei der Replikation von bovinem Virusdiarrhoe Virus (BVDV) oder dem nah verwandtem humanen Hepatitis C Virus spielen (Isken *et al.*, 2003).

An dieser Stelle ist auch auf die Bildung von Heterodimeren der NFAR-Proteine und ihrem Zusammenspiel zu verweisen. So konnten Studien von Guan *et al.* (2008) zeigen, dass sowohl NF90 als auch NF110 mit NF45 einen Komplex bilden können. Außerdem konnte NF45 als regulatorische Untereinheit festgemacht werden, da eine Senkung des NF45-Gehalts über RNAi-Experimente zum drastischen Verlust an NF90 und NF110 führte. Des Weiteren ergab die Studie, dass beide Proteine eine immense Rolle bei der Mitose und beim Zellwachstum spielen (Guan *et al.*, 2008).

Strukturell unterscheiden sich NF90 und NF110 um 196 Aminosäuren am C-Terminus, was vom alternativen Spleißen des *ILF3*-Transkripts herrührt. So enthält die mRNA für NF90 zwar das Exon 18, es fehlen aber die letzten drei Exons 19 bis 21. Beim NF110-Transkript verhält es sich genau umgekehrt, weshalb NF110 mit 894 Aminosäuren eine C-terminal verlängerte Isoform von NF90 (702 Aminosäuren) darstellt (Saunders *et al.*, 2001).

1.1.2 Struktur motive von NF110 und ihre Wirkung

Da NF90 und NF110 den selben genetischen Ursprung, das *ILF3*-Gen, besitzen, ähneln sich beide auch in ihrer Aminosäuresequenz und den daraus resultierenden Strukturen (s. Abbildung 1). So besitzen beide Proteine eine Zinkfingerdomäne (ZFD), ein Kernlokalisierungssignal (NLS), zwei Bindungsmotive für doppelsträngige RNAs (dsRBM) und ein RGG-Motiv, das reich an Arginin und Glycin ist. Außerdem kann sowohl NF90 als auch NF110 durch eine Insertion der NVKQ-Sequenz um 4 Aminosäuren (Asparagin, Valin, Lysin, Glutamin) verlängert vorliegen. Diese Varianten werden als NF90b bzw. NF110b bezeichnet.

NF110 stellt eine um 192 Aminosäuren verlängerte Isoform von NF90 dar. Dabei wird carboxyterminal ein GQSY-Motiv gebildet, das reich an Glycin, Glutamin, Serin und Tyrosin ist. Dieses und die gemeinsamen Struktur motive werden im Folgenden näher erläutert.

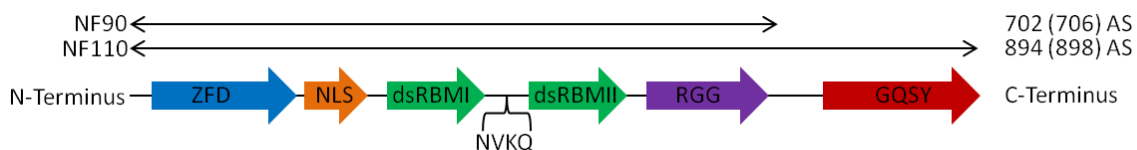


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur motive von NF90 und NF110.

Homologievergleich von NF90 und NF110. Von links: N-Terminus, Zinkfingerdomäne (ZFD), *nuclear localisation signal* (NLS), Bindungsmotive für doppelsträngige RNA (dsRBM I und dsRBM II) mit/ohne Insertion der NVKQ-Sequenz, Arginin-Glycin-Glycin-Motiv (RGG-Motiv), Glycin-, Glutamin-, Serin- und Tyrosin-haltige Region (GQSY), C-Terminus. Bei Insertion des Tetrapeptids NVKQ wird das Protein als NF90b bzw. NF110b bezeichnet. Abbildung modifiziert nach Patino *et al.*, 2014.

1.1.2.1 Die Zinkfingerdomäne (ZFD)

Die Zinkfingerdomäne wird auch als Homologiedomäne zu NF45 bezeichnet. Durch Röntgenkristallstrukturanalysen konnten Wolkowicz und Cook (2012) beweisen, dass NF45 über die Zinkfingerdomäne an NF90 und andere ZFD-Proteine bindet. Dabei bilden die Helices jeder ZFD symmetrische Strukturen und es kommt zur Dimerisierung (s. Abbildung 2).

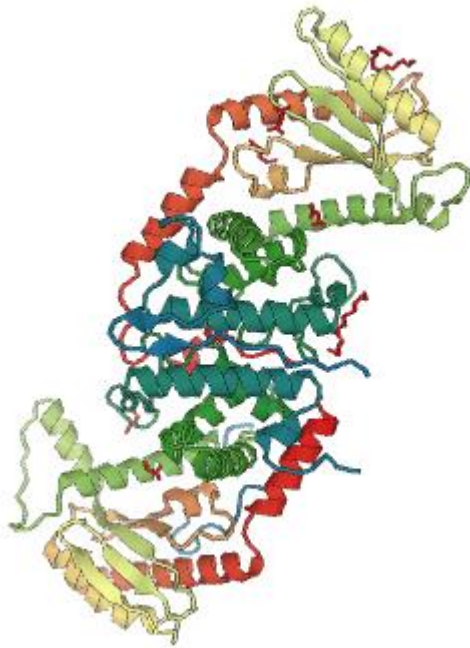


Abbildung 2: Röntgenkristallstruktur des Komplexes NF45-NF90 (Dimerisationsdomänen).

Darstellung (Cartoon, Rainbow) des NF45-NF90 Dimerisationsdomänen-Komplexes bei einer Auflösung von 1,9 Å. Dabei ist der N-Terminus blau und der C-Terminus rot dargestellt. Abbildung modifiziert nach PDB-Eintrag 4AT7 (Wolkowicz und Cook, 2012).

Außerdem konnte über Co-Immunopräzipitation und Immunohistochemie gezeigt werden, dass ZFD-Proteine, wie das *zinc-finger RNA-binding protein* (*Zfr*) mit NF45 interagieren und an der murinen Spermatogenese und Meiose beteiligt sind (Wolkowicz und Cook, 2012, Meagher *et al.*, 1999).

Allerdings wurde von Wolkowicz und Cook (2012) nach Untersuchungen mittels EMSA (*electrophoresis mobility shift assay*) die Behauptung aufgestellt, dass der Bereich der ZFD, welcher bei der Dimerisierung beteiligt ist, nicht allein zur RNA-Bindung beiträgt. Es wird vermutet, dass diese Domäne erst in Kombination mit einem dsRBM (s. 1.1.2.2) für eine „Identifizierung und Akquirierung“ von RNA bereit steht.

1.1.2.2 Die Bindungsmotive für doppelsträngige RNAs (dsRBM)

Die Bindungsmotive für doppelsträngige RNAs (dsRBMs) sind kleine Proteindomänen, welche in eukaryotischen, prokaryotischen und auch in viralen Proteinen weit verbreitet sind (Banerjee und Barraud, 2014). Ihre Hauptaufgaben liegen in der Bindung von dsRNA, im nucleocytoplasmatischen Transport, bei der Interaktion mit „nicht-RNA-Zielen“, wie DNA oder Proteinen, sowie der Regulation

katalytischer Prozesse durch ein komplexes Zusammenspiel mit anderen dsRBMs und auch nicht-dsRBM-Motiven (Chang und Ramos, 2005).

Ein dsRBM besteht immer aus drei antiparallelen β -Faltblättern, die von zwei α -Helices flankiert werden. Dieses $\alpha\beta\beta\beta\alpha$ -Motiv ist auch bei NF110 zu finden (s. Abbildung 3).

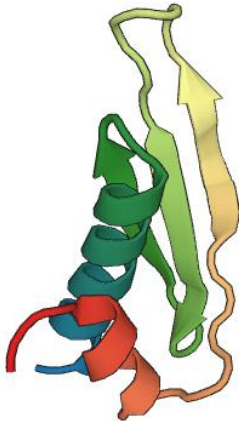


Abbildung 3: Röntgenkristallstruktur des dsRBM II aus NF110.

Darstellung (Cartoon, Rainbow) des Bindungsmotivs für dsRNA II von humanem NF110 bei einer Auflösung von 1,9 Å. Dabei ist der N-Terminus blau und der C-Terminus rot dargestellt. Abbildung modifiziert nach PDB-Eintrag 3P1X (Seetharaman *et al.*, 2010).

In den Studien von Guan *et al.* (2008) konnte zudem bewiesen werden, dass bei einer teilweisen oder vollständigen Entfernung der dsRBMs bzw. großer Teile des C-Terminus die Bindung von NF110 zu NF45 zerstört wurde. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die dsRBMs nicht nur für die Bindung von dsRNA, sondern auch von anderen NFAR-Proteinen relevant sind.

1.1.2.3 Das RGG-Motiv

Bislang sind über 1000 humane Proteine bekannt, die Arginin-, Glycin-reiche Motive - sogenannte RG- bzw. RGG-Motive - besitzen. Sie beeinflussen zahlreiche Prozesse, wie die Transkription, das *pre-mRNA silencing* und die Translation von mRNA. Außerdem beteiligen sie sich bei der Signalübertagung nach Zellschäden und beeinflussen apoptotische Prozesse (Thandapani *et al.*, 2013).

Da die Methylierung von Arginin zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen gehört, bietet das RGG-Motiv eine wichtige Angriffsstelle für Protein-Arginin-Methyltransferasen, wie PRMT1 (Wada *et al.*, 2001). Dieses Enzym ist die dominierende Methyltransferase in Zellen.

In Studien von Tang *et al.* (2000) konnte gezeigt werden, dass PRMT1 mit NF110 interagiert und seine Funktion reguliert. Eine Methylierung des RGG-Motivs von NF90 konnte dagegen nicht gefunden werden. Daher kann vermutet werden, dass beide Proteine sich zwar in ihren RGG-Motiven gleichen, aber trotzdem unterschiedlich mit PRMT1 interagieren, was in einer vorhandenen bzw. fehlenden Methylierung resultiert.

Auch in NF45 konnte das RGG-Motiv, welches homolog zu dem von NF90 bzw. NF110 ist, identifiziert werden. Diese 20 Aminosäuren umfassende Sequenz enthält neben Arginin und Glycin aber auch Serin – jeweils eins an den Positionen 2 bei NF45 bzw. 647 bei NF90 (Zhao *et al.*, 2005, Zhu *et al.*, 2010). Dieses Serin stellt eine Schlüsselaminosäure dar, da die Phosphorylierung von Serin 647 am NF90 zu dessen Transfer vom Nukleus ins Cytosol und zur Stabilisierung von IL2-mRNA führt. Die dabei beteiligte Proteinkinase C (PKC) kann zum Beispiel über Phorbol ester aktiviert werden (Zhu *et al.*, 2010).

Insgesamt kann damit gesagt werden, dass das RGG-Motiv ein Angriffspunkt für eine posttranslationale Modifikation ist, durch welche sich NF110 in seiner Funktion und Lokalisation modifiziert werden kann.

1.1.2.4 Das GQSY-Motiv

Im Vergleich zu den bislang genannten Strukturmotiven ist über das GQSY-Motiv verhältnismäßig wenig bekannt. Das Motiv enthält vorwiegend nur die 4 Aminosäuren Glycin, Glutamin, Serin und Tyrosin und ist am C-Terminus von NF110 lokalisiert. Es bildet damit den wesentlichen Strukturunterschied zu NF90, das kein GQSY-Motiv enthält (Guan *et al.*, 2008).

Der C-Terminus von NF110 ist nach Strukturvorhersagen prädestiniert eine *random-coil* Struktur einzunehmen. Diese flexible Struktur wird oft als Angriffspunkt für Protein-Protein Wechselwirkungen beschrieben (Castella *et al.*, 2014).

Um herauszufinden, welche Rolle das GQSY-Motiv spielt, wurde in ersten Studien von Reichman und Mathews (2003) die Bindung von dsRNA an NF90 und NF110 (Wildtyp bzw. modifiziert) untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die

Mutation der dsRBMs von NF110 zur verringerten RNA-Bindung führte. Allerdings konnte durch nachträgliche Insertion von dsRBMs aus Proteinkinase R (PKR) die RNA-Bindung vollständig wiederhergestellt werden. Dies ist ungewöhnlich, da sich die dsRBMs von NF110 und der PKR in ihrer Affinität stark unterscheiden. Daher wurde postuliert, dass der C-Terminus von NF110, und damit das GQSY-Motiv, die Bindungsspezifität von NF110 reguliert.

Auch in den Studien von Parrott *et al.* (2005) konnten über Vergleichsstudien zwischen NF90 und NF110 Aussagen zum GQSY-Motiv getroffen werden. Dabei wurde untersucht, wie Ribonucleoprotein-Komplexe (RNP-Komplexe) durch NF90 bzw. NF110 beeinflusst werden. Es zeigte sich, dass Komplexe mit NF90 eher „labil“ waren, wohingegen NF110 einen stabilisierenden Effekt auf die Komplexe hatte. So wurde von Parrott *et al.* (2005) die These aufgestellt, dass der C-Terminus von NF110 für die Stabilisierung der Ribonucleoprotein-Komplexe verantwortlich ist. Dies kann entweder durch die Interaktion vom GQSY-Motiv zur RNA oder durch die „Rekrutierung“ anderer Proteine im Zuge einer Komplexbildung begründet werden.

Diese Vermutung wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass NF90 zwar zu 90 % kernlokalisiert vorliegt, durch Phosphorylierung aber in seiner Lokalisation verändert werden kann, wohingegen NF110 zu nahe 100 % kernlokalisiert ist. Durch die GQSY-Region ist NF110 an kernständigen Proteinen fixiert. Durch das Fehlen dieser Region ist NF90 „freier“ und damit eher geeignet zu translozieren (Reichman *et al.*, 2003).

Des Weiteren wurde NF110 als Bindungspartner für YM155, einem Survivin-Suppressor, identifiziert. Das Protein Survivin, welches an der Krebsbildung beteiligt ist, wird in seiner Expression durch YM155 unterdrückt. Dieses wiederum konnte in Studien von Nakamura *et al.* (2012) besonders gut mit NF110 interagieren. NF110-Mutanten mit einem verkürztem C-Terminus und somit beschädigtem bzw. fehlendem GQSY-Motiv zeichneten sich durch eine wesentlich verringerte Bindung zu YM155 aus. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der C-Terminus, insbesondere das GQSY-Motiv, für die starke Bindung von NF110 an YM155 verantwortlich ist.

Durch einen Vergleich mit den Studien von Ohno *et al.*, 2011 und Du *et al.*, 2011 zeigt sich, dass NF110 eine regulatorische Schlüsselposition in dieser Signalkaskade einnimmt. Zuerst interagieren spezielle Proteine, beispielsweise PRMT1 und

PGC-1 α (*peroxisom proliferator-activated receptor γ co-activator 1- α*) mit der GQSY-Region von NF110 (Ohno *et al.*, 2011). Diese Proteine wiederum können die Expression des Gens von Survivin begünstigen (Du *et al.*, 2011). Allerdings kann NF110 auch mit dem Suppressor von Survivin, dem YM155, interagieren (Nakamura *et al.*, 2012) und so dessen Genexpression zusätzlich regulieren.

Trotz dieser ersten Studien zum C-Terminus, insbesondere zum GQSY-Motiv, von NF110 ist dessen biologische Funktion noch nicht vollständig geklärt.

1.2 Biologische Funktion von NF110

1.2.1 NF110 als Interaktionspartner für Nucleinsäuren und Proteine

Sowohl NF90 als auch NF110 spielen eine wesentliche Rolle im RNA-Stoffwechsel. Dabei können sie entweder mit den RNAs selbst oder anderen RNA-bindenden Proteinen wechselwirken und so den RNA-Metabolismus positiv wie auch negativ regulieren. Aber auch in zellulären Prozessen, wie dem Zellzyklus und der Aktivierung spezieller Enzyme, spielen beide NFAR-Proteine eine wesentliche Rolle (Castella *et al.*, 2014).

Obwohl noch nicht alle Funktionen von NF110 geklärt sind, konnten die bislang vorhandenen Daten in einem NF90/NF110-RNA-Interaktom festgehalten werden (s. Abbildung 4). Dabei fällt auf, dass NF110 (synonym Ilf3) und NF90 an zahlreichen Prozessen beteiligt sind, wie der Stabilisierung von RNAs (Parrott *et al.*, 2005, Shim *et al.*, 2002), Regulierung und Inhibition der Translation (Xu und Grabowski, 1999), Biogenese von *non-coding* RNAs, insbesondere *microRNAs* (Sakamoto *et al.*, 2009) sowie der viralen RNA-Replikation und Translation (Isken *et al.*, 2003).

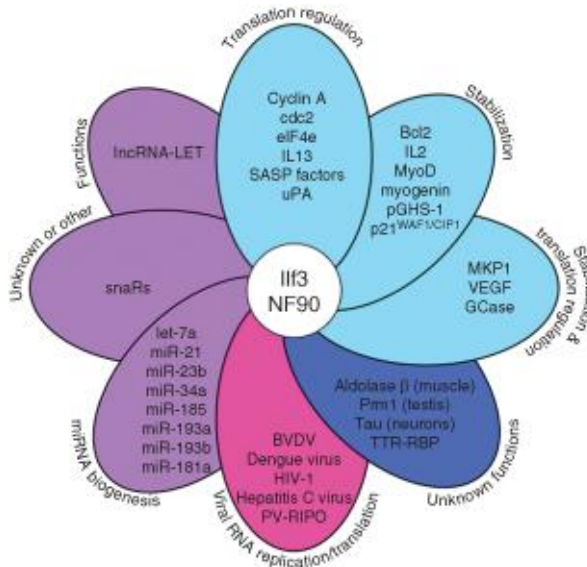


Abbildung 4: NF90/NF110-RNA-Interaktom.

Einfluss von NF90/NF110 auf die biologischen Prozesse: Translation, *microRNA*-Biogenese, virale RNA-Replikation/Translation sowie Stabilisierung von RNAs. Die dabei beteiligten *non-coding*, viralen und zellulären RNAs sind in den Feldern farbig (lila, pink bzw. blau) dargestellt. Abbildung aus Castella *et al.*, 2014.

Im Folgenden sollen nun einige ausgewählte biologische Funktionen von NF110 auf den RNA-Metabolismus näher erläutert werden.

In mehreren Studien wurde der Einfluss von NF90 und NF110 auf die Regulation der Translation und mRNA-Stabilisierung untersucht. So wurde von Shi *et al.* (2005) ein Mäusestamm mit defektem *Irf3*-Gen generiert. Das Mausmodell wurde wegen der Homologie zum humanen Gen gewählt. Der hervorgerufene Gendefekt und daraus resultierende Verlust an NF90 bzw. NF110 führte zum perinatalen Tod der Tiere bereits 12 h nach der Geburt, ausgelöst durch Zwerchfellmuskel- und Lungenversagen. Außerdem waren sämtliche Skelettmuskelzellen fehlgebildet. Bei den Untersuchungen konnten drastisch reduzierte Titer von Myogenin und des myogenen Faktors 3 (MyoD) sowie des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p21^{WAF1/CIP1} festgestellt werden. Diese Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusinhibitoren werden durch posttranskriptionale mRNA-Stabilisierung reguliert. In Untersuchungen mittels *northwestern blotting* konnte zudem gezeigt werden, dass NF90 das spezifische Bindeprotein für die p21^{WAF1/CIP1} und MyoD 3'-*untranslated-region*-RNA in wachsenden Skelettmuskelzellen darstellt. Durch die Versuche von Shi *et al.* (2005) konnte man feststellen, dass die Expressionsprodukte des *Irf3*-Gens bei der mRNA-Stabilisierung spezieller Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusinhibitoren beteiligt sind. Somit spielen NF90 und NF110 eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Lungen- und Skelettmuskelzellen.

Diese Ergebnisse werden durch neuere Studien von Higuchi *et al.* (2012) bestärkt. Dabei wurde genau umgekehrt vorgegangen, indem transgene Mäuse generiert wurden, die NF90 cDNA überexprimieren sollten. Es konnten gravierend erhöhte NF90-Gehalte im Herz-, Augen- und Skelettmuskelgewebe gemessen werden. Genau wie die *Irf3*-Defekt-Mäuse (Shi *et al.*, 2005) zeigten auch die Mäuse mit erhöhten NF90-Konzentrationen einen Gewebsschwund, Gewichtsverlust, fehlgebildetes Skelettmuskelgewebe und Herzfehler. Allerdings waren diese Tiere nicht kurz nach der Geburt verstorben, sondern bis zu 12 Wochen lebensfähig. Somit kann geschlussfolgert werden, dass NF110 und NF90 die Muskelbildung regulieren. Außerdem ist eine Homöostase beider Proteine für ein gesundes Wachstum nötig.

Eine weitere biologische Funktion von NF110 ist sein Einfluss auf die Translation und den mRNA-Transport. Die Proteine NF110 und NF90, die vollständig bzw. größtenteils kernständig vorliegen, dienen der Rückhaltung von RNA und regulieren den Export von mRNA vom Zellkern in das Cytoplasma (Parrott *et al.*, 2005, Pfeifer *et al.* 2008). Dabei ist anzumerken, dass NF110 weitestgehend im Zellkern vorliegt, wohingegen NF90 im Rahmen der Mitose wesentlich öfter seine Platzierung verändert (Parrott *et al.*, 2005). Trotzdem dienen beide NFAR-Proteine als „Shuttle-Proteine“ und somit dem Transport bzw. der Rückhaltung von mRNA, was ihre Funktion bei der Regulation der Translation erklärt (Pfeifer *et al.* 2008).

Sowohl Parrott *et al.* (2005), als auch Pfeifer *et al.* (2008) vermuteten, dass die Verteilungsunterschiede zwischen NF90 und NF110 mit einer Interaktion des C-Terminus von NF110 zu kernständigen Proteinen zu begründen ist. Das Protein NF90 ist durch das fehlende GQSY-Motiv dazu weniger geeignet und kann somit eher mRNA ins Cytosol transportieren (Parrott *et al.*, 2005).

Die NFAR-Proteine NF90 und NF110 sind neben der Interaktion mit RNAs im Rahmen der Translation und Stabilisierung auch in der Lage mit anderen Proteinen zu wechselwirken. Dafür hat Castella *et al.* (2014) ein NF90/NF110-Protein-Interaktom aufgestellt (s. Abbildung 5). Hier zeigen sich weitere medizinisch relevante Interaktionen, wie der Einfluss von NF110 im Rahmen der rheumatoiden Arthritis und Krebsentwicklung. Auf diese soll im Folgenden näher eingegangen werden.

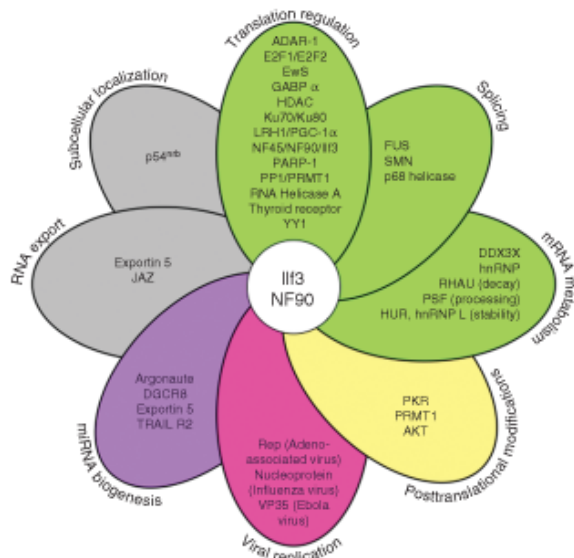


Abbildung 5: NF90/NF110-Protein-Interaktom.

Einfluss von NF90/NF110 auf die beteiligten Proteine (innerhalb der Felder) bei den biologischen Prozessen (außerhalb der Felder). Abbildung aus Castella *et al.*, 2014.

Bei einer rheumatoiden Arthritis werden Synovialzellen, die eine Gelenkinnenhaut bilden, vom körpereigenen Immunsystem angegriffen. Es kommt zu Schwellungen und Entzündungen des Gelenks (Lefèvre, 2010).

Synoviolin, eine E3-Ubiquitin-Ligase, fördert das Wachstum von Synovialzellen. In Studien von Izumi *et al.* (2009) konnte gezeigt werden, dass NF110 einen Komplex mit dem GA-Bindeprotein α eingeht und so am Synoviolin Promoter von rheumatoiden Synovialzellen bindet und diesen aktiviert. Daher wird vermutet, dass NF110 zur Feinregulierung der Synoviolin-Genexpression dient (Izumi *et al.*, 2009) und als *drug target* für die Behandlung rheumatoider Arthritis in Betracht kommt.

Ein weiteres Forschungsgebiet ist der mögliche Einsatz von NF110 als *drug target* in der Krebstherapie. In Studien von Nakamura *et al.* (2012) konnte die Bindung von NF110 an YM155, einem Survivin-Suppressor, bestätigt werden. Der Proteinkomplex führt über eine komplexe Signalkaskade zur Bildung von Survivin, das wiederum in der Krebsentwicklung involviert ist (s. 1.1.2.4).

Dies untermauert die Studien von Hu *et al.* (2013) im Zusammenhang von NF110 als Regulator der *urokinase-type plasminogen activator (uPA)* – Expression im Rahmen der Brustkrebs-Onkogenese. Es konnte gezeigt werden, dass NF110 sowohl positiv wie auch negativ die Expression reguliert. Einerseits kann es als Komplex mit NF45 an den *uPA*-Promoter binden und die Transkription aktivieren, andererseits ist NF110

auch ein Prozessinhibitor für *uPA mRNA-targeting pri-mRNA*. Insgesamt sorgt NF110 so für eine kontinuierliche *uPA*-Expression und für einen konstanten Spiegel des Plasminogenaktivators.

Hu *et al.* (2013) konnten zudem nachweisen, dass erhöhte *uPA*-Gehalte im Tumorgewebe mit dem Voranschreiten der Krankheit korrelieren. Über immunohistochemische Arbeiten konnte zudem bewiesen werden, dass die Färbung von Zellkern-assoziiertem NF110, nicht aber cytosolischem NF110, mit erhöhten *uPA*-Gehalten im Gewebe und der Tumorentwicklung korreliert. Daher wird vermutet, dass allein das Zellkern-assoziierte NF110 an der Transkriptionsaktivierung beteiligt ist und die Onkogenese fördert (Hu *et al.*, 2013).

1.2.2 NF110 als Interaktionspartner für virale RNAs

Neben den Studien zur Interaktion von NF110 mit Nukleinsäuren und Proteinen im Rahmen der Translation und Transkription, bilden Interaktionsstudien zwischen NF110 und viralen RNAs ein interessantes Forschungsgebiet. Trotz der modernen Medizintechnik sind immer noch Krankheiten, die durch Viren, wie dem HI-Virus, Hepatitis B - und Hepatitis C – Virus ausgelöst werden, nicht vollständig therapierbar und der genaue Ablauf der Virusvermehrung nicht vollständig verstanden.

In diesem Zusammenhang sind erste Forschungen mit NFAR-Proteinen angelaufen, die zum Ziel haben, die Interaktion der viralen RNA mit den Wirtsproteinen und den dabei stattfindenden Prozessen aufzuklären. Erst wenn die biochemischen Wirkmechanismen verstanden sind, können Impfstoffe und Therapeutika entwickelt werden.

Zur Familie der *Flaviviridae* zählen Viren der Gattungen *Flavivirus*, *Pestivirus* und *Hepacivirus*. Diese enthalten alle einzelsträngige RNA und können sowohl humane Krankheiten wie Hepatitis C, Dengue-Fieber und West-Nil-Fieber, als auch Krankheiten bei Säugetieren, wie die bovine Virusdiarrhoe oder Schweinepest auslösen (Isken *et al.*, 2007, Taucher, 2009).

Wie alle *Flaviviridae* besitzen sowohl HCV als auch BVDV, die oft in Studien zum Lebenszyklus der *Flaviviridae* eingesetzt werden, konservierte RNA-Sekundärstrukturen, insbesondere in den 3' und 5' NTRs (Isken *et al.*, 2003, Thurner *et al.*, 2004). In den Untersuchungen von Isken *et al.* (2003) konnte gezeigt

werden, dass sowohl am 3'NTR, als auch am 5'NTR von BVDV, welche den ORF umschließen, dieselben zellulären Faktoren binden. In späteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um NFAR-Proteine wie NF90 und NF45 sowie die RNA-Helikase A (RHA) handelt. Durch diese und weitere Untersuchungen konnten Isken *et al.* (2003) ein Modell entwerfen, das auf die Zirkulation und Replikation der viralen RNA eingeht.

Wie in der Abbildung 6 zu sehen ist, beschreibt das Modell die Zirkulation viraler RNA. Dabei fördern die NFAR-Proteine und die RHA das Zusammenfinden zwischen 3'NTR und 5'NTR, sodass sich ein doppelsträngiger Bereich bildet. Erst durch diesen Mechanismus können die an der Translation und Replikation beteiligten Enzyme, wie die RNA-Polymerase, bzw. die Ribosomen aktiv werden (Isken *et al.*, 2003). Im Jahr 2007 konnten Isken *et al.* zeigen, dass die NFAR-Proteine, also NF45, NF90 und NF110, sowie die RHA auch an der Replikation von Hepatitis C Virus RNA, welche der von BVDV stark ähnelt, beteiligt sind.

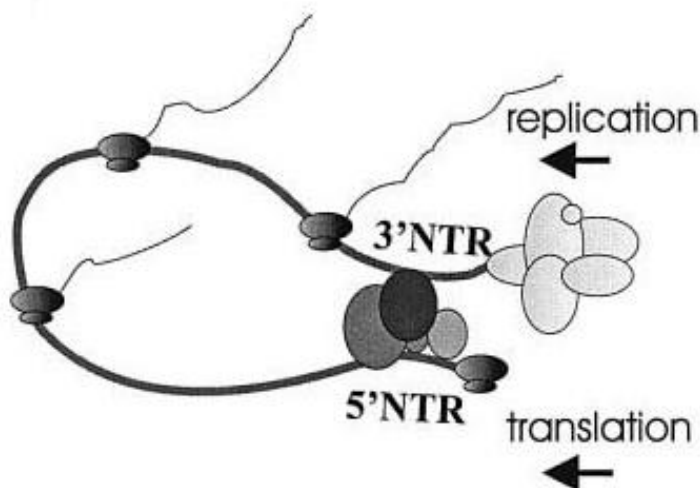


Abbildung 6: Modell für die Zirkulation viraler RNA bedingt durch die Bindung von NFAR-Proteinen.

Darstellung des Replikationskomplexes (hellgrau) am 3' NTR, der Ribosomen (dunkelgrau) am RNA-Strang und der Proteine NF90, NF45 und RHA (Viererbündel) am 5' NTR. Abbildung nach Isken *et al.* (2003).

Auch für andere virale RNA-Genome wurde beschrieben, dass es erst durch RNA-Interaktionen und eine Zyklisierung zur Replikation kommen kann (Khromykh *et al.*, 2001). So wurde durch Zhang *et al.* (2008) beschrieben, dass beim

Genom des West-Nil-Virus sogar zwei RNA-Interaktionen nötig sind. Neben der bereits beschriebenen 3'NTR/5'NTR-Zyklisierungsstelle wurde hier eine weitere RNA-Interaktion zwischen 3'UAR und 5'UAR identifiziert. Sobald im Rahmen von RNAi-Experimenten diese *upstream AUG regions* (UAR) gehindert wurden in Kontakt zu treten, war die Replikation des West-Nil-Virus drastisch reduziert (Zhang *et al.*, 2008). Ähnliche Beobachtungen konnten auch für das Dengue-Virus-Genom gemacht werden. Alvarez *et al.* (2008) konnten auch eine Zyklisierungssequenz zwischen 3'NTR und 5'NTR ausmachen, sowie den Einfluss von speziellen UAR-Nukleotiden bzw. der 3'UAR/5'UAR-Sequenz auf die Zyklisierung nachweisen.

Diese Beobachtungen decken sich mit der Studie von Isken *et al.* (2003), weshalb auch bei diesen Flaviviren von einer Stabilisierung der viralen RNA durch Interaktion mit NFAR-Proteinen auszugehen ist.

In weiteren Untersuchungen konnten aber auch antivirale Eigenschaften von NF90 gefunden werden. Dabei wurde die C-terminale Variante NF90ctv, deren C-Terminus inklusive des RGG-Motivs durch einen *frame shift* verändert ist, als Inhibitor für den HIV-1 Stamm NL4-3 ausgemacht. Es wird davon ausgegangen, dass die HIV-Resistenz, ausgelöst durch NF90ctv, auf eine Induktion der „Inferferon-Resistenzgene“ zurückgeht (Krasnoselskaya-Riz *et al.*, 2002). Obwohl die Versuche an Zellkulturen durchgeführt wurden, ist zu bedenken, dass die genutzte Isoform NF90ctv noch nicht in unveränderten Zellen detektiert werden konnte (Reichman *et al.*, 2003, Hoque *et al.*, 2012).

Weitere Studien zu HIV-1 zeigten zudem, dass NF90 in seiner klassischen Form als Regulator der HIV-Replikation dient. Dabei wurde nachgewiesen, dass NF90 die Bildung des *positive transcription elongation factor* (p-TEFb) reguliert, der als Schlüsselstelle und *drug target* in der Entwicklung viraler Erkrankungen gilt. Hoque *et al.* (2012) zeigten zudem, dass bei einer durch Phorbolster aktivierten viralen Replikation in latent infizierten Monozyten die posttranskriptionale Induktion von NF90 eine entscheidende Rolle spielt. So konnte ein Beitrag von NF90 im Proteinkinase C (PKC) – Metabolismus nachgewiesen werden (Hoque *et al.*, 2012).

Auch bei anderen viralen Erkrankungen, wie Influenza, beeinflussen NF90 und Proteinkinasen die Virusentwicklung. Nach Wen *et al.* (2014) wird eine antivirale

Wirkung durch das Zusammenspiel von NF90 und der Proteinkinase PKR ermöglicht. Es wird davon ausgegangen, dass NF90 die Autophosphorylierung der PKR reguliert und so in den antiviralen Haushalt der Wirtszelle eingreift.

Neben den zahlreichen Untersuchungen von NF90 im Rahmen der Virusreplikation und -entwicklung existieren weitaus weniger Daten zu NF110. Trotzdem ist es Studien, wie der von Isken *et al.* (2007), zu verdanken, dass man auch NF110 als regulatorisches Element in der Bindung und Replikation viraler RNA bezeichnen kann. Es ist davon auszugehen, dass NF110 durch seine dsRBMs auch in der Lage ist virale RNA zu binden und so neben der Replikation von HCV (Isken *et al.*, 2003) auch bei der Replikation anderer Viren involviert ist.

1.2.3 NF110 als Faltungshelfer für RNAs

An zahlreichen biologischen Prozessen sind RNAs beteiligt, die erst bei einer korrekten Faltung vollständig physiologisch funktionstüchtig sind. Obwohl RNAs meist einzelsträngig vorliegen, bilden sich häufig zueinander komplementäre, doppelsträngige Bereiche, die die dreidimensionale Struktur der Biopolymere maßgeblich beeinflussen (Hille-Rehfeld, 2008).

Allerdings können bei der RNA-Faltung zwei Probleme auftreten. Einerseits können RNAs, im Gegensatz zu Proteinen, die meist nur durch eine thermodynamisch stabile Form gekennzeichnet sind, in verschiedenen Konformationen vorliegen, von denen die meisten - trotz kinetisch günstiger Form – nicht biologisch aktiv sind. Zudem besteht die Möglichkeit, dass eine RNA nicht die Tertiärstruktur annimmt, welche gegenüber den kompetitierenden, alternativen Formen thermodynamisch am vorteilhaftesten ist (Herschlag, 1995).

Proteine, die dieser Faltungsproblematik entgegenwirken, werden als RNA-Chaperone bezeichnet. Diese Faltungshelfer sind maßgeblich an der Ausbildung der korrekten dreidimensionalen Struktur der RNA und der daraus resultierenden nativen Funktion beteiligt. Dabei muss das Chaperon die fehlgefaltete RNA zuerst binden und die Struktur entwinden, um so eine Möglichkeit zu bieten, dass sich die native Struktur ausbildet. Ebenso wichtig ist zudem, dass die nun korrekt gefaltete RNA wieder freigesetzt wird (Hille-Rehfeld, 2008).

Zu den bislang am besten untersuchten Proteinen mit RNA-Chaperonaktivität gehören die DEAD-Box-Proteine, die sich durch die Aminosäure-Sequenz D-E-A-D im konservierten Bereich dieser Proteine auszeichnen (Jankowsky, 2007). Ein Vertreter dieser Gruppe ist CYT-19. Es kann sowohl fehlgefaltete, als auch korrekt gefaltete RNA entfalten und für eine Neufaltung sorgen. Allerdings werden durch CYT-19 bevorzugt fehlgefaltete RNAs aufgetrennt und neu gefaltet. Somit fungiert CYT-19 als ATP-verbrauchende Helikase mit RNA-Chaperonaktivität (Bhaskaran und Russell, 2007).

Im Gegensatz zu diesem Vertreter der Proteine mit RNA-Chaperonaktivität stellen Rajkowitsch und Schroeder (2007) zwei Grundvoraussetzungen an ein RNA-Chaperon im eigentlichen Sinne, welche nicht an eine ATP-Abhängigkeit gekoppelt sein müssen. Einerseits die Hybridisierung komplementärer RNA-Stränge und andererseits das *strand displacement*, d.h. die Verdrängung eines RNA-Strangs aus einem RNA-Doppelstrang. Dabei konnten Proteine identifiziert werden, die nur eine oder beide Funktionen in Kombination erfüllen.

Im Gegensatz zu den DEAD-Box-Helikasen konnten Rajkowitsch und Schroeder (2007) Proteine mit RNA-Chaperonaktivität ausmachen, die in einer ATP-unabhängigen Weise in der Lage sind das RNA *annealing* und *strand displacement* zu fördern. Ein Beispiel für diese RNA-Chaperone im eigentlichen Sinne bildet das RNA-Bindeprotein *Hfq*. Es weist zwei RNA-Bindungsstellen auf, die als elementare Bausteine eines RNA-Chaperons gelten.

Durch die bekannte Bindung von NF90 und NF110 an einzel- und doppelsträngige RNAs und die Vielzahl von physiologischen Prozessen, die durch die beiden NFAR-Proteine beeinflusst werden, wurde bei ihnen auch eine RNA-Chaperonaktivität vermutet. Für NF90 konnte die Wirkung des Proteins im Prozess der RNA-Faltung beobachtet werden. Ähnlich wie *Hfq* kann auch NF90 ohne Einfluss von ATP die Hybridisierung einzelsträngiger, komplementärer RNAs katalysieren (Schmidt, 2015).

Ob auch NF110, als naher Verwandter des NF90, als RNA-Chaperon fungiert, ist bislang nicht vollständig geklärt. Beide Proteine unterscheiden sich nur durch den C-Terminus mit dem GQSY-Motiv, das als eher flexibel und unstrukturiert gilt. Der Hypothese von Tompa und Csermely (2004) nach fördert ein unstrukturierter Bereich

sogar die RNA-Chaperonaktivität. Es wird vermutet, dass die flexible Struktur eine große Oberfläche bzw. Vielfältigkeit für Bindungen bietet. Da RNA-Chaperone kein ATP verbrauchen, ist noch ungeklärt, woher die nötige Energie für den Prozess stammt. Es wird vermutet, dass bei der Chaperon-Substrat-Komplexbildung Energie frei wird, welche zur Entfaltung des RNA-Substrats verwendet wird. Zudem wurde bei Betrachtung der Thermodynamik der Umfaltung die Hypothese aufgestellt, dass das Chaperon die RNA solange aufbricht und neu hybridisiert bis die thermodynamisch stabilste Konformation erstellt wurde (Tompa und Csermely, 2004).

Schlussfolgernd muss also die RNA-Chaperonaktivität von NF110 weiter untersucht werden, da sie nach bisherigen Studien und Vermutungen als wahrscheinlich gilt. Der Fokus sollte dabei auf die Thermodynamik des Prozesses und die genaue Wirkweise von NF110 bei der RNA-Faltung gelegt werden.

1.3 Zielstellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Biotechnologie“ angefertigt. Diese beschäftigt sich unter anderem mit Proteinen, die mit verschiedenen viralen RNAs interagieren können und an der Virusreplikation beteiligt sind.

In Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das Protein *nuclear factor* 110 (NF110), welches rekombinant in *E. coli inclusion bodies* produziert wurde, mit einer bestehenden Reinigungsmethode vorgereinigt und eine Feinreinigung etabliert werden. Es galt die Reinigungsmethode so zu vervollständigen, dass das Protein in nativer und stabiler Form für biophysikalische Messungen zur Verfügung steht.

Durch den Einsatz verschiedener Assays sollte die Bindung von NF110 an unterschiedliche RNAs überprüft werden. Um die Dissoziationskonstanten zu bestimmen, war es nötig ein geeignetes Messverfahren zu benutzen, bei dem das Protein stabil vorliegt und nicht im Messzeitraum aggregiert. Daher musste auch der Einfluss des aggregationsminimierenden Zusatzes L-Arginin untersucht und berücksichtigt werden.

Abschließend sollten die Daten dieser biophysikalischen Charakterisierung für eine Interpretation im Vergleich mit der Isoform NF90 genutzt werden.

2 Materialien und Geräte

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), Merck (Darmstadt), Serva (Darmstadt), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

2.1.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Fluorophor-markierten Oligonukleotide (s. Tabelle 1) wurden von IBA Göttingen bezogen. Sie waren 5´ - FAM – Ex – 5 markiert.

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
13 ssRNA	5´ GCA GCG AGC AUC U 3´
16 ssRNA	5´ CUA AGA UGC UCG CUG C 3´
16/13 dsDNA	5´ CTA AGA TGC TCG CTG C 3´ 3´ TCT ACG AGC GAC G 5´
16/13 dsRNA	5´ CUA AGA UGC UCG CUG C 3´ 3´ UCU ACG AGC GAC G 5´
33/36 dsRNA	5´ UUA GGG AGG GUC GUU CAU UGG CAG CGA GCA UCU 3´ 3´ AAU CCC UCC CAG CAA GUA ACC GUC GCU CGU AGA AUG 5´

2.1.3 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Affinitäts-Chromatographiesäule	HiTrap™ Heparin HP	GE Healthcare, Uppsala (SWE)
Chromatographie-Anlage	ÄKTA Purifier	GE Healthcare, Uppsala (SWE)
Fluoreszenzphotometer	FluoroMax 4	HORIBA Jobin Yvon, Unterhaching
Größenausschluss-Chromatographiesäule	Superdex™ 200 26/60	GE Healthcare, Uppsala (SWE)
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Hydrophobe Interaktions-Chromatographiesäule	HiLoad™ 26/10 Phenyl Sepharose	GE Healthcare, Uppsala (SWE)
Kationenaustausch-Chromatographiesäule	HiTrap™ 16/10 SP Sepharose™	GE Healthcare, Uppsala (SWE)
Mischgerät	Vortex Genius 3	IKA, Staufen
Ultrazentrifuge	L8-60M	Beckman, Pasedena (USA)
Ultrazentrifuge	Optima XL-A	Beckman, Pasedena (USA)
UV/Vis Spektrophotometer	Gene Quant 1300	GE Healthcare, Uppsala (SWE)
UV/Vis Spektrophotometer	V-550	JASCO, Groß-Umstadt
Zentrifugalkonzentrator	Corning® Spin-X® UF 20ml	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Zentrifugalkonzentrator	Vivaspin 2 30.000 MWCO	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge	Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	Rotina 38R	Hettich, Tuttlingen

2.1.4 Software

Im Rahmen dieser Abschlussarbeit wurden für die Messung bzw. Auswertung der Daten unterschiedliche Software-Programme verschiedener Anbieter verwendet. Diese sind in der Tabelle 3 gelistet.

Tabelle 3: Verwendete Software

Programmname	Prozess	Herausgeber
FluorEssence™	Fluoreszenzmessung	HORIBA Scientific, Unterhaching
ImageQuant 5.0	Quantifizierung von Bilddaten	GE Healthcare, Uppsala (SWE)
Spectra Manager	Spektralphotometrische Messungen	JASCO, Groß-Umstadt
KaleidaGraph 4.5	Datenauswertung und Visualisierung	Synergy Software, Reading (USA)
UNICORN 5.11	Benutzung der Chromatographie-Anlage	GE Healthcare, Uppsala (SWE)

3 Methoden

3.1 Chromatographische Methoden

3.1.1 Kationenaustauschchromatographie

Das Ausgangsmaterial - bei - 20 °C gelagertes, denaturiertes NF110-Material - wurde zur Vorbereitung auf eine Kationenaustauschchromatographie dialysiert. Der dabei verwendete Puffer (30 mM Natriumphosphat, 8 M Harnstoff, 1 mM DTT, pH 7,0) wurde in 20-fachem Überschuss eingesetzt und nach 24 h ausgetauscht. Das dialysierte Material wurde mittels Ultrazentrifugation (40.000 rpm, 1h, 10°C, Rotor 45Ti) von Nukleinsäuren befreit. Der Überstand wurde bei 4 °C gelagert.

Die Kationenaustausch-Chromatographiesäule wurde mit 3 Säulenvolumina Puffer A (s. Tabelle 4) equilibriert und mit 30 ml der vorbehandelten NF110-Lösung beladen. Durch einen Gradienten an Puffer B (0 bis 28 % (v/v) über 8 Säulenvolumina) wurde die Elution eingeleitet. Das Spektrum (260 nm und 280 nm) wurde aufgenommen und die Fraktionen mittels SDS-PAGE untersucht. NF110-haltige Fraktionen wurden für folgende Reinigungsschritte vereinigt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Puffer A und B für die Kationenaustauschchromatographie.

Beide Puffer wurden mit HCl auf pH 7,0 eingestellt.

Puffer A		Puffer B	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Harnstoff	8 M	Harnstoff	8 M
H ₃ PO ₄	30 mM	NaCl	1 M
DTT	1 mM	H ₃ PO ₄	30 mM
		DTT	1 mM

3.1.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Bei der hydrophoben Interaktionschromatographie macht man sich hydrophobe Wechselwirkungen, d.h. Interaktionen hydrophober Bereiche des Proteins mit der hydrophoben Säulenmatrix (Phenyl-, Octyl-, Butyl-Sepharose) zu Nutze. Der Zusatz von Salz kann die Hydrophobizität und somit auch die Adsorption erhöhen. Daher werden bei der HIC die Proteine mit einem Puffergradienten eluiert, z.B. mit steigender Konzentration chaotroper Stoffe (Harnstoff, Gdm-Cl, Gdm-SCN).

Zur Reinigung von NF110 wurde eine HiLoad™ 26/10 Phenyl Sepharose-Säule benutzt. Diese wurde mit einem Säulenvolumen Puffer A equilibriert und die 10 ml-Probenschleife mit Puffer A vorgespült. Nun wurde die native NF110-Lösung in den *loop* gespritzt und nach Programmstart automatisch auf die Säule geladen.

Nach 1 Säulenvolumen Puffer A beginnt der Lauf eines Stufengradient von 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40% auf 100% Puffer B. Dabei werden Fraktionen á 2 ml gesammelt und das Spektrum bei 260 nm und 280 nm aufgenommen.

Die Zusammensetzung der Puffer A und B ist in der Tabelle 5 einzusehen.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Puffer A und B für die HIC.

Beide Puffer wurden mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

	Puffer A	Puffer B
Methode 1	500 mM L-Arginin-HCl	6 M Harnstoff
	100 mM NaCl	100 mM NaCl
	50 mM H ₃ PO ₄	50 mM H ₃ PO ₄
	1 mM TCEP	1 mM DTT
	5 % (v/v) Glycerin	5 % (v/v) Glycerin

Methoden

Methode 2	6 M Harnstoff	6 M Gdm-Cl
	100 mM NaCl	200 mM Essigsäure
	50 mM H ₃ PO ₄	
	1 mM DTT	
	5 % (v/v) Glycerin	
Methode 3	6 M Gdm-Cl	4,2 M Gdm-SCN
	200 mM Essigsäure	

3.1.3 Affinitätschromatographie

Eine weitere chromatographische Reinigungsstufe ist die Affinitätschromatographie mit einer Heparinsäule (HiTrap™ Heparin HP, GE Healthcare, Uppsala (SWE)). Diese wurde zuerst mit vier Säulenvolumina Puffer A equilibriert, mit NF110-Material über eine Probenschleife (5 ml) beschickt und anschließend das Elutionsprogramm gestartet. Dieses setzt sich wie folgt zusammen: 2 CV Puffer A, 10 CV Gradient (0 % → 20 % Puffer B), 2 CV Puffer B (100%). Die Zusammensetzung beider Puffer ist der Tabelle 6 zu entnehmen.

Es wurden Proben á 2 ml fraktioniert gesammelt und alle NF110-haltige Proben vereinigt und für weitere chromatographische Schritte gelagert.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Puffer A und B für die Affinitätschromatographie.

Beide Puffer wurden mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

Puffer A		Puffer B	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
L-Arginin-HCl	500 mM	L-Arginin-HCl	375 mM
H ₃ PO ₄	10 mM	NaCl	1,075 M

Methoden

Puffer A		Puffer B	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
TCEP	1 mM	H ₃ PO ₄	37,5 mM
		TCEP	0,75 mM
		Glycerin	3,75 % (v/v)

3.1.4 Größenausschlusschromatographie bzw. Gelfiltration

Als finaler Schritt der Proteinreinigung kommt häufig eine Größenausschlusschromatographie zur Abtrennung von Zielprotein-Oligomeren bzw. Fremdproteinen eines anderen Molekulargewichts zum Einsatz. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dazu eine SuperdexTM 200 26/60 Säule genutzt. Diese wurde mit einem Säulenvolumen des L-Arginin-haltigen Laufpuffers (s. Tabelle 7) equilibriert. Durch eine Probenschleife wurde das NF110-haltige Material aufgepumpt und mit Laufpuffer eluiert. Es wurden 2 ml-Fractionen gesammelt und mittels SDS-PAGE bzw. Absorption bei 280 nm analysiert.

So können die gereinigten, von Oligomeren befreiten Fraktionen, identifiziert, vereinigt und mittels Zentrifugalkonzentrator eingengt werden. Von diesen NF110-reichen Lösungen wurde die Proteinkonzentration ermittelt und das Material aliquotiert bei - 80°C für die biophysikalischen Messungen gelagert.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Laufpuffers für die Gelfiltration.

Der Laufpuffer wurde mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

Komponente	Konzentration
L-Argininhydrochlorid	500 mM
NaCl	100 mM
H ₃ PO ₄	50 mM
TCEP	1 mM
Glycerin	5 % (v/v)

3.2 Proteintechnische Methoden

3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der analytischen Trennung von Proteinen einer Probelösung kam das denaturierende, diskontinuierliche System nach Laemmli (1970) zur Anwendung.

Dazu wurde ein 10%iges Trenngel gegossen und mit einem 5%igem Sammelgel überschichtet. Dieses SDS-PAG wurde anschließend in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Elektrophoresepuffer übergossen.

Zur analytischen Trennung wurden die Proteinlösungen mit SDS-Ladepuffer versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert. Die Slots des SDS-PAG wurden mit jeweils 40 µl Probe befüllt. Als Größenmarker diente der *Page Ruler Prestained Protein Ladder*. Die Auftrennung der Proteine im SDS-PAG erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA.

Die Gele wurden anschließend für 20 min mit einer Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend der Hintergrund mittels Entfärbungslösung durch schwenkende Inkubation bis zur Sichtung von klaren Banden entfernt.

Die Zusammensetzung der Gele und Materialien ist in der Tabelle 8 bzw. Tabelle 9 gelistet.

Tabelle 8: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele.

Komponente	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
Acrylamidlösung	2,5 ml	0,8 ml
ddH ₂ O	3,25 ml	3,6 ml
jeweiliger Puffer	1,5 ml	0,5 ml
SDS-Lösung	75 µl	50 µl
APS-Lösung	75 µl	20 µl
TEMED	15 µl	5 µl

Methoden

Tabelle 9: Zusammensetzung der Materialien für die SDS-PAGE.

Komponente	Substanz	Konzentration
Acrylamid-Lösung	Acrylamid	30 % (v/v)
	Bisacrylamid	0,8 % (v/v)
APS-Lösung	APS	10 % (v/v)
SDS-Lösung	SDS	10 % (v/v)
Sammelgelpuffer	Tris-HCl pH 6,8	1,25 M
Trenngelpuffer	Tris-HCl pH 8,8	1,8 M
Elektrophoresepuffer	Tris-HCl pH 8,3	3,03 g/l
	Glycin	14,4 g/l
	SDS	1 g/l
SDS Ladepuffer	Tris-HCl pH 6,8	10 mM
	Glycerin	20 % (v/v)
	SDS	10 % (v/v)
	Mercaptoethanol	2 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,05 % (v/v)
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliantblau R-250	0,5 % (w/v)
	Methanol	40 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
Entfärbungslösung	Methanol	30 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)

3.2.2 Dialyse der Proteinlösung

Um einen Pufferwechsel vorzunehmen, wurde die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch (VISKING[®] Dialyseschlauch 16 mm bzw. 28 mm, SERVA Electrophoresis, Heidelberg) gegeben und gegen einen 20 – 120 fachen Überschuss des Zielpuffers über Nacht bei 4°C dialysiert.

3.2.3 Einengen mittels Zentrifugalkonzentrator

Um eine gereinigte NF110-Lösung aufzukonzentrieren, wurde sie in einen Zentrifugalkonzentrator (s. 2.1.3) gegeben und nach Herstellerangaben eingeeengt. Es wurde bei 5000 x g und 4°C für je 20 min zentrifugiert. Das eingeeengte Material wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, der Zentrifugalkonzentrator mit 200 - 500 µl Puffer gespült und dieses Material ebenfalls gesammelt.

3.2.4 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Mit der Trichloressigsäure-Fällung nach Bennet (1967) können Stoffe wie Guanidiniumchlorid (Gdm-Cl) oder Guanidiniumthiocyanat (Gdm-SCN), welche in einigen Puffern enthalten sind, vor einer SDS-PAGE entfernt werden. Dazu werden 500 µl proteinhaltige Probe im Verhältnis 1:2 mit einer gekühlten 50%igen TCA-Lösung versetzt und für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Mischung zentrifugiert (13000 x g, 30 min, 4°C) und der Überstand verworfen.

Zum Waschen wird nun 1 ml gekühltes Aceton hinzugegeben, invertiert und das Pellet gelöst. Nach der anschließenden Zentrifugation (13000 x g, 20 min, 4°C) wird dieser Waschschrift zweimal wiederholt.

Abschließend wird das restliche Aceton abgenommen bzw. durch Verdunstung bei Raumtemperatur für 30 min entfernt und das Pellet in 50 µl 2x SDS-Ladepuffer (s. Tabelle 9, - 26 -) aufgenommen. Diese zugleich aufkonzentrierten Proben wurden mittels SDS-PAGE getrennt.

3.2.5 Dialyse zur Rückfaltung von NF110

Eine übliche Methode zur Rückfaltung von Proteinen ist die Dialyse. Dazu wurde das denaturierte NF110-Material in einen Dialyseschlauch (VISKING® Dialyseschlauch 28 mm, SERVA Electrophoresis, Heidelberg) gefüllt und gegen einen 20-fachen Überschuss an Rückfaltungspuffer (s. Tabelle 10) bei 4°C über Nacht dialysiert. Nach einem Pufferwechsel wurde erneut für 12 h dialysiert.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Rückfaltungspuffers. Dieser wurde mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

Komponente	Konzentration
L-Argininhydrochlorid	500 mM
NaCl	100 mM
H ₃ PO ₄	50 mM
TCEP	1 mM
Glycerin	5 % (v/v)

3.3 Biophysikalische Methoden

3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration einer präparierten NF110-Lösung wurde photometrisch ermittelt. Es wurde ein Extinktionsspektrum von 240 bis 340 nm aufgenommen. Mit Hilfe des Programms „Spectra Manager“ wurde das zuvor aufgenommene Spektrum des Puffers vom Proteinspektrum subtrahiert. Zur Absicherung wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Über das Lambert-Beer'sche Gesetz $E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$ konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden. Der Extinktionskoeffizient von NF110 ($75240 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) wurde *in silico* über den *ProteinCalculator v3.3* (<http://protcalc.sourceforge.net>) ermittelt.

3.3.2 Messung der Lichtstreuung

Zur Überprüfung des Aggregationsverhaltens von NF110 in Puffern verschiedener L-Arginin-Konzentrationen wurde die Lichtstreuung mit Hilfe des Fluoreszenzphotometers FluoroMax-4 ermittelt. Die Quarzglasküvette (Hellma, Müllheim) wurde mit 1 ml des jeweiligen Puffers gefüllt und für 30 min eine Pufferkennlinie aufgezeichnet. Anschließend wurde NF110 zugeben und die Änderung der Lichtstreuung detektiert. In einigen Versuchen wurde im Anschluss poly I:C (5-20 µg/ml) für eine verstärkte Aggregation zugegeben und erneut die Lichtstreuung ermittelt.

3.3.3 Analytische Ultrazentrifugation

Zur Bestimmung der Aggregationstendenz von NF110 bei unterschiedlichen Konzentrationen von L-Arginin wurde eine analytische Ultrazentrifugation durch Dr. Lilie durchgeführt. Alle Messungen wurden in Messpuffer (50 mM Na-Phosphat, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP, 5 % Glycerin, variierende L-Arginin-Konzentrationen, pH 8) mittels Optima XL-A Zentrifuge (Rotor An50Ti, Doppelsektorzellen) durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden die Proben bei 40.000 rpm und 20°C für 4 h sedimentiert. Der darauf folgende Gleichgewichtsschritt erfolgte bei 6000 rpm. Die Proteinkonzentration betrug 0,1 mg/ml. Die Daten wurden bei einer Wellenlänge von 230-280 nm mit der Software SedFit⁷⁴ analysiert. Der apparente Sedimentationskoeffizient wurde in Folge der Änderung von Viskosität und Dichte des Puffers nicht korrigiert. Die Molekularmasse des Proteins wurde über die Daten des Gleichgewichtslaufs für ein partielles spezifisches Volumen von 0,73 ml/mg und eine Pufferdichte von 1,01 g/ml für einen Puffer mit 200 mM L-Arginin berechnet.

3.3.4 Fluoreszenzphotometrische Bestimmung der Bindung von RNA und DNA

Die Affinitäten verschiedener Nukleinsäuren an NF110 wurden mittels Fluoreszenzphotometer bestimmt. Dabei wurde eine Hellma-Quarzglasküvette mit 1 ml

Messpuffer gefüllt. Es wurden 50 mM des 5'-Fam-Ex-markierten Oligonukleotids (s. Abbildung 7) vorgelegt und die Fluoreszenz bei 20 °C und 515 nm gemessen.

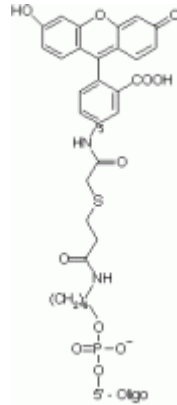


Abbildung 7: Struktur der 5'-FAM-EX-5 markierten Oligonukleotide.
(IBA Göttingen, <http://www.biosyn.com/images/Oligos/Fluorescein-5-EX.gif>)

Nun wurde L-Arginin-haltiges NF110-Material hinzugegeben, mehrmals invertiert und bei Einstellung des Gleichgewichts der Messwert (CPS/mA) notiert. Diese Titration von Protein wurde solange wiederholt bis es zu keiner Veränderung des Messwertes mehr kam. Die aufgezeichneten Werte wurden anschließend mit dem Visualisierungsprogramm KaleidaGraph 4.5 ausgewertet. Dabei wurden sie um die Volumenzunahme durch Zugabe der Proteinlösung korrigiert und auf die Ausgangsfluoreszenz normiert. Die erhaltenen Werte wurden durch folgende Gleichung für die Ligandenbindung angepasst (Golbik, 2015):

$$F_i = \left[\frac{(b + c + K_D) - \sqrt{(b + c + K_D)^2 - 4 \cdot b \cdot c}}{2 \cdot b} \right] \cdot F_{max}$$

Die verwendeten Parameter sind in der folgenden Auflistung näher erläutert:

- F_i normiertes Detektionssignal (rel. Einheit)
- K_D Dissoziationskonstante ($\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$)
- b Oligonukleotidkonzentration ($\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$)
- c NF90/NF110-Konzentration ($\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$)
- F_{max} maximale Signalamplitude (rel. Einheit)

3.3.5 Herstellung radioaktiv markierter RNA

In Vorbereitung auf den Filterbindungsassay musste die RNA zunächst radioaktiv markiert werden. Der Standardansatz (s. Tabelle 11) wurde in einem RNase-freiem Reaktionsgefäß für 2 h bei 37°C inkubiert.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Ansatzes zur radioaktiven Markierung.

Komponente	Konzentration der Stocklösung	Konzentration im Ansatz
Kinase-Puffer	10x	1x
T4-Polynukleotidkinase	10 U/μl	0,5 U/μl
RiboLock	40 U/μl	1 U/μl
RNA		50 pmol
γ-P ³² -ATP	3000 Ci/mmol	13,33 pmol
Wasser (RNase-frei, Sigma)		<i>ad</i> 20 μl

Um die Radioaktivität dieses Ausgangsmaterials zu bestimmen, wurde eine Szintillationsmessung durchgeführt. Dazu wurden je Ansatz ein Aliquot á 0,5 μl auf ein Stück Filterpapier gegeben, mit 1 ml IrgaSafe Plus (Perkin Elmer, Waltham, USA) in einem Szintillationsgefäß inkubiert und am Szintillator (Tri-Carb 2100TR, Perkin Elmer, Waltham, USA) die Radioaktivität des Materials ermittelt.

Zudem war es wichtig, die markierte RNA von freien Nukleotiden und Proteinen zu trennen. Dazu wurde der Ansatz 5:1 mit 50% Glycerin versetzt, auf ein 20% PAA-Gel geladen und für 1 h gelelektrophoretisch getrennt. Die Banden der radioaktiv markierten RNAs wurden aus dem Gel herausgeschnitten, in 500 μl Elutionslösung (500 mM Ammoniumacetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und über Nacht schüttelnd eluiert.

Anschließend wurde die RNA über eine Phenol/Chloroform-Extraktion aufbereitet. Dem Elutionsansatz wurde ein Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, inkubiert und bei 13.000 x g für 10 min zentrifugiert. Beim nächsten Extraktionsschritt wurde der wässrigen Phase 1 Volumen Chloroform zugegeben. Es folgte eine Präzipitation mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,3 und

2,5 Volumina Ethanol (99,8 %) für 30 min bei – 20 °C. Der Ansatz wurde für 30 min bei 13.000 x g zentrifugiert, das Präzipitāt mit Ethanol (75%) gewaschen und luftgetrocknet. Das entstandene RNA-Pellet konnte nun in 21 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und ein Aliquot zur Szintillationsmessung eingesetzt werden. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt.

3.3.6 Filterbindungsassay

Beim Filterbindungsassay handelt es sich, im Gegensatz zur Bestimmung der RNA-Bindung über Fluoreszenzphotometrie (s. 3.3.2), um ein diskontinuierliches Messverfahren. Dabei werden Ansätze ansteigender NF110-Konzentration mit 0,5 nM radioaktiv markierter RNA in Assaypuffer (s. Tabelle 12) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zusatz von BSA zum üblichen Lagerpuffer von NF110 (s. Tabelle 7) diene der Unterdrückung unspezifischer Signale.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Assaypuffers (FBAP) mit und ohne L-Arginin.

Beide Puffer wurden mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

FBAP ohne Arginin		FBAP mit Arginin	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
NaCl	100 mM	NaCl	100 mM
H ₃ PO ₄	50 mM	H ₃ PO ₄	50 mM
TCEP	1 mM	TCEP	1 mM
Glycerin	5 % (v/v)	Glycerin	5 % (v/v)
BSA	20 µg/ml	BSA	20 µg/ml
		L-Argininhydrochlorid	500 mM

Der Inkubationsansatz (100 µl) wurde bei angelegtem Vakuum über eine *dot-blot*-Apparatur (Bio-Rad, Hercules, USA) gesaugt, in der sich zwei mit FBAP equilibrierte Membranen befanden: eine Nitrocellulosemembran (Protran, Whatman) und

DEAE-Zellulosepapier (DE81, Whatman). Erstere diente der Bindung von Protein-RNA-Komplexen, letztere der Bindung freier RNA.

Anschließend wurde die Membran, sofern nicht gesondert erwähnt, zweimal mit je 100 µl FBAP gewaschen und luftgetrocknet. Die Membranen wurden auf einem Storage Phosphor Screen (GE Healthcare) für 12-62 h exponiert. Die radioaktiven Signale wurden über einen Phosphor Imager (Storm 860, Molecular Dynamics) detektiert und über das Programm ImageQuant 5.0 (GE Healthcare) quantifiziert.

4 Ergebnisse

4.1 Chromatographische Reinigung von NF110

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht das humane Protein NF110, das rekombinant in *E. coli* in Form von *inclusion bodies* produziert wurde. Diese Einschlusskörperchen wurden gemäß der Strategie nach Gallrein (2014) chromatographisch vorgereinigt und die proteinhaltigen Fraktionen im denaturierten Zustand vereinigt, schockgefroren und bei – 20 °C gelagert.

Im Folgenden soll beschrieben werden, wie dieses Ausgangsmaterial im Rahmen der vorliegenden Arbeit chromatographisch weiter aufgearbeitet wurde, um eine hoch-reine NF110-Lösung für die biophysikalische Charakterisierung einsetzen zu können.

4.1.1 Kationenaustauschchromatographie - „*Capture*“

Das vorliegende NF110-Material sollte im ersten Reinigungsschritt, auch *capture* genannt, grob von Fremdproteinen und Nukleinsäuren getrennt werden. Für die dafür vorgesehene Kationenaustauschchromatographie wurde das Material vorab dialysiert und ultrazentrifugiert (s. 3.1.1). Es konnte ein klarer Überstand von einem gelblich-glasigen Nukleinsäure-Pellet dekantiert werden. Davon wurden 30 ml auf eine equilibrierte Säule geladen. Durch die Kationenaustauschchromatographie konnten enthaltene Proteine erfolgreich voneinander getrennt werden, was im Chromatogramm in Form von 4 Peaks ersichtlich wird (s. Abbildung 8). Über eine SDS-PAGE, bei der ausgewählte Fraktionen der Peaks aufgetragen wurden, konnten die NF110-haltigen Fraktionen ermittelt werden. Vor allem das Protein des dritten Peaks (Elutionsvolumen 188-213 ml) weist eine typische Bande von 110 kDa auf. Da diese Fraktionen noch nicht vollständig von Fremdprotein befreit und vor allem immer noch stark Nukleinsäure-beladen vorlagen, mussten sie für den nächsten Schritt („*Intermediate*“, s. 4.1.2) vereinigt und weiter chromatographisch aufbereitet werden.

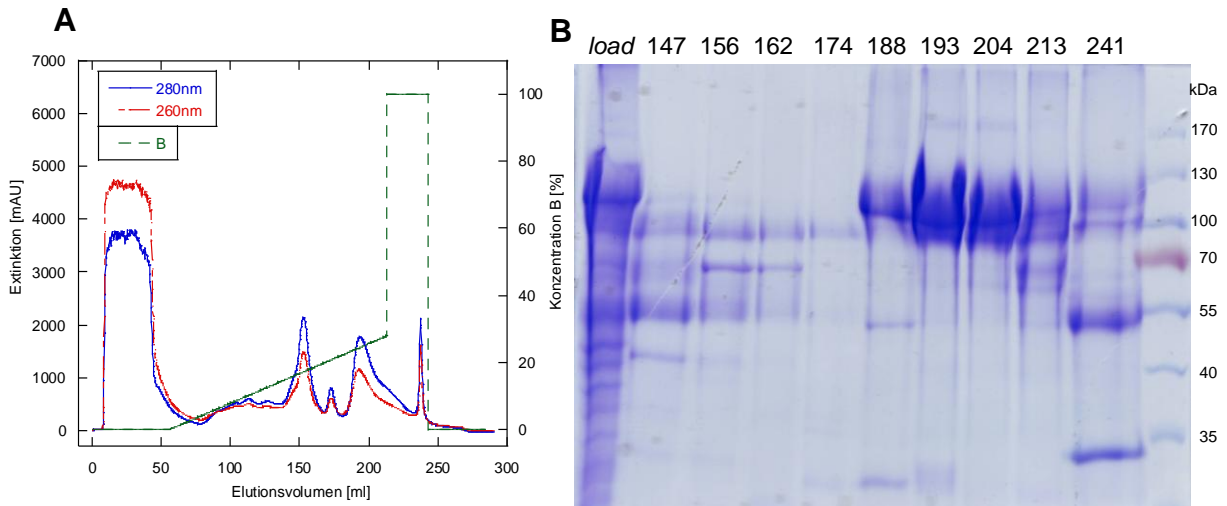


Abbildung 8: Chromatogramm der Kationenaustauschchromatographie von denaturiertem NF110 und SDS-PAG ausgewählter Fraktionen.

A: Trennung der Proteinlösung durch Elution mit Puffer B im Gradientenverfahren (0 % bis 28 %, dann 100%). Fraktionierung der 4 Hauptpeaks á 3 ml.

B: Coomassie-gefärbtes, 10%-iges SDS-PAG. Dabei wurden der *load* und ausgewählte Fraktionen der Peaks aufgetragen. Die Bezeichnungen entsprechendem Elutionsvolumen. Der besseren Sichtbarkeit halber wurden vom *load* nur 50% des üblichen Volumens an Proteinlösung eingesetzt.

4.1.2 Größenausschlusschromatographie - „*Intermediate*“

Aus dem NF110-Material (s. 4.1.1) sollten im „*Intermediate*“-Schritt mittels Größenausschlusschromatographie Aggregate und Fremdproteine abgetrennt werden. Da das Material in denaturierendem Puffer (6 M Gdm-Cl bzw. 8 M Harnstoff) vorlag, war eine vorherige Dialyse zur Rückfaltung des Materials bzw. zum Pufferwechsel nötig (s. 3.2.2). Das dialysierte Material wurde über Zentrifugalkonzentratoren eingengt (s. 3.2.3), die Proteinkonzentration bestimmt (s. 3.3.1) und für die Gelfiltration eingesetzt. Da bekannt war, dass natives NF110 ohne Zusatz des Faltungshelfers L-Arginin zur Aggregation neigt, enthielt jeder der folgenden Puffer 500 mM L-Arginin.

Im Chromatogramm der Gelfiltration (s. Abbildung 9) sind deutlich voneinander getrennte Peaks ersichtlich, wobei NF110 in monomerer Form wegen der geringeren Molekulargröße im Vergleich zur oligomeren Spezies zuletzt eluiert. Das SDS-PAG zeigt eine deutliche NF110-Bande in allen Fraktionen, wobei die monomeren Fraktionen G12-H10 (Elutionsvolumen 182-190 ml) sich durch eine Abreicherung von Nukleinsäuren ($E_{260nm} < E_{280nm}$) auszeichneten. Sie wurden vereinigt und auf Eis gelagert.

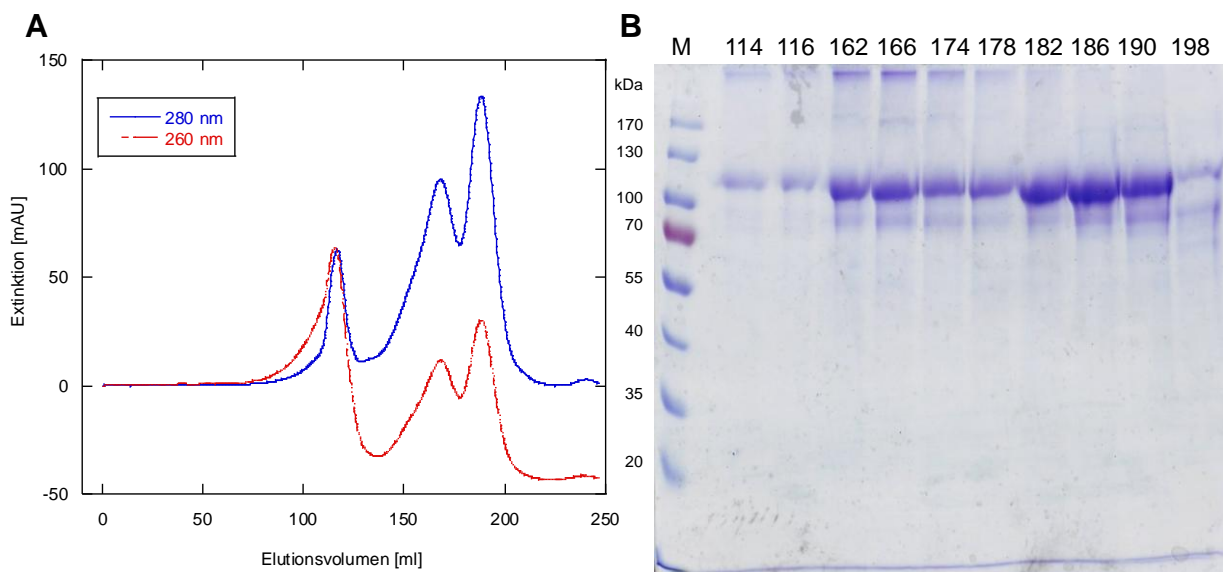


Abbildung 9: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von nativer NF110-Lösung und SDS-PAG ausgewählter Fraktionen.

A: Trennung der Proteinlösung nach hydrodynamischen Eigenschaften in drei Spezies: von höher oligomeren (Peak 1) bis zu monomeren (Peak 3) NF110.

B: Coomassie-gefärbtes 10%-iges SDS-PAG. Es wurden ausgewählte Fraktionen der Peaks aufgetragen. Deren Bezeichnungen entsprechen dem Elutionsvolumen. Es wurden stets gleiche Volumina an Proteinlösung aufgetragen.

4.1.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Das monomere NF110 sollte über eine HIC-Phenylsepharose-Säule von restlichen Verunreinigungen befreit werden. Angedacht war, dass die Aromaten der Säulenmatrix mit dem Protein interagieren und durch einen Stufengradient mit harnstoffhaltigem Puffer NF110 in gereinigter Form eluiert.

Allerdings konnte bei dieser Chromatographie weder ein deutlicher Peak (280 nm) noch eine deutliche Bande im SDS-PAG beobachtet werden. Daher wurde die Pufferzusammensetzung so verändert, dass als Elutionspuffer (B) nun stärkere chaotrope Substanzen zum Einsatz kamen (s. 3.1.2). Aber auch bei Verwendung von Gdm-Cl und Gdm-SCN konnte kein NF110 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde davon ausgegangen, dass das Protein in stets geringen Konzentrationen eluierte, sich kein deutlicher Peak ausbildete und die Methode zur Feinreinigung nicht geeignet erscheint.

4.1.4 Affinitätschromatographie – „Polishing“

Die letzte Chromatographiestufe ist das sogenannte *polishing* und konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgreich verbessert werden. Durch den Einsatz einer HiTrap™ Heparin-Säule konnten erfolgreich Nukleinsäuren abgetrennt werden. Dies ist im Chromatogramm (s. Abbildung 10A) anhand des deutlichen Peaks bei 100 % B zu erkennen. Der Extinktionswert für 260 nm ist mit 124 mAU dreimal höher als der für 280 nm (39 mAU), wohingegen es sich beim Durchlauf (Peak 0-32 ml) genau umgekehrt verhält. Das SDS-PAG zeigt, dass die Durchlauffraktionen (14 – 26 ml) neben NF110 nur wenig Fremdproteine enthalten (s. Abbildung 10B). Da es durch die chromatographische Reinigung zum Verdünnen der Probe kam, wurden die Fraktionen gepoolt, einkonzentriert und im Lagerpuffer (500 mM L-Arginin, 100 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphat, 1 mM TCEP, 5 % Glycerin, pH 8) bei – 80°C gelagert.

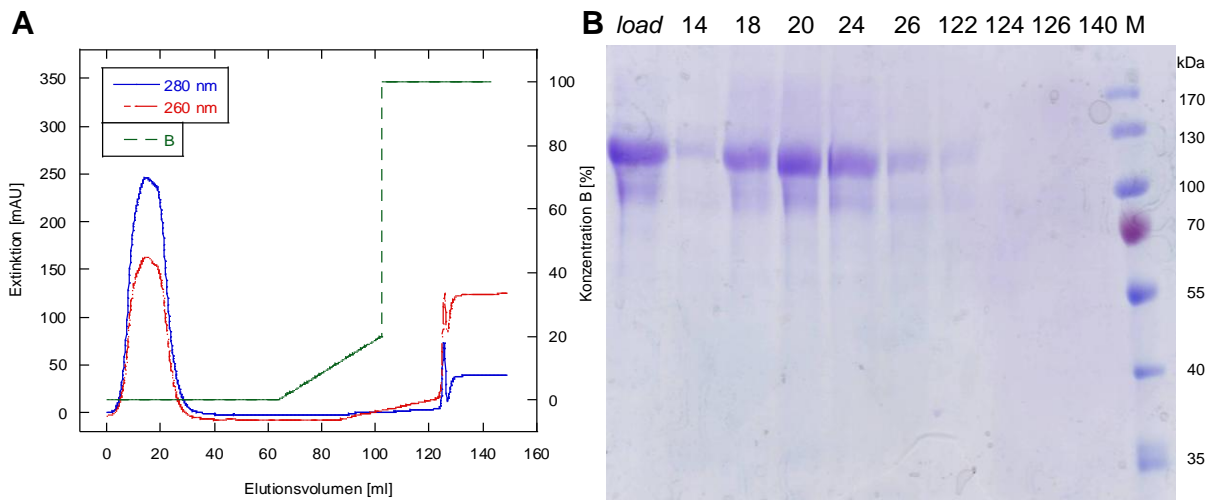


Abbildung 10: Chromatogramm der Affinitätschromatographie einer nativen NF110-Lösung und SDS-PAG ausgewählter Fraktionen.

A: Trennung der Proteinlösung durch Elution mit Puffer B im Gradientenverfahren (0 % bis 20 %, dann 100%). Fraktionierung des Durchlaufs und Peaks á 2 ml.

B: Coomassie-gefärbtes 10%-iges SDS-PAG. Es wurden ausgewählte Fraktionen der Peaks aufgetragen. Deren Bezeichnungen entsprechen dem Elutionsvolumen. Es wurden stets gleiche Volumina an Proteinlösung aufgetragen.

4.1.5 Übersicht zur erweiterten Reinigungsstrategie für NF110

Das rückgefaltete Protein wurde mit Hilfe von drei aufeinander aufbauenden, chromatographischen Schritten gereinigt, von Nukleinsäuren und Fremdproteinen befreit und in hochkonzentrierter, stabiler Form bei – 80 °C gelagert. Der Ablauf dieses Reinigungsprozesses ist in der Abbildung 11 zusammenfassend dargestellt.

Reinigungsphase		Bemerkungen
Isolation und Klärung	denaturiertes NF110 (aus IBs)	vorliegendes Ausgangsmaterial
	Ultra-zentrifugation und Kationenaustausch-FPLC	8 M Harnstoffpuffer (s. 3.1.1)
	Rückfaltung mittels Dialyse	L-Arginin-Puffer (s. 3.2.5)
Intermediate	Zentrifugalkonzentration	s. 3.2.3
	Größenausschlusschromatographie	zur Oligomerenabtrennung (s. 3.1.4)
	Zentrifugalkonzentration	s. 3.2.3
Polishing	Affinitätschromatographie	Feinreinigung (s. 3.1.3)
	Zentrifugalkonzentration und Lagerung	Lagerung der NF110-Lösung bei – 80 °C in Arginin-haltigem Puffer

Abbildung 11: Übersicht zur erweiterten Reinigungsstrategie von NF110.

Die Reinigung von NF110 erfolgte in aufeinanderfolgenden Schritten, wobei das Ausgangsmaterial *inclusion bodies (IBs)* entstammt. Es wurden unterschiedliche chromatographische Trennverfahren in den einzelnen Phasen eingesetzt, wobei *capture* die grobe Vorreinigung, *intermediate* die Hauptreinigung und *polishing* die Feinreinigung des Proteins darstellt. Zu diesen Reinigungsschritten sind die verwendeten Methoden als Verweise angegeben.

4.2 Proteinchemische Charakterisierung von NF110

4.2.1 Reinheitsprüfung

Nach der chromatographischen Reinigung des Proteins musste das Proteinspektrum zur Überprüfung der Reinheit und Ermittlung der Proteinkonzentration aufgenommen werden. Da Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten, wie Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan, Licht absorbieren, ist so ein Absorptionsspektrum jedes Proteins mit diesen Aminosäuren messbar. Das Spektrum von NF110 zeigt ein deutliches Extinktionsmaximum bei 276 nm, nicht wie üblich bei 280nm. Dieser Effekt ist durch den hohen Anteil an Tyrosinen in NF110 zu begründen.

Das Verhältnis der Extinktionswerte bei 280 nm zu 260 nm gilt als Maß für die „Abreicherung“ von Nukleinsäuren. Mit einem Wert von 1,7 bestätigte sich die erfolgreiche chromatographische Entfernung von Nukleinsäuren durch die Chromatographieschritte *intermediate* und *polishing*.

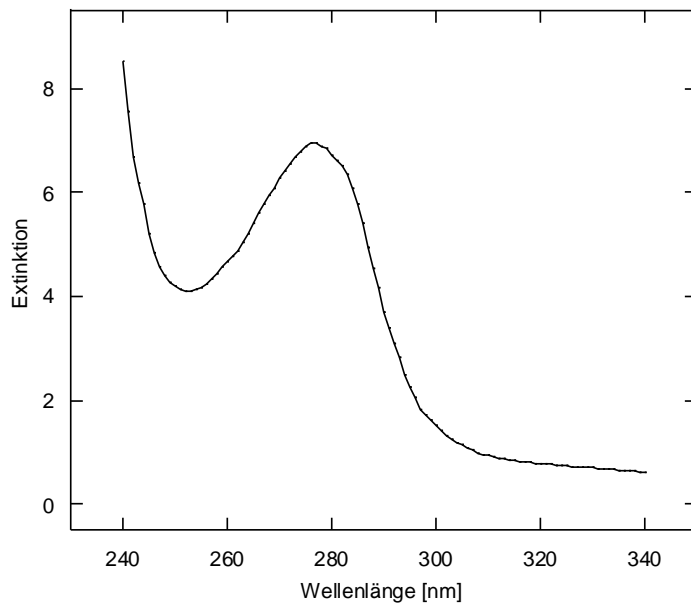


Abbildung 12: Absorptionsspektrum einer gereinigten NF110-Lösung.

Es wurde das Absorptionsspektrum von 240 – 340 nm einer aufkonzentrierten NF110- Lösung ermittelt. Als Referenzsubstanz (*blank*) diente L-Arginin-haltiger Puffer (s. 3.1.4). Wegen der hohen Extinktionswerte wurde NF110 in verdünnter Form gemessen (Angabe in aus Verdünnung resultierender Extinktion).

4.2.2 Stabilisierung durch L-Arginin

Durch eine Messung der Lichtstreuung wurde das Aggregationsverhalten von NF110 in Abhängigkeit von der L-Arginin-Konzentration untersucht. Dabei konnte eine Aggregationsneigung bei Messpuffern mit geringen L-Arginin-Konzentrationen (0 und 100 mM) festgestellt werden. Insbesondere ohne Arginin war die Erhöhung der Lichtstreuung bei Zugabe von NF110 deutlich, was für eine massive Aggregation des Proteins spricht (s. Abbildung 13A).

Mit einer Erhöhung des Streulichtsignals um 492 % bzw. 227 % liegen die Puffer mit 0 mM bzw. 100 mM in einem Bereich, der sich deutlich von den Puffern mit 200 – 500 mM L-Arginin unterscheidet. Bei letzteren beträgt der Signalanstieg nur 28 – 51 % und bildet damit einen „homogenen“ Bereich, der im Folgenden als „Vertrauensbereich“ bezeichnet wird (s. 5.1).

Aus den Daten kann somit geschlossen werden, dass NF110 ohne L-Arginin zeitnah aggregiert und in dieser Form für längerfristige Messung nicht geeignet ist. Offensichtlich ist das Protein erst bei Zusatz von mindestens 200 mM L-Arginin stabil und in seiner Aggregationsneigung derart gehemmt, dass es für die Bestimmung der RNA-Bindung über Fluoreszenzmessungen (s. 3.3.4) einsetzbar ist.

Des Weiteren wurde bei 0, 200 und 500 mM L-Arginin der Aggregationseffekt durch Zugabe von 5 - 20 µg poly I:C näher beleuchtet (s. Abbildung 13B). Diese Substanz ist als Induktor für eine Proteinaggregation bekannt (Tobias Schmidt, Daten unveröffentlicht) und führte auch bei NF110 zur Trübung des Reaktionsansatzes.

Allerdings blieb die daraus resultierende Verstärkung des Messsignals nur beim Ansatz ohne L-Arginin bestehen (durchschnittlich 179500 CPS/mAmp). Bei den Puffern mit 200 und 500 mM L-Arginin wurde zwar auch eine Erhöhung der Streulichtintensität beobachtet, die allerdings rasch wieder abnahm und über den Messzeitraum nur zu einer verhältnismäßig geringen Verstärkung der Lichtstreuung führte.

Selbst durch eine gesteigerte Zugabe von poly I:C zum L-Arginin-haltigen Ansatz konnte der Messwert von NF110 in L-Arginin-freiem Puffer ohne poly I:C (83415 CPS/mAmp) nicht erreicht werden. Dieses Ergebnis bestärkt den positiven Einfluss von L-Arginin auf die Proteinstabilität bzw. Verminderung der Proteinaggregation.

Ergebnisse

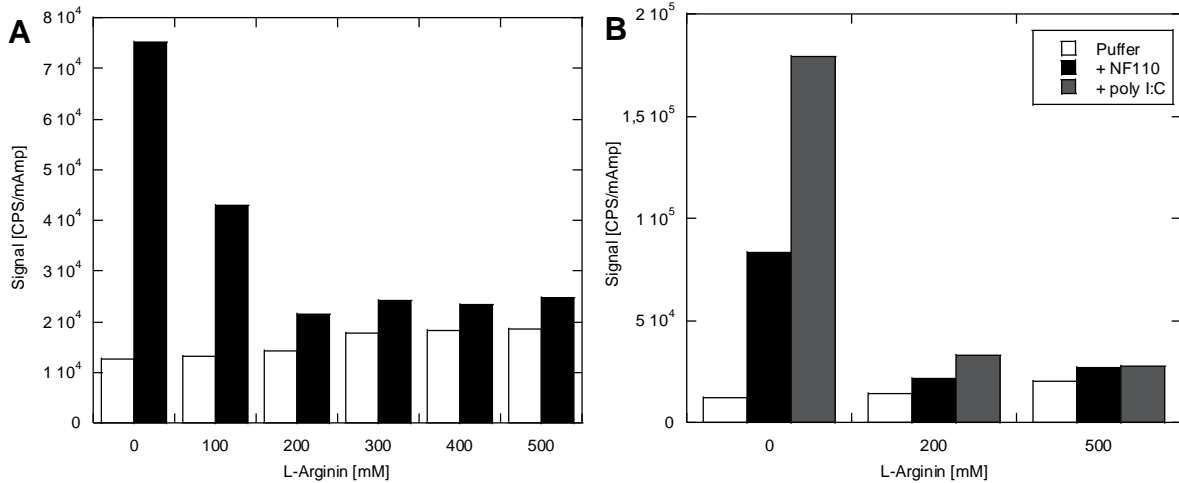


Abbildung 13: Untersuchung des Einflusses von L-Arginin auf die Stabilisierung bzw. Aggregationsneigung von NF110.

A: Messung der Lichtstreuung des Puffers mit 0-500 mM L-Arginin (weiß) und nach Zugabe von 755 nM NF110 (schwarz). Die Messung erfolgte bei 350 nm für 100 min.

B: Messung der Lichtstreuung des Puffers mit 0-500 mM L-Arginin (weiß), nach Zugabe von 755 nM NF110 (schwarz) und 5-20 µg poly I:C (grau). Die Messung erfolgte bei 350 nm für 100 min.

4.2.3 Bestimmung der Aggregationstendenz

Zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens wurde neben den Messungen der Streulichtintensität auch eine analytische Ultrazentrifugation eingesetzt. Dabei kamen Messpuffer mit 0, 100, 200, 300, 400 und 500 mM L-Arginin zum Einsatz, wobei die Daten für 300 mM L-Arginin wegen eines technischen Defekts nicht auswertbar waren.

Während der Gleichgewichtseinstellung wurde die Extinktion bei 280 nm bestimmt (s. Abbildung 14A). Die Daten zeigen, dass NF110 in Puffern mit 200 - 500 mM L-Arginin stabil blieb, wohingegen das Protein in Anwesenheit von 0 bzw. 100 mM L-Arginin über den Messzeitraum aggregierte. Hier konnte keine Extinktion (280 nm) von intaktem Protein im Messbereich über 6,7 cm detektiert werden. Die Daten des vorangegangenen Sedimentationslaufs zeigen aber auch, dass innerhalb dieses vierstündigen Laufs das Protein in L-Arginin-armen Puffern (0 und 100 mM) nicht vollständig aggregierte. Das lässt den Schluss zu, dass der Aggregationsprozess zeitabhängig ist und bei höheren L-Arginin-Konzentrationen verzögert bzw. unterdrückt wird. Offensichtlich ist das Protein erst bei einer Konzentration von

mindestens 200 mM L-Arginin für längere Zeit vor Aggregation geschützt, was sich mit den Daten der Streulichtmessung (s. 4.2.2) und dem daraus bestimmten Vertrauensbereich deckt.

Überdies wurde mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation der apparente Sedimentationskoeffizient (s. Abbildung 14B) und das Molekulargewicht von NF110 ermittelt. Dabei wurden die Messdaten mit 200 mM L-Arginin verwendet, der kleinsten Konzentration an L-Arginin, bei der das Protein stabil vorlag. Das berechnete Molekulargewicht von NF110 beträgt 128 kDa.

Die Untersuchung zeigte aber auch, dass der steigende L-Arginingehalt und die damit veränderte Viskosität und Dichte des Puffers das Sedimentationsverhalten beeinflusst. Damit geht eine Veränderung des apparenten Sedimentationskoeffizienten einher (s. Abbildung 14B), wodurch der mit 128 kDa leicht erhöhte Wert des kalkulierten Molekulargewichts zu begründen ist.

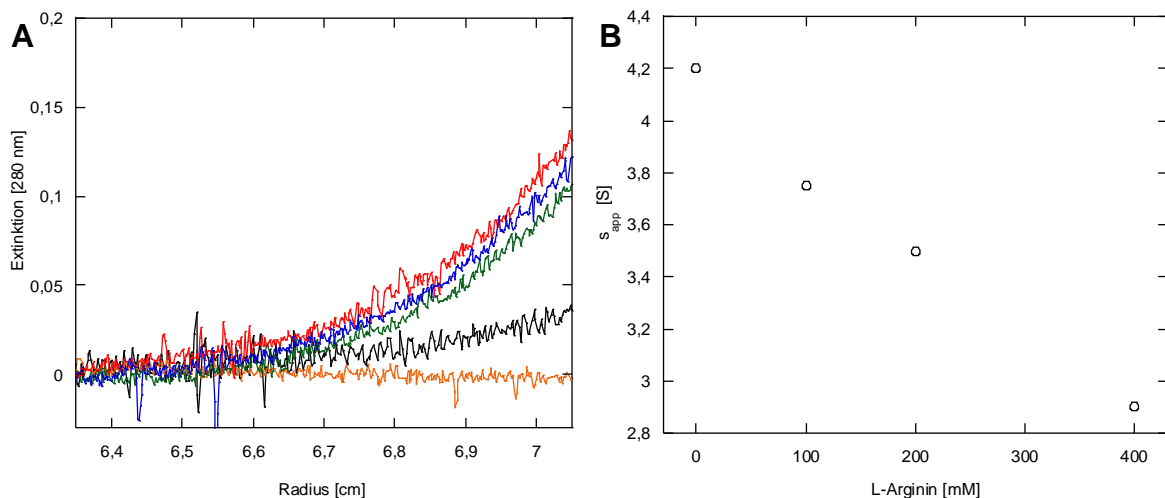


Abbildung 14: Untersuchung der Aggregationsneigung von NF110 in Abhängigkeit von L-Arginin mittels analytischer Ultrazentrifugation.

A: Messung der Extinktion bei 280 nm während der analytischen Ultrazentrifugation mit 100 µg/ml NF110 in Messpuffer mit variierenden Konzentrationen an L-Arginin:

0 mM (schwarz), 100 mM (orange), 200 mM (grün), 400 mM (rot), 500 mM (blau).

B: Abhängigkeit des apparenten Sedimentationskoeffizienten vom L-Arginingehalt.

4.3 Bindung von RNA durch NF110

4.3.1 Bestimmung der Dissoziationskonstanten über Fluoreszenzmessung

Nach der proteinchemischen Reinigung und Charakterisierung von NF110 sollte die Bindung des Proteins an einzelsträngige und doppelsträngige RNA bzw. DNA untersucht werden. Dazu wurden Fluoresceinamidit-gekoppelte Oligonukleotide eingesetzt und über eine Titration von NF110 die Veränderung des Fluoreszenzsignals, bedingt durch das *quenching* des Fluorophors während der Bindung, verfolgt.

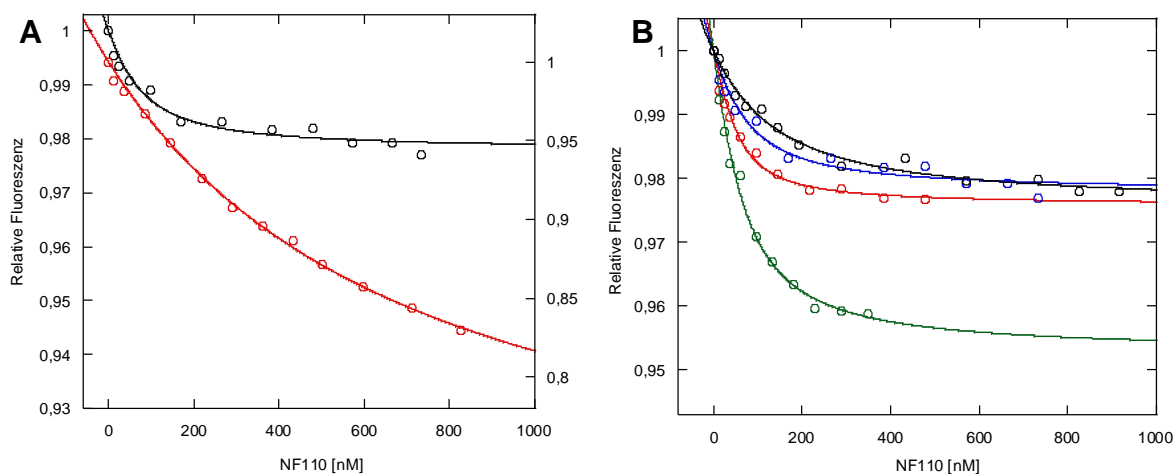


Abbildung 15: Bindung von NF110 an verschiedene Oligonukleotide und Vergleich des Messsystems mit bzw. ohne Zusatz von L-Arginin.

A: Vergleich der Bindung von NF110 an 16 ssRNA in Puffer ohne (rot) und mit (schwarz) L-Arginin.

B: Darstellung der Bindung von NF110 an 16 ssRNA (blau), 16/13 dsRNA (rot), 33/36 dsRNA (grün) und 16/13 dsDNA (schwarz). Die Bindung an diese Fluoresceinamidit-gekoppelten Oligonukleotide wurde über eine Messung der Fluoreszenz verfolgt. Die Daten wurden über die Gleichung der Ligandenbindung angepasst (*fit*, s. 3.3.4).

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante ist es unabdingbar, dass das Protein während der Messung nicht aggregiert und stabil vorliegt. Daher wurde zuerst die Bindung zwischen NF110 und 16 ssRNA in Messpuffer mit und ohne L-Arginin untersucht (s. Abbildung 15A). Hier wird deutlich, dass die Messamplitude im Puffer mit L-Arginin (ca. 2,5 %) wesentlich geringer ausfällt als ohne L-Arginin (ca. 18%). Dies ist durch die erhöhte Ionenstärke der eingebrachten Chloridionen und dem damit verbundenen *quenching* des Fluorophors zu begründen. Allerdings ist auch der Unterschied der Kurvenverläufe auffällig. Während im Puffer mit L-Arginin ein typisches Bindungsverhalten ersichtlich wird, zeigt sich beim Einsatz von L-Arginin-freiem Messpuffer ein flacheres, nahezu lineares Verhalten, bei dem keine

korrekte Sättigung zu verzeichnen ist. Da aber der Ausgangswert beider Messsysteme nahezu identisch ist, weisen die Ergebnisse darauf hin, dass es im Messpuffer ohne L-Arginin zu unspezifischen Bindungen kommt, wodurch die Messamplitude künstlich gesenkt wird. Diese unspezifischen Bindungen sind durch eine Bildung von Aggregaten erklärbar. Da aus diesen fehlerbehafteten Bindungskurven, die keine Einstellung des Gleichgewichts zeigten, die Dissoziationskonstante nicht korrekt zu berechnen ist, wurde im weiteren Verlauf stets Puffer mit 500 mM L-Arginin als Aggregationshemmer verwendet.

Anschließend sollte die Bindung von NF110 zu unterschiedlich langen bzw. doppelsträngigen und einzelsträngigen Oligonukleotiden vergleichend beleuchtet werden. Die Abbildung 15B zeigt die dazu ermittelten Bindungskurven. Die Messung wurde solange durchgeführt bis es zur Sättigung und Einstellung eines Gleichgewichts kam. Aus dem unterschiedlichen Verlauf der Kurven wird ersichtlich, dass NF110 zu jedem Substrat eine andere Affinität aufweist. So konnten bei einigen Oligonukleotiden erst größere NF110-Konzentrationen eine deutliche Senkung des Fluoreszenzsignals bewirken, was sich in einem flacheren Kurvenverlauf äußerte. Dies war vor allem bei der Bindung zwischen NF110 und 16/13 dsDNA der Fall. Die Affinität zu den drei verwendeten RNAs äußerte sich in einem steileren Kurvenverlauf und einer daraus resultierenden geringeren Dissoziationskonstante K_D . Diese wurde mit Hilfe einer Anpassung über die Gleichung der Ligandenbindung realisiert und ist für jedes Oligonukleotid in der Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Dissoziationskonstanten für die Bindung von NF110 zu diversen Nukleinsäuren.

Oligonukleotid (FAM-markiert)	K_D [nM]
16/13 dsDNA	$121,8 \pm 12,8$
16/13 dsRNA	$24,0 \pm 5,3$
33/36 dsRNA	$58,7 \pm 7,4$
16 ssRNA	$50,4 \pm 14,6$

Beim Vergleich der Dissoziationskonstanten fällt auf, dass das Protein die 16/13 dsDNA mit einem K_D von 121,8 nM wesentlich schlechter gebunden hat, als die verwendeten RNAs. Aber auch bei der Bindung zwischen NF110 und den RNAs konnten Affinitätsunterschiede nachgewiesen werden. Die stärkste Bindung und somit der geringste K_D -Wert konnte zwischen NF110 und der kurzen doppelsträngigen RNA (16/13 dsRNA) nachgewiesen werden. Mit 24,0 nM ist der Wert ca. 5-mal geringer als der von 16/13 dsDNA, was die Funktion von NF110 als RNA-bindendes Protein unterstützt. Die Affinität des Proteins zu längerer, doppelsträngiger (33/36 dsRNA) bzw. kurzer, einzelsträngiger RNA (16 ssRNA) liegt in einem ähnlichen Bereich (58,7 bzw. 50,4 nM). Im Vergleich zur 16/13 dsRNA ist sie damit nahezu um den Faktor 2,5 verringert. Offensichtlich beeinflusst nicht nur die Art des Bindungspartners, ob DNA oder RNA, sondern auch Länge und Beschaffenheit, ob einzelsträngig oder doppelsträngig, maßgeblich die Bindung zum Protein.

4.3.2 Bestimmung der Dissoziationskonstanten über Filterbindungsassays

Zur Verifizierung der über Fluoreszenzmessung ermittelten Dissoziationskonstanten kam die Methode des Filterbindungsassays zum Einsatz. Zum Vergleich zwischen doppel- und einzelsträngiger RNA wurden die 16/13 dsRNA bzw. 13 ssRNA ausgewählt und zuerst radioaktiv markiert (s. 3.3.5). Durch die Messung der Radioaktivität mittels Szintillation vor und nach der Markierung bzw. Reinigung konnte die Ausbeute bestimmt werden. Während bei der 13 ssRNA noch 13,2 % des Ausgangssignals detektierbar waren, konnte die 16/13 dsRNA nur zu 0,09 % radioaktiv markiert werden. Offensichtlich konnte die T4-Polynukleotidkinase die einzelsträngige RNA im Vergleich zur doppelsträngigen RNA besser phosphorylieren. Daher wurde nun zuerst die 13 ssRNA für die Filterbindungsassays eingesetzt.

Im ersten Assay wurden 0,5 nM 13 ssRNA mit ansteigender Konzentration an NF110 in L-Arginin-haltigem Assaypuffer (FBAP) inkubiert und aufgetragen. Eine quantitative Auswertung der Bilddaten war nicht möglich, da es zum Verlaufen der aufgetragenen Ansätze kam. Daher war eine Fehlersuche und Methodenoptimierung nötig, die im folgenden Abschnitt erläutert wird.

Ergebnisse

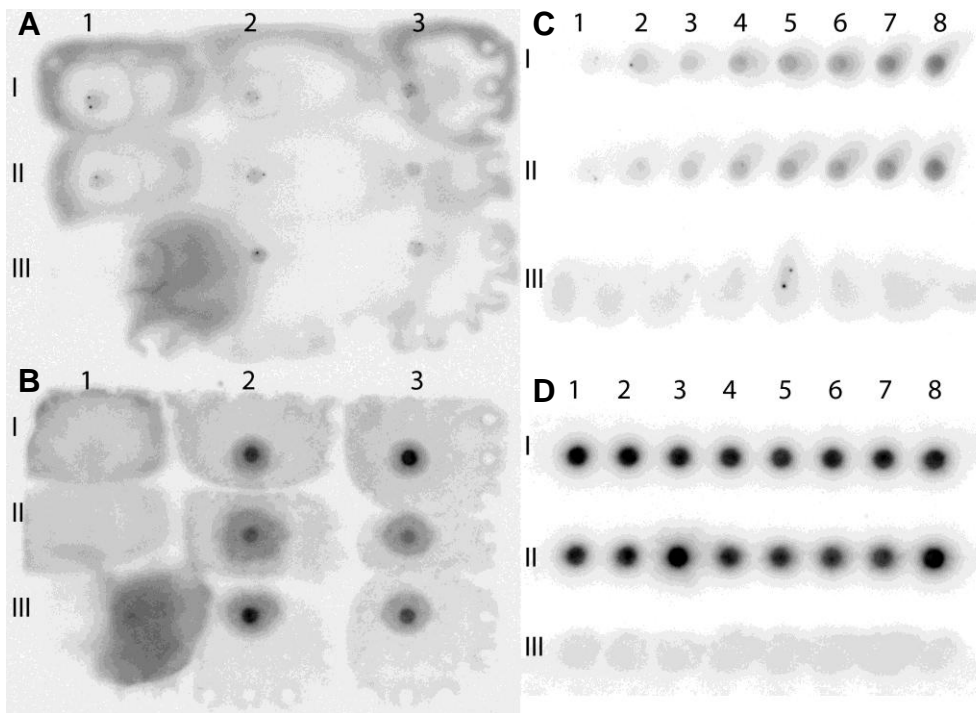


Abbildung 16: Test verschiedener Bedingungen zur Optimierung der Filterbindungsassays.

A und B: Untersuchung der Pufferbedingungen (FBAP +/- L-Arginin) und des Methodenablaufs. Eingesetzt wurden je 0,5 nM 13 ssRNA und 0 nM NF110 (Zeile I), 20 nM NF110 (Zeile II) bzw. 200 nM NF110 (Zeile III). Es wurden folgende Herangehensweisen (Spalte 1-3) getestet: Methode 1 mit FBAP + L-Arginin bei Equilibrierung, Inkubation und Waschschriff (2x); Methode 2 mit FBAP + L-Arginin bei der Inkubation, aber FBAP - L-Arginin für die Equilibrierung und Waschschriffe (2x); Methode 3 wie Methode 2, aber nur 1x Waschschriff. A (Nitrocellulosemembran). B (Zellulosepapier DE81).

C und D: Untersuchung des Einflusses der Waschschriffe im Rahmen der Methodenoptimierung. Eingesetzt wurden je 0,5 nM 13 ssRNA und in den Spalten 1-8 steigende Konzentrationen von NF110 (0, 12, 35, 80, 200, 400, 800, 1037 nM). Es wurden folgende Herangehensweisen (Zeile I-III) getestet: Methode I mit FBAP - L-Arginin bei Equilibrierung, Inkubation und Waschschriff (2x); Methode II mit FBAP - L-Arginin bei Equilibrierung und Inkubation, kein Waschschriff; Methode III mit FBAP - L-Arginin bei Equilibrierung, FBAP + L-Arginin für die Inkubation und kein Waschschriff. C (Nitrocellulosemembran). D (Zellulosepapier DE81).

Zuerst wurde der Einfluss von L-Arginin auf die Messmethode untersucht (s. Abbildung 16 A und B). Wenn, wie üblich, in den Schritten Equilibrierung, Inkubation und Waschen der gleiche Puffer (FBAP + L-Arginin) eingesetzt wird, konnten keine *dots* für eine quantitative Bildauswertung identifiziert werden. Da bekannt war, dass NF110 während der Inkubation (30 min) L-Arginin als Aggregationsschutz benötigt, wurde durch den Einsatz von L-Arginin-freiem Puffer beim Equilibrieren und Waschen der Membranen versucht ein Verlaufen zu verhindern. Die Abbildung 16 A und B zeigen, dass es hierdurch zu einer Verbesserung kam, die aber trotzdem nicht für eine quantitative Auswertung ausreichte. Eine klare Abgrenzung zwischen *dot* und Hintergrund war nicht gegeben,

woraus geschlossen wurde, dass L-Arginin einen starken Einfluss auf den Assay hat. Daher wurde weiter versucht den Assay zu optimieren, insbesondere durch Reduktion der Waschschriffe und Vergleich zwischen der Inkubation in FBAP mit bzw. ohne L-Arginin. Die Abbildung 16 C und D zeigen, dass beim Einsatz von FBAP ohne L-Arginin in allen drei Schritten es zur Ausprägung deutlicher, quantifizierbarer Punkte kam. Die Reduktion der Waschschriffe hatte nur einen geringen Einfluss auf die Intensität der *dots*.

Da angestrebt wurde, während der 30-minütigen Inkubation von NF110 mit 16 ssRNA L-Arginin als Aggregationsschutz zu nutzen, wurde versucht nur bei diesem Schritt FBAP + L-Arginin einzusetzen und auf den Waschschriff zu verzichten. Hier zeigte sich jedoch, dass bereits der einmalige Kontakt der Membran mit L-Arginin zum Verschmieren führte (Methode III). Es ist zu vermuten, dass L-Arginin aufgrund seiner positiven Ladung mit der negativ geladenen RNA interagiert und so eine Bindung an die positiv geladene Membran verschlechtert wird. Grundsätzlich ist daher keine Durchführung des Filterbindungsassays mit L-Arginin-haltigem Puffer möglich.

Nach der abgeschlossenen Methodenetablierung wurde nun die Bindung zwischen NF110 und 13 ssRNA mittels Filterbindungsassay ohne L-Arginin untersucht. Die Ergebnisse dieser Dreifachbestimmung sind in der Abbildung 17 dargestellt.

Durch den Filterbindungsassay wurde eine Dissoziationskonstante von $274,9 \pm 72,2$ nM ermittelt. Allerdings ist an dieser Stelle darauf hinzuweisen, dass bei der Durchführung stets L-Arginin-freier Puffer verwendet wurde, wodurch eine teilweise Aggregation bzw. Assoziation nicht auszuschließen ist. Auch der Eintrag von geringen Mengen L-Arginin (ca. 20 mM) durch das in L-Arginin-haltigem Puffer gelagerte NF110 ist zu beachten. So ist es möglich, dass Ansätze mit geringen Proteinkonzentrationen in ihrer Aggregation gehemmt worden sind, während Ansätze mit hohen Proteinkonzentrationen stärker zur Aggregation neigten. Dieser Einfluss konnte bei der Berechnung des K_D -Wertes nicht berücksichtigt werden.

Eine Bestimmung der Dissoziationskonstante für NF110 mit 16/13 dsRNA war nicht möglich, da hier keine ausreichende Schwärzung des Autoradiographiefilms erzielt wurde. Offensichtlich war die Ausgangsradioaktivität zu gering, was durch die unzureichende radioaktive Markierung der doppelsträngigen RNA erklärt werden kann.

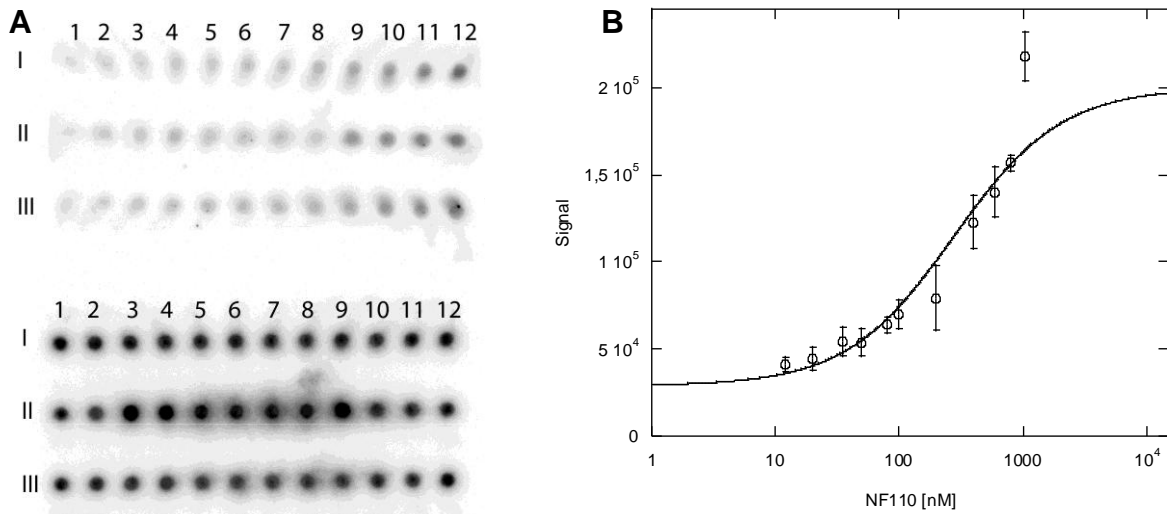


Abbildung 17: Bestimmung der Dissoziationskonstante von NF110 und 13 ssRNA mittels Filterbindungsassay.

A: Darstellung der Nitrozellulosemembran (oben) und des DE81-Zellulosepapiers (unten) nach Autoradiographie. Es wurden je 0,5 nM 13 ssRNA mit einer steigenden Konzentration an NF110 (Spalte 1-12: 0, 12, 20, 35, 50, 80, 100, 200, 400, 600, 800, 1037 nM) in FBAP – L-Arginin für 30 min inkubiert. Die Membran wurde mit FBAP – L-Arginin equilibriert und zweimal gewaschen. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt (Zeile I-III).

B: Darstellung der über ImageQuant 5.0 quantifizierten Signale und halblogarithmische Auftragung gegen die Konzentration an eingesetztem NF110. Die Daten wurden über die Gleichung der Ligandenbindung angepasst (*fit*, s. 3.3.4).

4.3.3 Auswertung über Lineare Freie Enthalpiebeziehung (LFER)

Um trotz der Aggregationstendenz des Proteins in Puffern ohne L-Arginin-Zusatz eine Dissoziationskonstante für NF110 bei 0 nM L-Arginin ermitteln zu können, wurde eine lineare freie Enthalpiebeziehung (LFER) genutzt. Dazu wurden über Fluoreszenzmessungen die Dissoziationskonstanten für Puffer mit ansteigender L-Arginin-Konzentration (0 mM – 550 mM) ermittelt. Die Methode wurde auch ausgewählt, da hierüber Rückschlüsse über den Einfluss von L-Arginin bei der RNA-Bindung gezogen werden können.

Ergebnisse

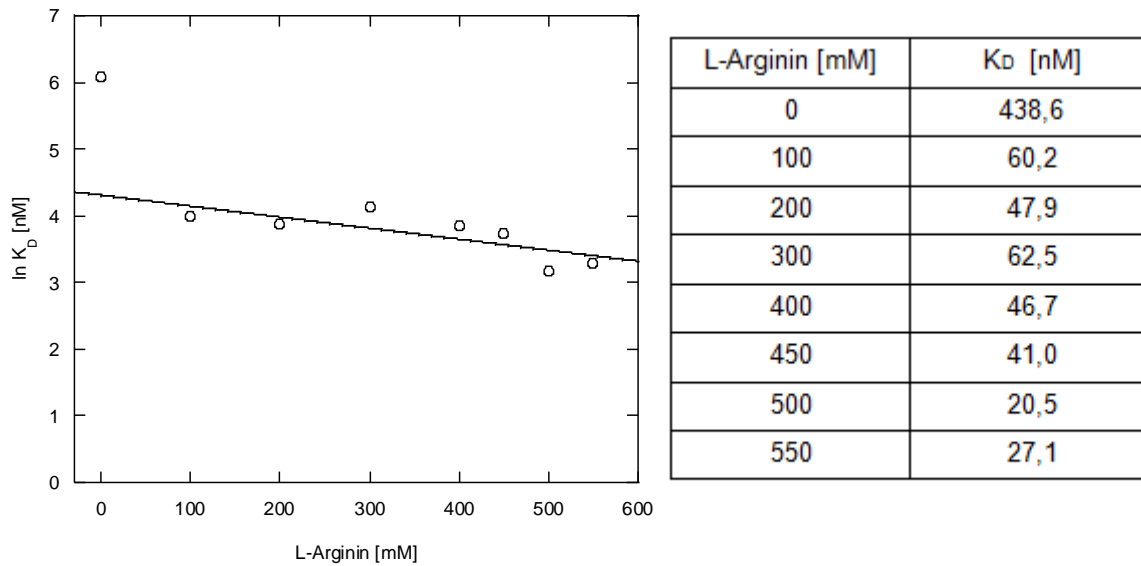


Abbildung 18: Untersuchung des Einflusses von L-Arginin auf die Messung und LFER.

Nach Ermittlung der Dissoziationskonstante für 16/13 dsRNA und NF110 in Puffer unterschiedlicher L-Arginin-Konzentration (0, 100, 200, 300, 400, 450, 500, 550 mM) wurden diese in logarithmierter Form gegen die Konzentration aufgetragen. Die Daten wurden über einen *linear fit* unter Ausschluss des Messpunktes für 0 mM L-Arginin angepasst. Die erhaltene Geradengleichung $y = 4,1307 - 0,0016512 \cdot x$ wurde zur Ermittlung der Dissoziationskonstante für 0 mM L-Arginin genutzt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Für die LFER wurden die Dissoziationskonstanten logarithmiert und in Abhängigkeit von der jeweiligen L-Arginin-Konzentration aufgetragen (s. Abbildung 18). Für den *linear fit* wurden nur die Daten des Vertrauensbereiches, bei denen keine Aggregation auftrat, genutzt. Aus der Geradengleichung kann so ein Wert außerhalb des Vertrauensbereichs für 0 mM L-Arginin extrapoliert werden.

Durch die LFER konnte erfolgreich die Dissoziationskonstante für die Bindung zwischen NF110 und 16/13 dsRNA bei 0 mM L-Arginin ohne Aggregationseinfluss ermittelt werden. Mit 74,5 nM ist dieser K_D -Wert deutlich geringer als der gemessene K_D -Wert bei 0 mM L-Arginin (438,6 nM). Somit konnte erfolgreich bestätigt werden, dass die Messung der Dissoziationskonstante ohne L-Arginin durch Aggregatbildung und damit einhergehende unspezifische Bindungen verändert wird.

Außerdem wurde über die LFER der Einfluss des L-Arginins auf die RNA-Bindung betrachtet. Die berechnete Dissoziationskonstante bei 0 nM L-Arginin ist mit 74,5 nM nur moderat höher als die im Vertrauensbereich gemessenen (durchschnittlich 43,7 nM). Dies äußert sich im verhältnismäßig flachen Anstieg der Gerade. Offensichtlich hat L-Arginin einen positiven Effekt auf die Stabilität des Proteins, während es die Protein-RNA-Bindung nur marginal beeinflusst.

Dies lässt weitere Schlüsse über die Wechselwirkungen zu, welche im Diskussions-
teil näher beleuchtet werden.

5 Diskussion

5.1 Proteinreinigung und Stabilität

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte das Protein NF110 erfolgreich chromatographisch gereinigt werden. Insbesondere die Feinreinigung (*polishing*) zur Abtrennung von Nukleinsäuren wurde dabei optimiert. Dies war nötig, da es sich um ein Nukleinsäure-bindendes Protein handelt, bei dem eine erhöhte Reinheit bzw. Nukleinsäurefreiheit für die nachfolgende proteinchemische Charakterisierung ausschlaggebend ist.

Die Aufnahme des Proteinspektrums (240-340 nm) bestätigte die erfolgreiche Entfernung von Nukleinsäuren. Das Verhältnis 280 nm/260 nm gilt als Qualitätsmaß für die Reinheit von Proteinen und sollte zwischen 1,6 und 1,9 liegen (Acker *et al.*, 1967). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten NF110-Präparationen zeigten mit 1,7 eine effektive Abreicherung von Nukleinsäuren und konnten somit für biophysikalische Messungen eingesetzt werden.

Außerdem konnte durch die photometrische Messung das Extinktionsmaximum bei 276 nm festgestellt werden, obwohl es bei den meisten Proteinen bei 280 nm liegt. NF110 enthält eine hohe Zahl an Tyrosinen: 33 im GQSY-Motiv bzw. 41 insgesamt (Wen *et al.*, 2014). Da Tyrosin bei 275 nm am stärksten absorbiert, lässt sich so die Verschiebung des Spektrums in diesen Bereich erklären.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der Stabilität von NF110 und der Reduktion von Aggregatbildungseffekten durch den Einsatz von L-Arginin. Aus den vorangegangenen Studien von Gallrein (2014) war bekannt, dass es bei der Entfernung von L-Arginin durch Dialyse zur nahezu vollständigen Aggregation von NF110 kommt. Die Daten zeigen zudem, dass die Aggregation nicht nur von der Anwesenheit von L-Arginin, sondern auch von der Zeit abhängt.

Darauf aufbauend wurden in der vorliegenden Arbeit die Streulichtintensitäten von NF110 in Puffer mit steigender L-Arginin-Konzentration im Zeitverlauf gemessen. Es zeigte sich, dass 200 – 500 mM L-Arginin zur Stabilisierung von NF110 führen, während es in Puffer mit 0 – 100 mM L-Arginin zur Proteinaggregation kam. Eine Untersuchung mit der Substanz poly I:C, die für ihre Präzipitationswirkung bei

Nukleinsäure-bindenden Proteinen bekannt ist, bestätigte diese Ergebnisse. In L-Arginin-freiem Puffer trat eine verstärkte Präzipitation auf, während in L-Arginin-haltigem Puffer (200 bzw. 500 mM) die Lichtstreuung nur marginal stieg. Dies bestätigt die Wirkung von L-Arginin als Substanz, die die Proteinaggregation *in-vitro* hemmt (Lange und Rudolph, 2009).

Da über die Messung der Lichtstreuung nur eine qualitative Aussage möglich war, musste das Aggregationsverhalten in Abhängigkeit von der L-Arginin-Konzentration über eine weitere Methode verifiziert werden. Dazu wurde eine analytische Ultrazentrifugation durchgeführt, die bestätigte, dass NF110 in Puffer unter 200 mM L-Arginin aggregiert. Daher wurde, insbesondere für die LFER, ein Vertrauensbereich definiert. In diesem Bereich, der Puffer mit 200 mM und 500 mM L-Arginin umfasst, ist das Protein für längere Zeit stabil, sodass NF110 vor Aggregation geschützt ist und für RNA-Bindungsstudien eingesetzt werden kann.

5.2 NF110 als RNA-bindendes Protein

NF110 gehört mit NF90, NF45 und einigen weiteren Vertretern zur Gruppe der dsRNA-bindenden Proteine (Reichman und Mathews, 2003). Diese NFAR-Proteine können durch Assoziation und Interaktion miteinander ihre Funktion und Affinität im RNA-Metabolismus modulieren (Guan *et al.*, 2008; Castella *et al.*, 2014).

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag daher auf der Untersuchung der RNA-Bindung durch NF110, um einen Vergleich zur C-terminal verkürzten Isoform NF90 ziehen zu können. Obwohl die Funktion des C-terminalen GQSY-Motivs noch nicht vollständig entschlüsselt ist, zeigen Studien von Shiina und Nakayama (2014), dass es für die Assoziation mit großen Ribonukleoprotein-Komplexen, welche RNA-enhaltene Proteinkomplexe darstellen, benötigt wird. Da NF90 kein GQSY-Motiv besitzt, ist davon auszugehen, dass NF90 und NF110 sich in ihren Bindungseigenschaften, insbesondere in der Affinität zu verschiedenen Nukleinsäuren, unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde über das *quenching* Fluorophor-markierter Oligonukleotide deren Bindung an NF110 untersucht. Es zeigte sich, dass NF110 zu

kurzer, doppelsträngiger RNA (16/13 dsRNA) die höchste Affinität aufweist ($K_D = 24$ nM), während doppelsträngige DNA (16/13 dsDNA) fünfmal schlechter gebunden wurde. Auch Gallrein (2014) konnte eine höhere Affinität von dsRNA im Vergleich zu dsDNA detektieren (s. Tabelle 14), was die Klassifikation als Bindeprotein für dsRNA belegt (Reichman und Mathews, 2003).

Mit 106 nM ist die Dissoziationskonstante für 16/13 dsRNA bei Gallrein (2014) über viermal höher als die in der vorliegenden Arbeit bestimmte. Allerdings wird beim Vergleich der Daten (s. Tabelle 14) deutlich, dass in diesen Studien insgesamt meist höhere Dissoziationskonstanten im Vergleich zur vorliegenden Arbeit bestimmt wurden. In Anbetracht der verwendeten Puffersysteme (mit/ohne L-Arginin) ist hier von einer Abweichung durch unspezifische Bindungen im Zuge von einhergehender Proteinaggregation auszugehen. Trotzdem zeigen beide Studien, dass NF110 nicht nur die 16/13 dsRNA gut bindet, sondern auch zur einzelsträngigen RNA (16 ssRNA) sehr affin ist ($K_D = 42$ bzw. 122 nM).

Dies stellt einen großen Unterschied zu den Messdaten für NF90 (Schmidt, 2015) dar. Die Dissoziationskonstante von 1200 nM für 16 ssRNA zeigt, dass NF90 einzelsträngige RNA wesentlich schlechter bindet als doppelsträngige RNA (Faktor 7,5). Außerdem zeigt der Vergleich, dass NF90 für längere, doppelsträngige RNA (33/36 dsRNA) überaus affin ist. Mit einem K_D von 3 nM wird 33/36 dsRNA am besten gebunden. Demnach ist die Affinität von NF90 zu 33/36 dsRNA 50-mal höher verglichen mit der kürzeren Variante 16/13 dsRNA bzw. 400-mal höher verglichen mit der einzelsträngigen RNA. Solch große Differenzen konnten für NF110 nicht beobachtet werden.

Es wird somit deutlich, dass durch NF90 bei der Affinität zu RNAs stärker variiert wird, während NF110 sowohl für einzel- als auch für doppelsträngige RNA affin ist. Dies lässt den Schluss zu, dass das GQSY-Motiv, der wesentliche Unterschied beider Isoformen, die Bindung einzelsträngiger RNA fördert. Die Bindung doppelsträngiger RNA wird ebenfalls verstärkt, da die Dissoziationskonstante für 16/13 dsRNA über 6-mal geringer ausfällt (24 nM zu 160 nM).

Tabelle 14: Vergleich der Dissoziationskonstanten [nM] von NF110 und NF90.

Protein	Referenz	16/13 dsRNA	16 ssRNA	33/36 dsRNA	16/13 dsDNA
NF110	vorl. Arbeit	24	42	58	120
NF110	Gallrein (2014)	106	122	22	232
NF90	Schmidt (2015)	160	1200	3	-

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Bestimmung der Dissoziationskonstanten bei unterschiedlichen L-Arginin-Konzentrationen und Anwendung einer LFER die Dissoziationskonstante außerhalb des Vertrauensbereiches (< 200 mM L-Arginin) bestimmt werden. Damit konnte erfolgreich ein Wert ermittelt werden, der weder durch Proteinaggregation noch durch das Aggregationsschutzmittel L-Arginin beeinflusst wird. Die berechnete Dissoziationskonstante hierfür beträgt 74,5 nM und fällt damit circa zweimal geringer aus als die für NF90 bestimmte Dissoziationskonstante (160 nM). Dieses Ergebnis bestärkt die Vermutung, dass das GQSY-Motiv die RNA-Bindung fördert. Offensichtlich wird durch das Fehlen des Motivs nur die Bindung längerer, doppelsträngiger RNA begünstigt.

5.3 L-Arginin – Fluch oder Segen !?

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag darin das Protein über die Zeit vor Aggregation zu schützen. Besonders bei *in vitro* rückgefalteten Proteinen ist eine vermehrte Neigung zur Aggregation üblich, insbesondere bei Einfluss von Säuren und Alkoholen, höheren Temperaturen oder mechanischem Stress. Übliche Stabilisatoren für Proteine sind Aminosäuren, wie L-Arginin, aber auch Prolin und Alanin, sowie Polymere (z. B. Polyethylenglycol) und geringe Salzkonzentrationen (Hamada *et al.*, 2009).

Aus den Untersuchungen von Gallrein (2014) ist bekannt, dass Polyethylenglycol und O-n-Octylglucosid die Aggregation von NF110 nicht hemmen. Nur der Einsatz von L-Arginin zeigte in dieser Untersuchung positive Effekte.

Darauf aufbauend wurde in der vorliegenden Arbeit die Proteinaggregation in Abhängigkeit von der L-Arginin-Konzentration untersucht. Sowohl die Streulichtmessungen als auch die analytische Ultrazentrifugation zeigten, dass NF110 bei weniger als 200 mM L-Arginin aggregierte. Auch andere Proteine sind erst bei höheren L-Arginin-Konzentrationen vor Aggregation geschützt, was für schwache Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche spricht (Arakawa *et al.*, 2006). Allerdings ging es in diesen Studien nur um die Interaktionen zwischen Arginin und dem Protein, nicht in Verbindung mit RNA.

Daher war nun zu überprüfen, inwiefern L-Arginin die RNA-Bindungsaffinität von NF110 beeinflusst. Bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten in Abhängigkeit von der L-Arginin-Konzentration des Puffers konnte jedoch gezeigt werden, dass die RNA-Bindung nur minimal beeinflusst wird. Trotz Ladungserhöhung durch L-Arginin konnte im Vertrauensbereich ein homogener Bereich an K_D -Werten von 20 – 62 nM bestimmt werden. Der geringe Anstieg in der Geradengleichung der LFER spricht dafür, dass die durch L-Arginin erhöhte Ladung kaum Einfluss auf die RNA-Bindung hat. Daraus kann geschlossen werden, dass Stapelwechselwirkungen im Vergleich zu Ladungswechselwirkungen von größerer Bedeutung sind.

Dies wird durch die Studien von Koh *et al.* (2011) unterstützt. Hier konnte gezeigt werden, dass Stapelwechselwirkungen zwischen den Nukleobasen der RNA und den aromatischen Aminosäureresten eines Proteins eine große Rolle spielen. Dies ist vor allem bei mRNA-regulierenden Proteinen der Fall, da sie über Stapelwechselwirkungen an einzelsträngige Bereiche der Ziel-RNA binden.

NF110 ist hierfür beispielhaft. Zum einen besitzt es zahlreiche aromatische Aminosäuren, die mit den Nukleobasen interagieren können: 41 Tyrosine, 14 Phenylalanine, 4 Tryptophane und 23 Histidine (Wen *et al.*, 2014). Andererseits ist NF110 als Regulator des RNA-Stoffwechsels bekannt (Castella *et al.*, 2014) und wurde in der vorliegenden Arbeit in seiner Affinität zu einzelsträngiger RNA bestätigt. Damit passt NF110 ideal in das Modell von Koh *et al.* (2011), bei dem für RNA-Protein-Komplexe vorrangig Stapelwechselwirkungen die Affinität und Spezifität des Proteins prägen.

Aber auch andere Studien belegen die Bedeutung von Stapelwechselwirkungen für RNA-Protein-Komplexe. So zeigt Maris (2005), dass sie vor allem bei eukaryotischen RNA-bindenden Proteinen – insbesondere denen mit *RNA recognition motif* (RRG) zu finden sind. Als humanes Protein mit Rolle im RNA-Stoffwechsel trifft dies auch auf NF110 zu.

Insgesamt zeigte der Einsatz von L-Arginin als Aggregationsschutz bei den Fluoreszenzmessungen kaum Einfluss, während es die Durchführung von Filterbindungsassays maßgeblich erschwerte. Im Rahmen einer Methodenentwicklung wurde der Einfluss von L-Arginin im Puffer (FBAP) beim Equilibrieren der Membran, Inkubationsansatz und Waschschrift untersucht. Wenn in einem der Schritte der übliche FBAP mit L-Arginin genutzt wurde, war eine quantitative Bildauswertung nicht möglich. Nur die Durchführung mit FBAP ohne L-Arginin führte zur klaren Abgrenzung von *dot* und Hintergrund. Eine Erklärung dafür ist die positive Ladung von L-Arginin. Hierüber interagiert es mit der negativ geladenen RNA, die dadurch maskiert wird und so nicht korrekt an die Membran bindet. Da sowohl L-Arginin als auch die Membran positiv geladen sind, konkurrieren beide um die Bindung der RNA, was eine quantitative Auswertung des Filterbindungsassays unmöglich macht.

Aus diesen Gründen wurde der Filterbindungsassay mit L-Arginin-freiem Puffer durchgeführt. Die bestimmte Dissoziationskonstante von 275 nM erscheint vergleichsweise hoch, spiegelt aber eine Messung unter Aggregationsbedingungen ab. Außerdem wird bei Betrachtung der Kurve (s. Abbildung 17 B) deutlich, dass die Werte mit höheren NF110-Konzentrationen stärker vom *fit* abweichen. Da beim Einbringen der Proteinlösung auch stets 20 mM L-Arginin mit eingebracht wurden, ist von einer Stabilisierung der Ansätze mit geringen NF110-Konzentrationen auszugehen, während die anderen Ansätze nicht vor Aggregation geschützt wurden. Insgesamt ist daher künftig von einer Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Filterbindungsassay für Proteine, die L-Arginin zur Stabilisierung benötigen, abzuraten.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Masterarbeit wurde das Protein *nuclear factor* 110 (NF110) *in vitro* rückgefaltet, chromatographisch gereinigt, durch den Zusatz von L-Arginin stabilisiert und seine Affinität gegenüber RNAs untersucht.

Zuerst wurde dazu das Ausgangsmaterial, welches aus *E. coli inclusion bodies* gewonnen wurde, mittels Dialyse rückgefaltet und über drei aufeinander folgende Chromatographieschritte gereinigt: mittels Kationenaustauschchromatographie (*capture*) zur Entfernung von Fremdproteinen, Größenausschlusschromatographie (*intermediate*) zur Trennung des monomeren Proteins von höher-oligomeren Spezies und der Affinitätschromatographie (*polishing*) zur Feinreinigung und Entfernung von Nukleinsäuren.

Das gereinigte NF110 wurde über photometrische Messungen in seiner Reinheit bestätigt und die Konzentration bestimmt. Diese Proteinlösung wurde unter Zusatz von 500 mM L-Arginin gelagert um eine Proteinaggregation zu unterbinden. Durch Streulichtmessungen und eine analytische Ultrazentrifugation konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass NF110 erst in Puffern mit mindestens 200 mM L-Arginin stabil vorliegt, während es unter dieser Grenze zur Aggregation neigt.

Daher wurde bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten stets mit L-Arginin-haltigem Puffer gearbeitet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich bestimmt werden, dass NF110 zwischen doppelsträngiger RNA und DNA diskriminiert, während es gegenüber einzel- bzw. doppelsträngiger RNA ähnlich affin ist. Dies stellt einen großen Unterschied zu NF90 dar. Diese C-terminal verkürzte Variante interagiert mit einzelsträngiger RNA in sehr geringerem Umfang als mit doppelsträngiger RNA (Schmidt, 2015). Daher kann vermutet werden, dass der C-Terminus, insbesondere das dort befindliche GQSY-Motiv, für die Spezifität gegenüber den RNAs verantwortlich ist.

Ein weiterer Fokus der Arbeit lag auf dem Einfluss von L-Arginin bei der RNA-Bindung. Dazu wurde die Dissoziationskonstante in Abhängigkeit von der L-Arginin-Konzentration bestimmt. Mit Hilfe einer linearen freien Enthalpiebeziehung (LFER) konnte so auch eine Dissoziationskonstante für nicht aggregierendes NF110 ohne L-Arginin ermittelt werden. Außerdem wurde ersichtlich, dass dieser Stabilisator zwar die Aggregation hemmt, aber nur marginal die RNA-Bindung des Proteins

beeinflusst. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass Wechselwirkungen infolge einer steigenden Ladung, bedingt durch den Eintrag von L-Arginin, geringer die Affinität beeinflussen als Stapelwechselwirkungen zwischen der RNA und den aromatischen Seitenketten des Proteins.

Dies wird auch durch den hohen Anteil an Tyrosin, Phenylalanin und Histidin in NF110 bestärkt. Allein das GQSY-Motiv, das die Spezifität gegenüber ssRNA vermitteln soll, enthält 33 Tyrosine. Um den Einfluss von Stapelwechselwirkungen zu verifizieren ist es ratsam, Mutanten von NF110 zu erstellen. Hierbei sind die folgenden Ansätze denkbar.

Durch einen Austausch aromatischer Aminosäuren gegen nicht-aromatische Vertreter kann der Einfluss von Stapelwechselwirkungen näher beleuchtet werden. Da Isoleucin zu Tyrosin und Phenylalanin als isosterisch betrachtet werden kann, bietet sich ein solcher Austausch an. Hierdurch müsste, sofern Stapelwechselwirkungen dominieren, die RNA-Bindung minimiert werden.

Um auch den Einfluss von Ladungswechselwirkungen zu beleuchten sind weitere Mutationen nötig. Dabei kann beispielsweise die Aminosäure Arginin, die häufig vertreten ist (RGG-Motiv, s. 1.1.2.3), gegen die ebenfalls positiv geladene Aminosäure Lysin ausgetauscht werden. So wird der Einfluss der Aminosäure an sich betrachtet ohne die Ladung zu verändern. Durch eine weitere Mutation, bei der eine aliphatische Aminosäure, wie Alanin oder Leucin, eingesetzt wird, kann der Einfluss der fehlenden Ladung auf die Konformation und Funktionalität des Proteins betrachtet werden.

Außerdem ist für NF110 eine Bestimmung der Dissoziationskonstante mittels LFER für andere RNAs empfehlenswert. Insbesondere für 16 ssRNA und 33/36 dsRNA ist dies ratsam, um mit den Werten von NF90 – unbeeinflusst von L-Arginin und Proteinaggregation – vergleichen zu können. Dabei kann außerdem über Mehrfachbestimmung die statistische Signifikanz der Daten belegt werden.

Ein weiterer Ansatzpunkt für die Erforschung von NF110 ist die Komplexbildung mit NF45. Genau wie NF90 kann auch NF110 mit NF45 einen heterodimeren Komplex bilden, dessen biologische Funktion noch zu klären ist (Guan *et al.*, 2008, Schmidt, 2015). Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Stabilität des Komplexes und seine Bindungseigenschaften gelegt werden. Da eine Kristallisation von NF110

bislang schwierig erschien, könnte das Protein durch eine Komplexbildung mit NF45 stabilisiert und so eine Kristallstruktur detektierbar werden.

Außerdem ist anzuraten die begonnenen Studien von Gallrein (2014) zur RNA-Chaperonaktivität von NF110 weiterzuführen: entweder NF110 allein oder als Komplex mit NF45.

Auch die Funktion und Rolle von NF110 bzw. NF110 in Komplex mit NF45 in der Virusreplikation ist noch offen. Dazu müssen die Studien von Isken et al. (2007), in dem die NFAR-Proteine als Wirtsfaktoren für die Replikation von Flaviviren wie Hepatitis C oder dem bovinen Virusdiarrhöe Virus (BVDV) identifiziert wurden, weiter verfolgt werden. Dazu ist eine ausführliche Proteincharakterisierung *in vitro* und *in vivo* nötig, bei der die Interaktion, Kinetik und der Wirkmechanismus der Proteins betrachtet wird. Langfristig ist es so möglich, bei Kenntnis der Funktion von NF110 bzw. NF110/NF45 in der Virusreplikation, einen Ansatzpunkt für die Entwicklung von Therapeutika und Vakzinen zu finden.

7 Literaturverzeichnis

Acker, L., Bergner, K.-G., Diemair, W., Heimann, W., Kiermeier, F., Schormüller, J., Souci, S. W. (2012). Analytik der Lebensmittel Nachweis und Bestimmung von Lebensmittel-Inhaltsstoffen. Springer-Verlag, Berlin.

Alvarez, D.E., Filomatori, C.V., Gamarnik, A.V. (2014). Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs. *Virology*, 375(1), 223–235

Arakawa, T., Ejimab, D., Tsumotoc, K., Obeyamac, N., Tanakac, Y., Kitad, Y., Timasheffe, A. N. (2006). Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects. *Biophysical Chemistry*, 127(1-2), 1-8.

Banerjee und Barraud (2014). Functions of double-stranded RNA-binding domains in nucleocytoplasmic transport. *RNA Biology*, 11(10), 1226-1232.

Bennet, T. P. (1967). Membrane filtration for determining protein in the presence of interfering substances. *Nature*, 213 , 1131-1132.

Bhaskaran, H. und Russell, R. (2007). Kinetic redistribution of native and misfolded RNA by a DEAD-box chaperone. *Nature*, 449, 1014-1018.

Castella, S., Bernard, R., Corno, M., Fradin, A., Lacher, J.-C. (2014). Ilf3 and NF90 functions in RNA biology. *WIREs RNA* 2014. doi: 10.1002/wrna.1270

Chang, K. Y. und Ramos, A. (2005). The double-stranded RNA-binding motif, a versatile macromolecular docking platform. *The FEBS journal*, 272, 2109-2117.

Du, K., Arai, S., Kawamura, T., Matsushita, A., Kurokawa, R. (2011). TLS and PRMT1 synergistically coactivate transcription at the survivin promoter through TLS arginine methylation. *Biochemical and biophysical research communications*, 404(4), 991–996.

Duchange, N., Pidoux J., Camus E., Sauvaget D. (2000). Alternative splicing in the human interleukin enhancer binding factor 3 (ILF3) gene. *Gene*, 261, 345–353.

Gallrein, C. (2014). Reinigung und biophysikalische Charakterisierung von NF110. Abschlussarbeit (M. Sc.), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Golbik, R. (2015). Ligandenbindung. Vorlesungsmaterial, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Guan, D., Altan-Bonnet, N., Parrott, A. M., Arrigo, C. J., Li, Q., Khaleduzzaman, M., Li H., Lee, C., Pe'ery, T., Mathews M. B. (2008). Nuclear factor 45 (NF45) is a regulatory subunit of complexes with NF90/110 involved in mitotic control. *Molecular and cellular biology*, 28, 4629-4641.

Hamada, H., Arakawa T., Shiraki, K. (2009). Effects of Additives on Protein Aggregation. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 400-407.

Herschlag, D. (1995). RNA chaperones and the RNA folding problem. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 20871-20874.

Higuchi, T., Sakamoto, S., Kakinuma, Y., Kai, S., Yagyu, K., Todaka, H., Chi, E. et al. (2012). High expression of nuclear factor 90 (NF90) leads to mitochondrial degradation in skeletal and cardiac muscles. *PLoS One*, 7, e43340.

Hille-Rehfeld, A. (2007). RNA-Chaperone mit Breitbandwirkung. *Chemie in unserer Zeit*, 42(2), 71.

Hoque, M., Shamanna, R. A., Guan, D., Pe'ery, T., & Mathews, M. B. (2011). HIV-1 Replication and Latency Are Regulated by Translational Control of Cyclin T1. *Journal of Molecular Biology*, 410(5), 917–932.

Hu, Q., Lu, Y.Y., Noh, H., Hong, S., Dong, Z., Ding, H.F., Su, S.B., Huang, S. (2013). Interleukin enhancer-binding factor 3 promotes breast tumor progression by regulating sustained urokinase-type plasminogen activator expression. *Oncogene*, 32, 3933–3943.

Isken, O., Baroth, M., Grassmann, C. W., Weinlich, S., Ostareck, D. H., Ostareck-Lederer, A., Behrens, S.-E. (2007). Nuclear factors are involved in hepatitis C virus RNA replication. *RNA*, 13(10), 1675–1692.

Isken, O., Grassmann, C. W., Sarisky, R. T., Kann, M., Zhang, S., Grosse, F., Kao, P.N., Behrens, S.E. (2003). Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus. *EMBO Journal*, 22(21), 5655-5665.

Izumi, T., Fujii, R., Izumi, T., Nakazawa, M., Yagishita, N., Tsuchimochi, K., Yamano, Y. et al. (2009). Activation of synoviolin promoter in rheumatoid synovial cells by a novel transcription complex of interleukin enhancer binding factor 3 and GA binding protein alpha. *Arthritis & Rheumatism*, 60, 63–72.

Jankowsky, E. (2007). Indifferent chaperones. *Nature*, 449, 999-1000.

Khromykh, A.A., Meka, H., Guyatt, K.J., Westaway, E.G. (2001). Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *Journal of Virology*, 75(14), 6719-6728.

Koh, Y. Y., Wang, Y., Qiu, C., Opperman, L., Gross, L., Hall, T. M. T., Wickens, M. (2011). Stacking interactions in PUF-RNA complexes. *RNA*, 17(4), 718-727.

Krasnoselskaya-Riz, I., Spruill, A., Chen, Y.-W., Schuster, D., Teslovich, T., Baker, C., Kumar, A., Stephan, D.A. (2002). Nuclear Factor 90 Mediates Activation of the Cellular Antiviral Expression Cascade. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 18(8), 591-604.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Lange, C. und Rudolph, R. (2009). Suppression of Protein Aggregation by L-Arginine. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(4), 408-414.

Lefèvre, S. (2010). Migrationspotential synovialer Fibroblasten bei der rheumatoiden Arthritis. Dissertation, Justus -Liebig-Universität Gießen.

Marcoulatos, P., Avgerinos, E., Tsantzas, D. V., Vamvakopoulos, N. C. (2000). Mapping interleukin enhancer binding factor 3 gene (ILF3) to human chromosome 19 (19q11-qter and 19p11-p13.1) by polymerase chain reaction amplification of human-rodent somatic cell hybrid DNA templates. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 18, 351-355.

Maris, C., Dominguez, C., Allain, F. H.-T. (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS Journal*, 272, 2118-2131.

Meaghera M. J., Schumacher J. M., Lee K., Holdcraft R. W., Edelhoff S., Disteche C., Brauna R. E. (1999). Identification of ZFR, an ancient and highly conserved murine chromosome-associated zinc finger protein. *Gene*, 288, 197-211.

Nakamura, N., Yamauchi, T., Hiramoto, M., Yuri, M., Naito, M., Takeuchi, M., Yamanaka, K. et al. (2012). Interleukin enhancer-binding factor 3/NF110 is a target of YM155, a suppressant of survivin. *Molecular & Cell Proteomics*, 11(7), M111.013243.

Ohno, M., Komakine, J., Suzuki, E., Nishizuka, M., Osada, S., Imagawa, M. (2011). Interleukin enhancer-binding factor 3 functions as a liver receptor homologue-1 co-activator in synergy with the nuclear receptor co-activators PRMT1 and PGC-1 α . *The Biochemical Journal*, 437(3), 531-540.

Patino, C., Haenni, A.-L., Urcuqui-Inchima, S. (2014). NF90 isoforms, a new family of cellular proteins involved in viral replication?. *Biochimie*, 108, 20-24.

Parrott, A.M., Walsh, M.R., Reichman, T.W., Mathews, M.B. (2005). RNA binding and phosphorylation determine the intracellular distribution of nuclear factors 90 and 110. *Journal of molecular biology*, 348(2), 281-293.

Reichman, T.W. und Mathews, M.B. (2003). RNA binding and intramolecular interactions modulate the regulation of gene expression by nuclear factor 110. *RNA*, 9(5), 543-554.

Reichman, T. W., Parrott, A.M., Fierro-Monti, I., Caron, D.J., Kao, P.N., Lee, C.G., Li, H., Mathews, M.B. (2003). Selective Regulation of Gene Expression by Nuclear Factor 110, a Member of the NF90 Family of Double-stranded RNA-binding Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 332, 85-98.

Rajkowitsch, L. und Schroeder, R. (2007). Dissecting RNA chaperone activity. *RNA*, 13, 2053-2060,

Sakamoto, S., Aoki, K., Higuchi, T., Todaka, H., Morisawa, K., Tamaki, N., Hatano, E. et al. (2009). The NF90-NF45 complex functions as a negative regulator in the microRNA processing pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 29, 3754–3769

Saunders, L. R., Jurecic, V., Barber, G. N. (2001). The 90- and 110-kDa Human NFAR Proteins Are Translated from Two Differentially Spliced mRNAs Encoded on Chromosome 19p13. *Genomics*, 71, 256-259.

Schmidt, T. (2015). Charakterisierung des RNA-bindenden Proteinkomplexes NF90-NF45: Identifizierung einer RNA-Chaperon-Aktivität. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Seetharaman, J., Neely, H., Wang, D., Janjua, H., Cunningham, K., Owens, L., Xiao, R. et al. (2010). Crystal structure of DRBM 2 domain of Interleukin enhancer-binding factor 3 from Homo sapiens, Northeast Structural Genomics Consortium Target HR4527E. Unveröffentlichte Daten, PDB-Eintrag 3P1X.

Shi, L., Zhao, G., Qiu, D., Godfrey, W.R., Vogel, H., Rando, T.A., Hu, H., Kao, P.N. (2005). NF90 regulates cell cycle exit and terminal myogenic differentiation by direct binding to the 3'-untranslated region of MyoD and p21WAF1/CIP1 mRNAs. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 18981–18989.

Shiina, N. und Nakayama, K. (2014). RNA Granule Assembly and Disassembly Modulated by Nuclear Factor Associated with Double-stranded RNA 2 and Nuclear Factor 45. *Journal of Biological Chemistry*, 289(30), 21163-21180.

Shim, J., Lim, H., Yates, J.R. III, Karin, M. (2002). Nuclear export of NF90 is required for interleukin-2 mRNA stabilization. *Molecular Cell* 2002, 10(6), 1331–1344.

Tang, J., Kao, P. N., Herschman, H. R. (2000). Protein-arginine methyltransferase I, the predominant protein-arginine methyltransferase in cells, interacts with and is regulated by interleukin enhancer-binding factor 3. *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 19866-19876.

Taucher, C. (2009). Recombination and packaging of flavivirus. Dissertation, Universität Wien.

Thandapani, P., O'Connor T.R., Bailey, T.L., Richard, S. (2013). Defining the RGG/RG Motif. *Molecular cell*, 50(5), 613-23.

Thurner, C., Witwer, C., Hofacker, I.L., Stadler, P.F. (2004). Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *Journal of general Virology*, 85, 1113-1124.

Tompa, P. und Csermely, P. (2004). The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB journal*, 18, 1169-1175.

Wada, K., Inoue, K., Hagiwara, M. (2001). Identification of methylated proteins by protein arginine N-methyltransferase 1, PRMT1, with a new expression cloning strategy. *Biochimica et biophysica acta*, 1591 (1-3), 1-10.

Wen, X., Huang, X., Mok, B.W., Chen, Y., Zheng, M., Lau, S.Y., Wang, P. et al. (2014). NF90 exerts antiviral activity through regulation of PKR phosphorylation and stress granules in infected cells. *Journal of immunology*, 192(8), 3753-3764.

Wolkowicz, U. M. und Cook, A. G. (2012). NF45 dimerizes with NF90, Zfr and SPNR via a conserved domain that has a nucleotidyltransferase fold. *Nucleic Acids Research*, 40, 9356-9368.

Xu Y.H. und Grabowski G.A. (1999). Molecular cloning and characterization of a translational inhibitory protein that binds to coding sequences of human acid beta-glucosidase and other mRNAs. *Molecular Genetics and Metabolism*, 68, 441–454.

Zhang, B., Dong, H., Stein, D.A., Iversen, P.L., Shi, P.Y. (2008). West Nile virus genome cyclization and RNA replication require two pairs of long-distance RNA interactions. *Virology*, 373(1), 1-13.

Zhao, G., Shi, L., Qiu, D., Hu, H., Kao, P. N. (2005). NF45/ILF2 tissue expression, promoter analysis, and interleukin-2 transactivating function. *Experimental cell research*, 305(2), 312-323.

Zhu, P., Jiang, W., Cao, L., Yu, W., Pei, Y., Yang, X., Wan, B., Liu, J.O., Yi, Q., Yu, L. (2010). IL-2 mRNA stabilization upon PMA stimulation is dependent on NF90-Ser647 phosphorylation by protein kinase C β I. *Journal of immunology*, 185(9), 5140-5149.