

Untersuchungen zur Funktion zellulärer RNA-Bindeproteine in der RNA-Replikation des West-Nil-Virus

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Susann Friedrich

geb. am 21. April 1981 in Dessau

Öffentlich verteidigt am 17.01.2014

Gutachter:

Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

Prof. Dr. Gary Sawers

Prof. Dr. Norbert Tautz

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG 1

1.1. Phylogenetische Einordnung des West-Nil-Virus 1

1.2. Flaviviraler Lebenszyklus 3

1.3. Flavivirale Genomorganisation und Replikation 5

 1.3.1. Der flavivirale ORF 5

 1.3.2. Die flavivirale 3'UTR..... 6

 1.3.3. Die flavivirale 5'UTR..... 8

 1.3.4. Flavivirale RNA-Replikons..... 8

1.4. Die Rolle zellulärer Proteine im Replikationsprozess von *Flaviviridae*..... 9

1.5. Zielstellung 11

II. MATERIAL UND METHODEN 12

2.1. Chemikalien, Puffer und Verbrauchsmaterialien 12

2.2. Bakterienstämme und Plasmide 12

2.3. Kultivierungsbedingungen für prokaryontische Zellen 14

 2.3.1. Nährmedium und Zusätze 14

 2.3.2. Anzucht und Zellernte 15

 2.3.3. Stammhaltung 15

2.4. Kultivierung, Transfektion und Infektion humaner Zellen 15

 2.4.1. Kultivierung von Huh7-Zellen 15

 2.4.2. Transfektion von Plasmid-DNA..... 16

 2.4.3. Transfektion von RNA..... 16

 2.4.3.1. Elektroporation von viraler RNA 16

 2.4.3.2. Transfektion von siRNA mit Lipofectamine™ RNAiMAX Transfektions-Reagenz 17

 2.4.4. Infektionsexperimente mit West-Nil-Virus 17

2.5. Molekulargenetische Arbeiten mit RNA..... 17

 2.5.1. RNA-Isolation mit TRIZOL 18

 2.5.2. *in vitro* Transkription von nicht-markierter RNA..... 18

 2.5.3. Herstellung von radioaktiv-markierter RNA..... 19

 2.5.4. Konzentrationsbestimmung von RNA 19

 2.5.5. Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese..... 19

 2.5.6. Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese 20

 2.5.7. RNA-Größenstandard 20

 2.5.8. Reverse Transkription..... 21

2.6. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA 21

 2.6.1. Isolation von DNA..... 21

 2.6.1.1. Mikroplasmidpräparation 21

 2.6.1.2. Miniplasmidisolation 22

 2.6.1.3. Plasmidisolation mittels kommerziellem Kit 22

 2.6.2. Agarose-Gelelektrophorese 22

 2.6.2.1. DNA-Größenstandard 23

 2.6.3. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen 23

 2.6.4. Reinigung und Konzentrierung von DNA..... 23

 2.6.5. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..... 24

 2.6.6. Konzentrationsbestimmung von DNA..... 24

 2.6.7. Ligation von DNA-Fragmenten 24

2.6.8. Phosphorylierung/Dephosphorylierung von DNA.....	24
2.6.9. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	25
2.6.9.1. Auswahl der Primer	25
2.6.9.2. Standard-PCR.....	25
2.6.9.3. <i>site-directed mutagenesis</i> -PCR.....	26
2.6.9.4. <i>real-time</i> -PCR.....	26
2.6.10. Transformation nach der CaCl ₂ -Methode	27
2.6.11. DNA-Sequenzierung	28
2.7. Proteinbiochemische Methoden.....	28
2.7.1. Rekombinante Expression und Reinigung von SUMO-Fusionsproteinen	28
2.7.1.1. Rekombinante Herstellung von NS5 des West-Nil-Virus.....	29
2.7.1.2. Rekombinante Herstellung von AUF1 Isoform p45.....	30
2.7.1.3. Rekombinante Herstellung von PRMT1	31
2.7.1.4. Rekombinante Herstellung von methyliertem AUF1 Isoform p45 (AUF1p45 ^{aDMA})	32
2.7.1.5. Rekombinante Herstellung einer pseudophosphorylierten Variante von AUF1p45 ...	32
2.7.2. Reinigung von RNA-Bindeproteinen aus HeLa-Zellen	32
2.7.3. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	34
2.7.4. Konzentrierung von Proteinen	34
2.7.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	34
2.7.6. Färbung mit Coomassie	35
2.7.7. Silberfärbung	35
2.7.8. Analytische Ultrazentrifugation.....	35
2.7.9. Präparation von Gesamtzellextrakt.....	36
2.7.10. Präparation von cytoplasmatischen Zellextrakt.....	36
2.7.11. Western Blot.....	36
2.7.12. Immunfluoreszenz.....	37
2.7.13. Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen NS5	38
2.7.14. FLAG-Immunpräzipitation	39
2.7.15. Massenspektrometrie	39
2.8. Enzymologische Methoden	40
2.8.1. <i>in vitro</i> RNA-abhängiger RNA-Polymerase-Assay (RdRp-Assay).....	40
2.8.1.1. RNase-Spaltung des RdRp-Produkts.....	41
2.8.2. Radioaktive <i>in vitro</i> Methylierung von Protein	41
2.8.3. Messung von Renilla-Luziferase Aktivität.....	41
2.9. Filter-Bindungs-Assay zur Bestimmung von RNA-Protein-Interaktionen.....	42
2.10. Fluorimetrischer RNA-RNA-Interaktions-Assay.....	43
2.11. <i>bandshift</i> -Assay	43
2.12. Circular dichroismus	44
III. ERGEBNISSE	45
3.1. Etablierung eines <i>in vitro</i> WNV RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Assays	45
3.1.1. Reinigung des Nichtstrukturproteins NS5 rekombinant aus <i>E. coli</i>	45
3.1.2. NS5 katalysiert die <i>de novo</i> Synthese von (-)-Strang RNA auf einem subgenomischen RNA-Template.....	45
3.1.3. Bedeutung der Zyklisierungssequenzen in den 5'- und 3'UTRs der West-Nil-Virus-RNA für die <i>in vitro</i> (-)-Strang-RNA-Synthese durch NS5.....	48
3.2. Etablierung eines West-Nil-Virus-Replikon-Systems in Huh7-Zellen	50
3.2.1. Die Fusion eines Ribozym-Elements an das 3'-Ende der WNV-Replikon-RNA verbessert die Replikationsrate	51
3.2.2. Bedeutung der Zyklisierungssequenzen in den 5'- und 3'UTRs der West-Nil-Virus-RNA für die RNA-Replikation des WNV-Replikons in transfizierten Zellen.....	53

3.3. Reinigung putativer Wirtsfaktoren des WNV aus HeLa-Zellen	54
3.4. Die RNAi-vermittelte Depletion von AUF1 in Huh7-Zellen hat einen negativen Einfluss auf die RNA-Replikation des WNV-Replikons.....	58
3.5. Die RNAi-vermittelte Depletion von AUF1 in Huh7-Zellen verzögert die Vermehrung des West-Nil-Virus	60
3.6. FLAG-AUF1 Isoform p45 stimuliert die virale (-)-Strang-RNA-Synthese.....	61
3.7. Rekombinantes AUF1p45 stimuliert die virale (-)-Strang-RNA-Synthese	62
3.8. AUF1p45 bindet mit hoher Affinität an die AU-reiche Region der 3'UTR der WNV-RNA	65
3.9. Einfluss der AU-reichen Region der 3'UTR auf die Replikation von WNV	67
3.9.1. Die AU-reiche Region der 3'UTR ist essentiell für die RNA-Replikation des WNV-Replikons	67
3.9.2. Die AU-reiche Region ist nicht essentiell für die AUF1p45-vermittelte Stimulierung der <i>in vitro</i> (-)-Strang RNA-Synthese durch NS5.....	68
3.10. Identifizierung von PRMT1 und hnRNPH1 als AUF1-assoziierte Proteine	69
3.11. Immunpräzipitiertes FLAG-AUF1p45 aus Huh7-Zellen ist methyliert	71
3.12. PRMT1 methyliert AUF1p45 <i>in vitro</i>	73
3.12.1. Reinigung der PRMT1 Isoformen v1, v2, v3 und v5 rekombinant aus <i>E. coli</i>	73
3.12.2. Die PRMT1-Isoformen v1, v2, v3 und v5 methylieren AUF1p45 <i>in vitro</i>	74
3.12.3. Reinigung von rekombinatem, methyliertem AUF1p45 aus <i>E. coli</i>	76
3.13. Reinigung einer pseudophosphorylierten Variante von AUF1p45 rekombinant aus <i>E. coli</i>	78
3.14. Posttranslationale Modifikationen beeinflussen die RNA-Bindung von AUF1p45	79
3.15. Methyliertes AUF1p45 stimuliert die RNA-Synthese effizienter im Vergleich zu nicht-methyliertem AUF1p45	80
3.16. AUF1p45 unterstützt die Interaktion der 5'-3'-UAR-Zyklisierungssequenzen in einem Fluoreszenz-basierten RNA- <i>annealing</i> -Assay	82
3.16.1. Die 5'-3'-UAR-Interaktion wird durch die methylierte Variante von AUF1p45 im Vergleich zu nicht-methyliertem AUF1p45 effizienter beschleunigt	85
3.17. AUF1p45 verstärkt die Interaktion der WNV 5'UTR mit der 3'Cyc-RNA in einem RNA- <i>bandshift</i> -Assay	87
3.17.1. Die methylierte Variante von AUF1p45 verstärkt die 5'-3'-Interaktion der WNV-RNA effizienter im Vergleich zur nicht-methylierten Variante	88
3.18. AUF1p45 weist einen hohen Anteil an ungeordneten Proteinstrukturen auf.....	90
3.19. Die Depletion von AUF1 in Huh7-Zellen beeinträchtigt die Translation und RNA-Replikation eines Dengue-Virus-RNA-Replikons	91
IV. DISKUSSION	93
4.1. Posttranskriptionelle Kontrolle der Genexpression durch AUF1	93
4.2. AUF1 wurde als neuer Wirtsfaktor des West-Nil-Virus identifiziert	94
4.3. Isoform-spezifische Funktionen von AUF1.....	95
4.4. Die Funktion von AUF1 wird durch posttranslationale Modifikationen reguliert.....	97
4.5. Die Zyklisierung des viralen RNA-Genoms ist essentiell für die Vermehrung von Flaviviren	99
4.5.1. Die Funktion des <i>stem-loop A</i> in der flaviviralen Replikation	102
4.6. AUF1 verstärkt die flavivirale 5'-3'-RNA-Interaktion	103
4.7. Die RNA- <i>Chaperone</i> -Aktivität von AUF1 destabilisiert den 3'SL	107
4.8. Die Bedeutung der AU-reichen Region für <i>mosquito-borne</i> -Flaviviren	112
4.9. Ausblick.....	114
V. ZUSAMMENFASSUNG	115
VI. LITERATURVERZEICHNIS.....	117
VII. ANHANG	129

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SI-Einheiten, Chemikalien und Enzymbezeichnungen bzw. Abkürzungen, die im Wörterbuch aufgelistet sind, sind nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

A	Adenin
<i>ad</i>	lat. „zu“
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AUF1	<i>AU-rich element binding protein 1</i>
AUG	Translationsstartcodon
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
BVDV	bovines Virusdiarrhoe-Virus
C	Cytosin
C	<i>core</i> -Protein
CD	Circulardichroismus
CS	engl. <i>conserved sequence</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
cp	engl. <i>crossing point</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTP	Cytidintriphosphat
DAR	engl. <i>downstream of AUG region</i>
DENV	Dengue-Virus
DMEM	Dulbeccos <i>Modified Eagle</i> -Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
E	<i>envelope</i> -Protein
<i>E. coli</i>	lat. <i>Escherichia coli</i>
EMCV	Enzephalomyokarditis-Virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDV	Hepatitis-D-Virus
HeLa	Henrietta Lacks
HIV	humane Immundefizienz-Virus
hnRNP	engl. <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
Huh7	engl. <i>human hepatoma</i>
IgG	Immunglobulin G
IP	Immünpräzipitation
IRES	engl. <i>internal ribosome entry site</i>
Kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
Mut	Mutante
NFAR	engl. <i>nucleic factors associated with dsRNA</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure

NS	Nichtstrukturprotein
Nt	Nukleotid
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ORF	engl. <i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
p.i.	<i>post infection</i>
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptions-PCR
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
Rluc	Renilla Luziferase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	engl. <i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
sgRNA	subgenomische RNA
siRNA	engl. <i>short interfering RNA</i>
SL	engl. <i>stem-loop</i>
SLA	engl. <i>stem-loop A</i>
SLB	engl. <i>stem-loop B</i>
ss	einzelsträngig
SUMO	engl. <i>small ubiquitin-like modifier</i>
T	Thymin
U	Uracil
U	engl. <i>Unit</i>
UAR	engl. <i>upstream of AUG region</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
WNV	West-Nil-Virus
WT	Wildtyp
w/w	Masse pro Volumen

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

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

I. EINLEITUNG

Das West-Nil-Virus wurde erstmalig 1937 in der West-Nil-Provinz Ugandas aus dem Blut einer Patientin isoliert (Smithburn et al. 1946). Das Virus ist endemisch in Afrika, Südwestasien, Australien und in wärmeren Teilen Europas (Kramer et al. 2007). Vor allem in Griechenland sind in den letzten Jahren vermehrt epidemische Ausbrüche dokumentiert worden. 2010 forderte die vom West-Nil-Virus verursachte Enzephalitis 197 Erkrankungen und 33 Todesopfer (Danis et al. 2011a; Danis et al. 2011b). Im Jahr 1999 wurde das Virus zum ersten Mal an der Ostküste Nordamerikas nachgewiesen (Lanciotti et al. 1999). In nur vier Jahren verbreitete es sich bis zur Westküste, begleitet von regionalen Epidemien in den Jahren 2002 und 2003 (Kilpatrick 2012). Im Jahr 2012 wurde die stärkste West-Nil-Virus-Epidemie in den USA seit 2003 mit über 5600 Erkrankungen und über 280 Todesfällen gemeldet (Arnold 2012; Petersen und Fischer 2012; *Center for disease control and prevention, CDC, 2012*).

Das Virus wird durch eine Vielzahl verschiedener Stechmückenarten, vor allem der Gattungen *Culix* und *Aedes* zwischen den Wirten übertragen (Kilpatrick 2012). Die höchsten viralen Titer werden in Vögeln erreicht, die folglich der Hauptwirt für die Vermehrung des West-Nil-Virus sind. Weitere Wirte sind Menschen und Pferde, die aber aufgrund der geringen Virämie keine Rolle im Vermehrungszyklus einnehmen (Brinton 2002).

Die meisten Infektionen mit West-Nil-Virus verlaufen asymptomatisch, während in 20-40 % der Fälle die Patienten grippeähnliche Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen, Übelkeit und Müdigkeit (West-Nil-Fieber) aufweisen. Neuroinvasive Krankheiten (Beteiligung des Zentralnervensystems) wie Meningitis, Enzephalitis und akute schlaffe Lähmung treten in weniger als 1 % der Fälle auf, wobei ältere Menschen und Menschen mit einem geschwächten Immunsystem ein höheres Risiko aufweisen eine schwerwiegende Form der Krankheit zu entwickeln (Brinton 2002; Kramer et al. 2007).

Obwohl es bis heute noch keine effektiven humanen Impfungen gegen das West-Nil-Virus gibt, sind derzeit drei lizenzierte Vakzine zur Immunisierung von Pferden erhältlich. Einige dieser Impfstoffe werden zurzeit in klinischen Studien der Phase I und II zur Anwendung beim Menschen verifiziert (De Filette et al. 2012; Petersen und Fischer 2012).

1.1. Phylogenetische Einordnung des West-Nil-Virus

Das West-Nil-Virus gehört zur Familie der *Flaviviridae*, welche der Gruppe der (+)-Strang-RNA-Viren zugeordnet ist. Die Typspezies der *Flaviviridae* ist das Gelbfiebervirus, welches das erste identifizierte humanpathogene Virus (Reed und Agramonte 1983) und Namensgeber der Familie ist (lateinisch *flavus*, „gelb“). Die Familie der *Flaviviridae* wird

weiterhin in drei Gattungen unterteilt: *Pestivirus*, *Hepacivirus* und *Flavivirus* (Abb. 1). Zu den Pestiviren gehören überwiegend tierpathogene Vertreter mit ökonomischer Bedeutung für die Viehwirtschaft. Dazu zählen das bovine Virusdiarrhoe-Virus (BVDV), das Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) und das *Border-disease*-Virus (BDV). Die Typspezies der Gattung *Hepacivirus* ist das Hepatitis-C-Virus, dem Verursacher der Infektionskrankheit Hepatitis C mit weltweit etwa 150 Millionen chronisch Erkrankten und mehr als 350000 Todesfällen jährlich (WHO, 2012). Die Gattung *Flavivirus* ist mit über 70 Viren die größte Gattung und umfasst hauptsächlich humanpathogene Vertreter, die verschiedene Krankheiten wie Fieber, Enzephalitis oder hämorrhagisches Fieber verursachen (Lindenbach et al. 2007). Dazu gehören Erreger mit weltweiter Verbreitung wie z.B. das Dengue-Virus (DENV), das Japanische Enzephalitis-Virus (JEV), das West-Nil-Virus (WNV) und

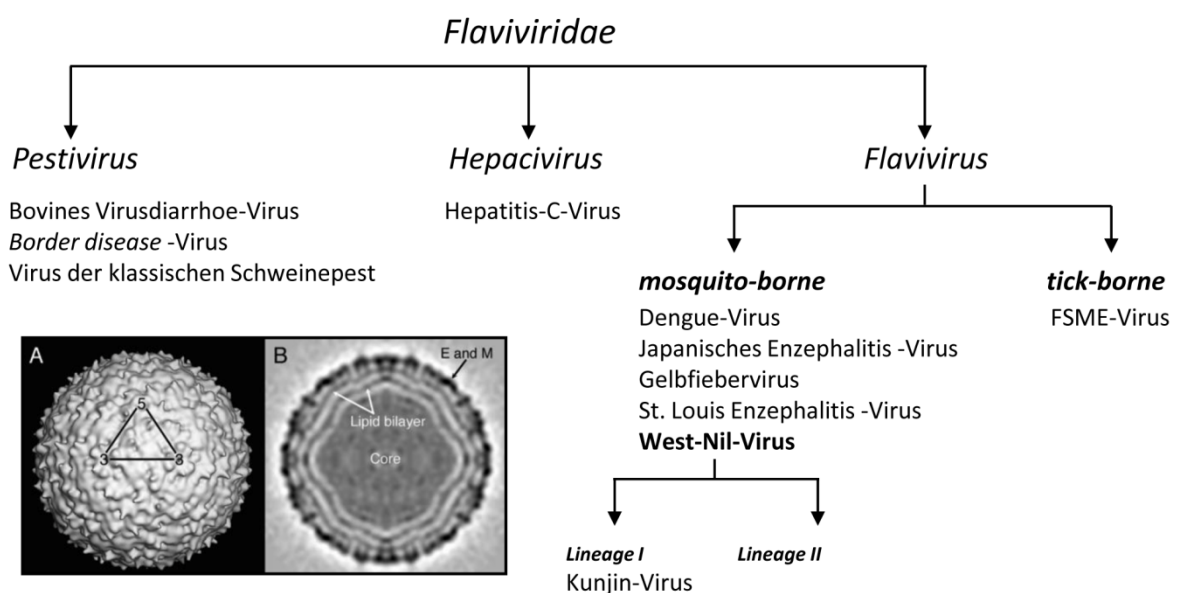


Abb. 1. Die Virusfamilie der *Flaviviridae*. Die Familie *Flaviviridae* wird in drei Gattungen unterteilt: *Pestivirus*, *Hepacivirus* und *Flavivirus*. Die Gattung *Flavivirus* wird weiterhin in die Kategorie der von Stechmücken übertragenen Viren (*mosquito-borne*) sowie in die Kategorie der von Zecken übertragenen Viren (*tick-borne*) unterteilt (nähere Erläuterung siehe Text). Des Weiteren ist die 17 Å-Struktur eines West-Nil-Virions gezeigt, die mit Kryo-Elektronenmikroskopie bestimmt wurde (Mukhopadhyay et al. 2003). **(A)** Darstellung der Oberfläche des Virus mit einer asymmetrischen Einheit des Ikosaeders. Die 5-fach und 3-fach ikosaedrischen Symmetrieachsen sind markiert. **(B)** Querschnitt des Virus mit den konzentrischen Schichten unterschiedlicher Dichte. *lipid bilayer* = Lipiddoppelschicht, E = *envelope*, M = *membrane*, FSME = Frühsommer-Meningoenzephalitis.

das Gelbfiebervirus (YEV) sowie regional auftretende Erreger wie z.B. das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME-Virus) und das St. Louis Enzephalitis-Virus (SLEV) (Abb. 1). Flaviviren werden weiterhin in die Kategorie der von Stechmücken übertragenen Viren (*mosquito-borne*) sowie in die Kategorie der von Zecken übertragenen Viren (*tick-borne*) unterteilt. Das West-Nil-Virus wird anhand von Sequenzvergleichen des *Envelope*-Proteins in zwei Abstammungslinien unterteilt. WNV-Isolate, die mit humanen Krankheiten in

Verbindung gebracht wurden, sind der Abstammungslinie 1 zuzuordnen (Lanciotti et al. 2002). Das Kunjin-Virus ist ein abgeschwächter Subtyp des West-Nil-Virus und ist in Asien und Australien endemisch (Heinz et al. 2000).

1.2. Flaviviraler Lebenszyklus

Das RNA-Genom von Flaviviren ist von einem Kapsid mit ikosaedrischer Symmetrie umgeben (Abb. 1). Das Kapsid besteht aus einer Lipid-*bilayer*-Membran in der zwei Glykoproteine (prM und E) mit ihren je zwei Transmembran-Helices eingelagert sind. Das prM (*pre-membrane*)-Protein fungiert vermutlich als Faltungshelfer des E (*envelope*)-Proteins, welches für die Rezeptorbindung und die Membranfusion verantwortlich ist. Das *core*-Protein ist bei der Verpackung des viralen Genoms beteiligt, wodurch das Nukleokapsid gebildet wird (Mukhopadhyay et al. 2003; Mukhopadhyay et al. 2005).

Flaviviren adsorbieren an die Oberfläche der Wirtszelle und gelangen in die Zelle durch Rezeptor-vermittelte Endozytose (Abb. 2). Bislang konnte gezeigt werden, dass das $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin ein funktioneller Rezeptor für die Infektion mit WNV ist (Chu und Ng 2004; Lee et al. 2006). Der niedrige pH-Wert in den endosomalen Vesikeln führt zu einer Konformationsänderung des Virions, wodurch das Nukleokapsid in das Cytoplasma der Wirtszelle freigesetzt wird (Allison et al. 1995). Die genomische RNA und das *core*-Protein dissoziieren voneinander und die Translation des Polyproteins wird an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) durch die zelluläre Translationsmaschinerie initiiert. Das Polyprotein wird co- und posttranslational durch zelluläre und virale Proteasen prozessiert. Dabei entstehen die zuvor erwähnten Strukturproteine *core*, prM und E sowie die Nichtstrukturproteine NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B und NS5 (Lindenbach et al. 2007). Wie auch andere (+)-Strang RNA-Viren, manipulieren Flaviviren die Membranen der Wirtszelle, um die Ausbildung des viralen Replikationskomplexes zu unterstützen (Miller und Krijnse-Locker 2008; den Boon und Ahlquist 2010; den Boon et al. 2010; Hsu et al. 2010). Wegweisende Arbeiten mit dem Kunjin-Virus haben gezeigt, dass die Infektion mit Flaviviren spezielle Membranstrukturen (*vesicle packets*) induziert, die Nichtstrukturproteine sowie virale RNA enthalten (Westaway et al. 1997; Mackenzie et al. 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese *vesicle packets* Einstülpungen der ER-Membran sind (Welsch et al. 2009), bei deren Induktion das Nichtstrukturprotein NS4A eine wichtige Rolle spielt (Roosendaal et al. 2006; Miller et al. 2007). In diesen Einstülpungen amplifiziert der Replikationskomplex, ausgehend von der (+)-Strang-RNA, komplementäre (-)-Strang-RNA-Moleküle, die wiederum als Template für die Synthese neuer genomischer (+)-Strang-RNA dienen. Obwohl die flavivirale Replikation im Cytoplasma stattfindet, kann ein signifikanter Anteil viraler Proteine wie NS5 und *core* im Zellkern infizierter Zellen nachgewiesen werden

(Buckley et al. 1992; Bulich und Aaskov 1992; Kapoor et al. 1995; Forwood et al. 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Zellkerne Flavivirus-infizierter Zellen aktive Replikationskomplexe enthalten (Uchil et al. 2006). Die Bedeutung der flaviviralen Replikation im Zellkern zusätzlich zur membrangebundenen Replikation im Cytoplasma ist jedoch noch unklar.

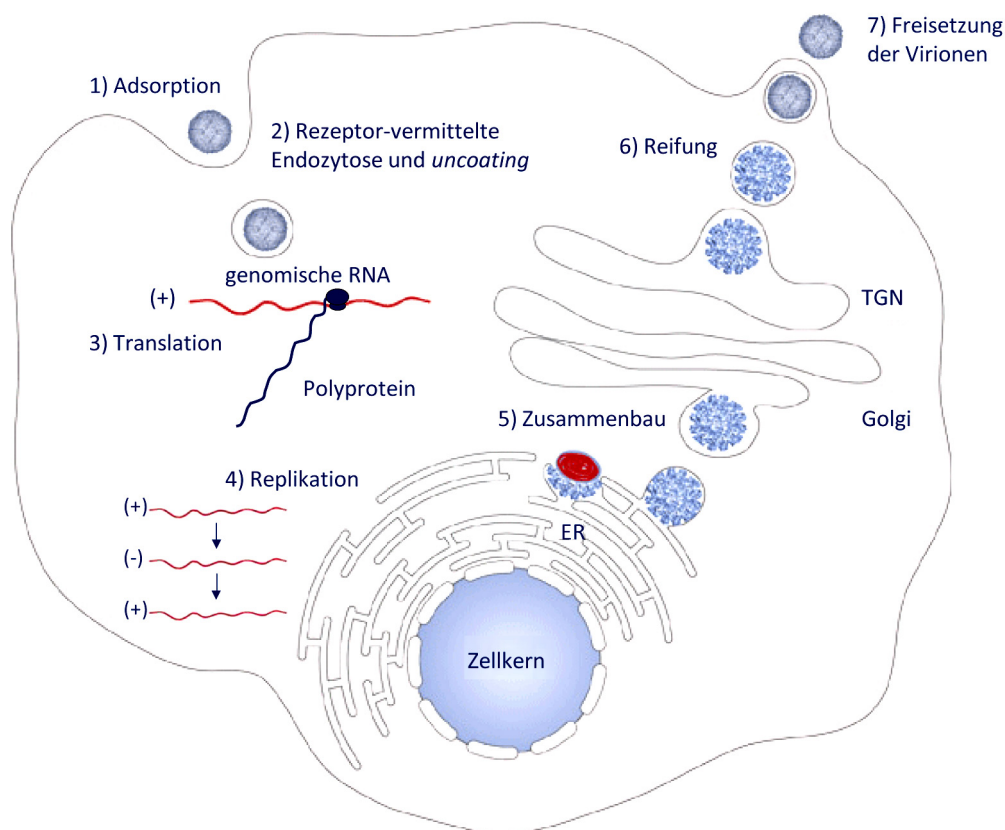


Abb. 2. Lebenszyklus der Flaviviridae. 1) Anheftung des Virions an Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle. 2) Rezeptor-vermittelte Endozytose und Freisetzung der genomischen RNA in das Cytoplasma der Zelle. 3) Translation der genomischen RNA und Prozessierung des Polyproteins durch zelluläre und virale Proteasen. 4) Assemblierung des Replikationskomplexes an virus-induzierten Membranen. Der Replikationskomplex transkribiert die (+)-RNA in (-)-RNA, welche wiederum als Matrize für die Synthese neuer (+)-RNA-Moleküle dient. 5) Assemblierung neuer Viruspartikel im Endoplasmatischen Retikulum. 6) Vesikulärer Transport und Reifung der Viruspartikel. 7) Freisetzung der Virionen in den extrazellulären Raum durch Exocytose (modifiziert nach Mukhopadhyay et al. 2005).

Die Bildung neuer Viruspartikel findet im Lumen des ER statt, wobei zuerst unreife Partikel entstehen. Nachfolgend findet eine Spaltung des prM-Proteins im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) statt, so dass reife, infektiöse Viruspartikel gebildet werden (Stadler et al. 1997; Elshuber et al. 2003). Reife Viruspartikel werden über Exozytose aus der Zelle entlassen (Abb. 2).

1.3. Flavivirale Genomorganisation und Replikation

Das Flavivirus-Genom ist eine ca. 11 Kilobasen (kb) lange einzelsträngige RNA, die für einen offenen Leserahmen (ORF) kodiert, welcher von nicht-translatierten Regionen, der 5'UTR und 3'UTR, flankiert ist (Abb. 3). Das flavivirale Genom übernimmt drei Funktionen im Lebenszyklus. Es dient als *messenger* RNA (mRNA) für die Translation der viralen Proteine, als Template während der RNA-Replikation und es wird als genetisches Material in neue Viruspartikel verpackt (Lindenbach et al. 2007). Das 5'-Ende der viralen RNA besitzt eine Typl cap-Struktur ($m^7GpppAmp$); am 3'-Ende befindet sich, im Gegensatz zu zellulären mRNAs, kein PolyA-Schwanz (Wengler und Gross 1978). Der flavivirale ORF kodiert für ein ca. 3400 Aminosäure langes Polyprotein, welches co- und posttranslational in Strukturproteine sowie Nichtstrukturproteine prozessiert wird. Konservierte Sekundärstrukturelemente in der 5'UTR und 3'UTR sind an der Initiation und Regulation der Translation und Replikation der viralen RNA essentiell beteiligt (Lindenbach et al. 2007).

1.3.1. Der flavivirale ORF

Die Translation des flaviviralen ORFs resultiert in der Synthese der Strukturproteine *core*, prM und E sowie der Nichtstrukturproteine NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B und NS5 (Abb. 3). Die Strukturproteine sind für die Bildung neuer Viruspartikel notwendig. Die Nichtstrukturproteine sind am Zusammenbau neuer Viruspartikel sowie an der viralen Replikation beteiligt (Lindenbach et al. 2007). Bei den Nichtstrukturproteinen NS1, NS2A, NS4A und NS4B sind die genauen Funktion während dieser Prozesse jedoch noch nicht bekannt. NS2B fungiert als Co-Faktor für die NS2B-NS3 Serinprotease, welche an der Prozessierung des Polyproteins beteiligt ist (Falgout et al. 1991). Das flavivirale NS3 ist ein multifunktionales Protein mit drei enzymatischen Aktivitäten. Dazu gehören die bereits erwähnte Protease-Aktivität, eine Helikase-Aktivität sowie eine RNA-Triphosphatase-Aktivität (Chambers et al. 1990; Wengler 1991; Warrenner et al. 1993). Die Helikase-Aktivität ist höchstwahrscheinlich an der Umstrukturierung von Sekundärstrukturen des viralen RNA-Genoms sowie an der Entwindung des RNA-Doppelstrang-Intermediates während der RNA-Replikation involviert. Die RNA-Triphosphatase-Aktivität dient der Dephosphorylierung des 5'-Endes der viralen RNA im Zuge der cap-Formation.

Das Nichtstrukturprotein NS5 ist hoch konserviert und enthält im N-terminalen Bereich eine Methyltransferase- (Koonin 1993) sowie eine Guanyltransferase-Aktivität (Issur et al. 2009) und im C-terminalen Bereich eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp)-Aktivität (Grun und Brinton 1986). Die Methyltransferase- und die Guanyltransferase-Aktivitäten sind bei der Ausbildung und Modifizierung der cap-Struktur am 5'-Ende der viralen RNA beteiligt. Die

RdRp-Aktivität von NS5 katalysiert ausgehend von der genomischen RNA die Synthese des (-)-Strang-RNA-Intermediates. Die (-)-Strang-RNA dient wiederum als Template für NS5 zur Synthese neuer (+)-Strang-RNA-Moleküle. Die Replikation der flaviviralen RNA durch NS5 in membrangebundenen Replikationskomplexen wird in Zusammenarbeit mit der Helikase NS3 sowie den anderen Nichtstrukturproteinen realisiert. Zusätzlich sind am Replikations-Prozess vermutlich zelluläre Wirtsproteine beteiligt (Lindenbach et al. 2007).

1.3.2. Die flavivirale 3'UTR

Die flavivirale 3'UTR hat eine Länge von ca. 400 - 700 Nukleotiden (Nt) und unterscheidet sich stark zwischen Vertretern der *tick-borne*- und der *mosquito-borne*-Flaviviren (Proutski et al. 1997). Die 3'UTR der *mosquito-borne*-Flaviviren besitzt an ihrem 5'Ende eine AU-reiche Region, die in ihrer Länge variiert und für die Replikation des Kunjin-Virus entbehrlich ist (Pijlman et al. 2008). *Downstream* der AU-reichen Region befindet sich der konservierte *stem-loop* SL-II, der für die Bildung der sfRNA (*small flaviviral RNA*) notwendig ist. Diese ca. 0.5 kb lange nichtkodierende sfRNA ist einzigartig für die Gattung *Flavivirus* und ist essentiell für die Cytopathogenität und Pathogenität flaviviraler Infektionen (Pijlman et al. 2008). Weitere konservierte Sekundärstrukturen in der 3'UTR sind die fast identischen *dumbbell*- (Hantel)-Strukturen, die als DB1 und DB2 bezeichnet werden. Diese Strukturen entstehen durch Duplizierung der konservierten Sequenz CS2 (CS = *conserved sequence*) (Hahn et al. 1987; Proutski et al. 1997; Olsthoorn und Bol 2001). Des Weiteren haben Strukturvorhersagen und biochemische Analysen die Anwesenheit von fünf *pseudoknot*-Strukturen in der 3'UTR gezeigt (Shi et al. 1996; Olsthoorn und Bol 2001). Ein *pseudoknot* ist eine Struktur, die sich durch Basenpaarung von einzelsträngigen Nukleotiden der RNA einer Haarnadelstruktur mit anderen komplementären Nukleotidbereichen der RNA formiert. Diese *pseudoknots* stabilisieren in der Regel Sekundärstrukturen der RNA (Brierley et al. 2007). Bei Flaviviren konnte gezeigt werden, dass sie die 3'UTR vor Nukleasen schützen und wichtig für die Generierung der sfRNA sind (Funk et al. 2010). Die bisher erwähnten Sekundärstrukturen der 3'UTR tragen zu einer effizienten Replikation bei, sind aber nicht essentiell. Dagegen sind die terminalen ca. 100 Nt, die einen stabilen *stem-loop* (3'SL) ausbilden, unentbehrlich für die Replikation von Flaviviren (Brinton et al. 1986; Tilgner und Shi 2004; Elghonemy et al. 2005; Tilgner et al. 2005; Yu und Markoff 2005; Abb. 3). *Upstream* des 3'SL befindet sich eine stark konservierte Nukleotidsequenz (3'CS) in *mosquito-borne*-Flaviviren, die komplementär zu einer Sequenz (5'CS) ist, die in der für das *core*-Protein kodierenden Region lokalisiert ist und eine zirkuläre Struktur des Genoms induziert (Abb. 3; Hahn et al. 1987). Diese Zyklisierung ist essentiell für die Replikation, jedoch nicht für die Translation der viralen RNA (You und Padmanabhan 1999; Khromykh et al. 2001; Bredenbeek et al. 2003; Corver et al. 2003; Lo et al. 2003; Nomaguchi et al. 2004).

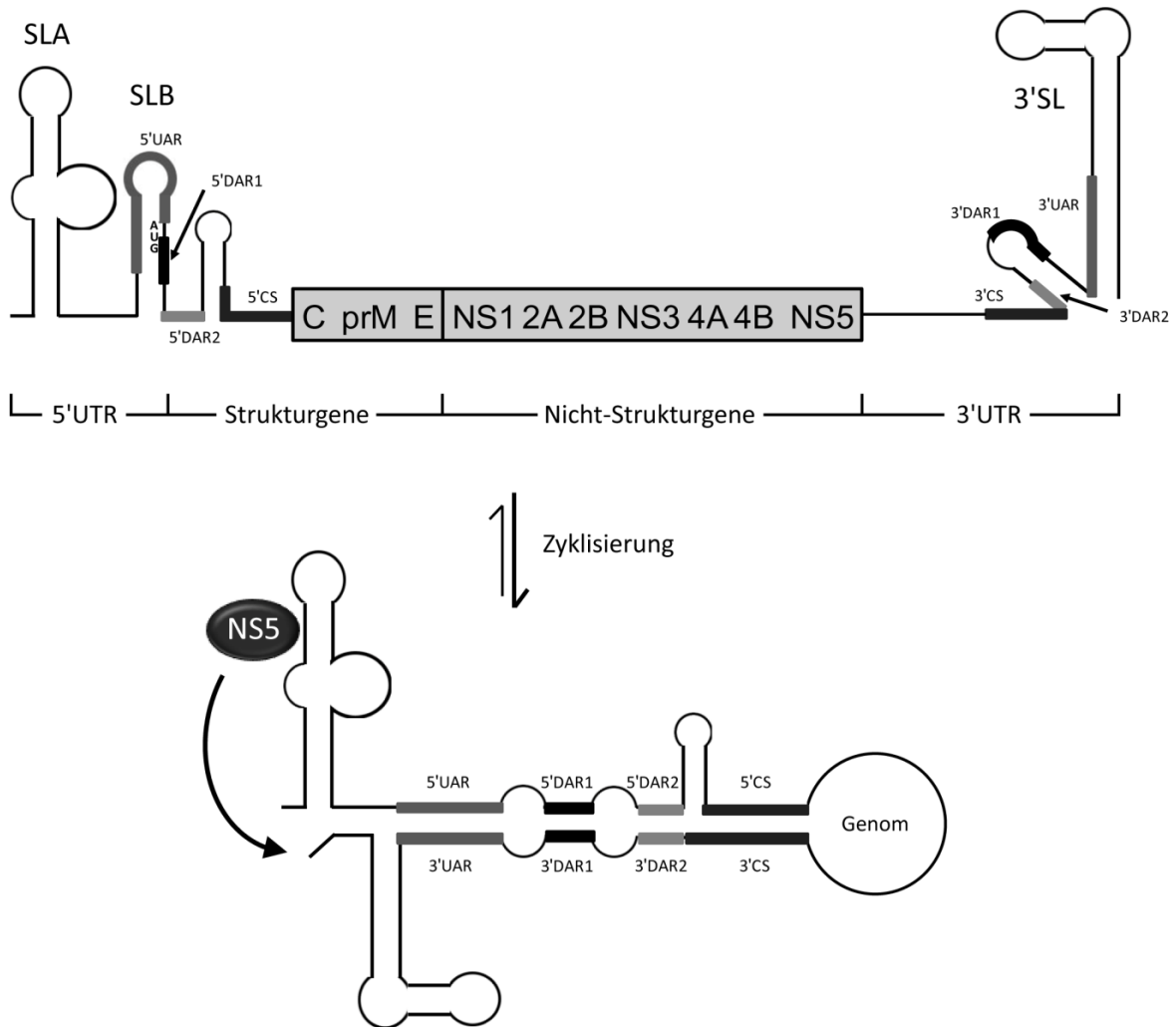


Abb. 3. Organisation und Sekundärstrukturen am 5'- und 3'-Ende der genomischen RNA des West-Nil-Virus. Ein einziger offener Leserahmen kodiert für Struktur (C = *Core*, prM = *premembrane*, E = *envelope*)- und Nichtstrukturproteine (NS1-NS5). Am 5'- bzw. 3'-Ende der RNA befinden sich nichttranslatierte Regionen, die als 5'UTR und 3'UTR bezeichnet werden. Die hier dargestellten Sekundärstrukturen der RNA wurden experimentell nachgewiesen (Dong et al. 2008b). Die Sekundärstrukturen beinhalten folgende konservierte Elemente: SLA (*stem-loop A*), SLB (*stem-loop B*), CS (*conserved sequence*), UAR (*upstream AUG region*), DAR (*downstream AUG region*) und 3'SL (*3'-stem-loop*). Die komplementären Zyklisierungssequenzen in der 5'UTR und 3'UTR (CS, UAR, DAR1 und DAR2) tragen zu einer zirkulären Konformation der genomischen RNA bei, wodurch es zu Veränderungen der Sekundärstruktur der RNA kommt. Das Nichtstrukturprotein NS5 bindet spezifisch an die SLA-Struktur. Aufgrund der Zyklisierung der genomischen RNA wird der SLA-NS5-Komplex in räumliche Nähe zum 3'-Ende positioniert und erleichtert vermutlich die Initiation der (-)-Strang-RNA-Synthese durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase Aktivität von NS5 (durch Pfeil dargestellt).

Eine weitere komplementäre Basenpaarung, die zur Zyklisierung zwischen der 5'UTR und der 3'UTR beiträgt, wird durch das 5'UAR- (*upstream AUG region*) und das 3'UAR-Element vermittelt (Alvarez et al. 2005b; Alvarez et al. 2008; Zhang et al. 2008). Im Gegensatz zu den einzelsträngigen CS-Sequenzen sind beide UAR-Sequenzen jedoch in *stem-loop*-Strukturen angeordnet. Aufgrund dieser Situation ist eine Umstrukturierung der Sekundärstrukturen in der 5'UTR und der 3'UTR notwendig, um eine 5'-3'-UAR-Basenpaarung zu erreichen (Abb. 3). Vor kurzem wurde *downstream* des Startcodons eine weitere Zyklisierungssequenz (DAR =

downstream AUG region) für DENV und WNV identifiziert. Die DAR-Sequenz besteht beim WNV aus zwei Bereichen und wird dementsprechend in DAR1 und DAR2 unterteilt (Abb. 3; Dong et al. 2008b; Friebe und Harris 2010; Friebe et al. 2011).

1.3.3. Die flavivirale 5'UTR

Die flavivirale 5'UTR hat eine Länge von ca. 100 Nt. Obwohl die Sequenz der 5'UTR nur schwach konserviert ist, ist eine einheitliche Sekundärstruktur bei allen Flaviviren erkennbar (Brinton und Dispoto 1988). Die 5'UTR beginnt mit dem stabilen *stem-loop A* (SLA), der einen variablen *side-loop* enthält (Abb. 3; Dong et al. 2008b; Lodeiro et al. 2009; Polacek et al. 2009a). Die Arbeitsgruppe um Andrea Gamarnik hat einen zentralen Schritt der flaviviralen RNA-Replikation entschlüsselt. Diesem Replikationsmodell zu Folge dient der SLA als Promotor für die virale Replikation, die durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase-Aktivität von NS5 am 3'-Ende initiiert wird (Filomatori et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die spezifische Bindung von NS5 an den SLA essentiell für die Replikation der viralen RNA ist. Es wird vermutet, dass die durch die Zyklisierung der RNA induzierte räumliche Nähe des SLA-NS5-Komplexes zum 3'-Ende die Initiation der (-)-Strang-RNA-Synthese durch NS5 erleichtert (Filomatori et al. 2006; Dong et al. 2008b; Lodeiro et al. 2009; Filomatori et al. 2011; Iglesias et al. 2011). *Downstream* von SLA befindet sich ein weiterer konservierter *stem-loop* (SLB), der die für die Replikation essentielle Zyklisierungssequenz UAR, die DAR1-Sequenz sowie das Startcodon AUG enthält (Abb. 3; Alvarez et al. 2005b; Zhang et al. 2008).

1.3.4. Flavivirale RNA-Replikons

Die Entwicklung sogenannter RNA-Replikon-Systeme hat es ermöglicht gezielt die Translation und Replikation von (+)-RNA-Viren zu untersuchen. Diese RNA-Replikons sind subgenomische RNA-Moleküle, die die Fähigkeit haben autonom in Zellen zu replizieren. Sie enthalten Deletionen der Regionen, die nicht essentiell sind für die Replikation. Für die Familie der *Flaviviridae* wurden Replikon-Systeme für Kunjin-Virus (Khromykh und Westaway 1997), BVDV (Behrens et al. 1998) und HCV (Lohmann et al. 1999) etabliert. Das in dieser Arbeit verwendete WNV-Replikon wurde zuerst von Shi et al. (2002) beschrieben. In diesem Replikon sind über 90 % der Strukturgenregion deletiert (Abb. 4). Weiterhin konnte in dieses Replikon anstelle der Strukturgene ein Reporter gen für die Renilla Luziferase inseriert werden. Mit Hilfe dieses sensiblen Reportersystems ist es möglich zwischen der viralen Translation und der RNA-Replikation zu unterscheiden (Lo et al. 2003).

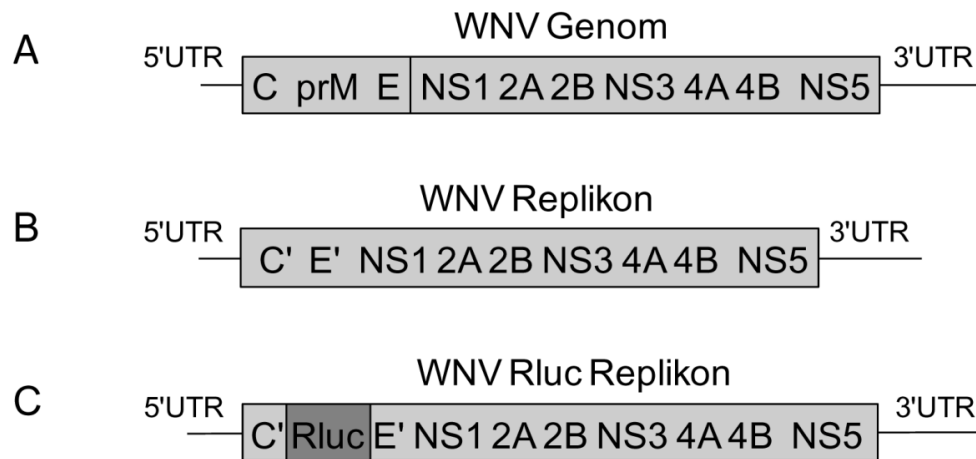


Abb. 4. Strukturelle Organisation der genomischen RNA des West-Nil-Virus und viraler Replikon-RNAs. (A) Das WNV Genom kodiert für Struktur (C = Core, prM = *premembrane*, E = *envelope*)- und Nichtstrukturproteine (NS1-NS5). Am 5'- bzw. 3'-Ende der RNA befinden sich nichttranslatierte Regionen, die als 5'UTR und 3'UTR bezeichnet werden. (B) Bei dem WNV Replikon ist der Großteil der kodierenden Sequenz für die Strukturproteine deletiert. Diese Replikon-RNA repliziert selbstständig, da die Anwesenheit der Nichtstrukturproteine hinreichend ist (Shi et al. 2002). (C) Das WNV Rluc Replikon enthält eine kodierende Sequenz für die Renilla Luziferase (Rluc). Mit diesem Reporter-Replikon kann zwischen der Translation und Replikation der viralen RNA unterschieden werden (Lo et al. 2003).

1.4. Die Rolle zellulärer Proteine im Replikationsprozess von *Flaviviridae*

Aufgrund ihrer begrenzten Genomgröße, die nur die Expression einer geringen Anzahl an Genen zulässt, haben Viren Strategien entwickeln müssen, um Faktoren, die durch die Wirtszelle kodiert werden, in ihren Vermehrungszyklus einzubinden. So nutzen Flaviviren neben der Translationsmaschinerie des Wirtes zur Synthese ihrer viralen Proteine eine Vielzahl zellulärer Proteine, die im viralen Lebenszyklus eine wichtige Rolle spielen (Ahlquist et al. 2003; Krishnan et al. 2008; Fernandez-Garcia et al. 2009; Sessions et al. 2009). In den letzten Jahren sind vermehrt zelluläre Proteine identifiziert worden, die in der Replikation der flaviviralen RNA involviert sind (Tabelle 1). Viele dieser Faktoren, wie z.B. eEF1A, La-Antigen, Mov34 und NF90, binden an die konservierte 3'SL-Struktur der 3'UTR; inwiefern diese Interaktion mit der viralen RNA die Replikation unterstützt, ist jedoch nicht geklärt. Zu den bisher identifizierten Wirtsfaktoren im Lebenszyklus des WNV gehören u.a. der Translationelongationsfaktor eEF1A, die *stress granules*-assoziierten Proteine TIA-1 (*T-cell restricted intracellular antigen-1*) und TIAR (*TIA-1 related*) sowie die Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase Cyclophilin A. eEF1A bindet spezifisch an den 3'SL der (+)-RNA und erleichtert die (-)-Strang-RNA-Synthese über einen noch unbekanntem Mechanismus (Blackwell und Brinton 1997; Davis et al. 2007). TIA-1 und TIAR binden an den 3'SL der (-)-RNA und unterstützen die (+)-RNA-Synthese; der genaue Mechanismus ist ebenfalls noch nicht bekannt. Weiterhin

wird vermutet, dass diese „Rekrutierung“ von TIA-1 und TIAR an die virale RNA die Bildung von *stress granules* inhibiert und somit den *shutoff* der zellulären Translation verhindert (Li et al. 2002; Emara und Brinton 2007). Für Cyclophilin A konnte ebenso eine Beteiligung an der Replikation des WNV gezeigt werden. Die Depletion von Cyclophilin A führte zu einer Abnahme der Virustiter. Außerdem interagiert Cyclophilin A mit genomischer RNA und NS5 im Replikationskomplex (Qing et al. 2009).

Da die (+)-Strang-RNA zum einen als Template für die Translation der viralen RNA und zum anderen als Template für die RNA-Synthese der (-)-Strang-RNA genutzt wird, ist es wichtig diese beiden Prozesse miteinander zu koordinieren (Gamarnik und Andino 1998; Janda und Ahlquist 1998; Barton et al. 1999; Schwartz et al. 2002; Isken et al. 2004). In diesem Zusammenhang wurden zelluläre Faktoren identifiziert, die beim Wechsel von Translation zu Replikation involviert sind und dabei eine Zirkularisierung des viralen Genoms induzieren (Diez et al. 2000; Herold und Andino 2001; Isken et al. 2003; Isken et al. 2007; Ray und Das 2011; Kumar et al. 2013).

Tabelle 1. Zelluläre Proteine, die am Lebenszyklus von Flaviviren beteiligt sind

Name	zelluläre Funktion	Virus	virale Funktion	viraler Interaktionspartner	Referenz
eEF1A	Translations-elongationsfaktor	WNV DENV	Synthese von (-)-RNA	(+)-3'SL NS3 und NS5 (+)-3'SL	(Blackwell und Brinton 1997; Davis et al. 2007; Davis et al. 2013) (De Nova-Ocampo et al. 2002)
TIAR/TIA-1	Stressantwort, Spleißen, Translation	WNV	hemmt die Bildung von <i>stress granules</i> , Synthese von (+)-RNA	(-)-3'SL	(Li et al. 2002; Emara und Brinton 2007; Emara et al. 2008)
Cyclophilin	Proteinfaltung	WNV	Replikation	genomische RNA, NS5	(Qing et al. 2009)
YB-1	Translation, Transkription, mRNA-Stabilität	DENV	antiviral	(+)-3'SL	(Paranjape und Harris 2007)
La	Transkriptionstermination der RNA-Polymerase III, Proteintransport	DENV JEV	unbekannt Virusvermehrung	3'UTR, 5'UTR (+)-3'SL, 5'UTR	(De Nova-Ocampo et al. 2002; Garcia-Montalvo et al. 2004; Yocupicio-Monroy et al. 2007) (Vashist et al. 2009; Vashist et al. 2011)
Mov34	Bestandteil des Proteasoms	JEV	unbekannt	(+)-3'SL	(Ta und Vрати 2000)

PTB	Pre-mRNA-Spleißen, mRNA-Stabilität, mRNA-Lokalisation	DENV	Translation und Replikation	3'UTR	(De Nova-Ocampo et al. 2002; Agis-Juarez et al. 2009)
NF90	mRNA-Stabilität, Posttranskriptionale Regulation, Translation	DENV	Virusvermehrung	(+)-3'SL	(Gomila et al. 2011)
hnRNPA2	Posttranskriptionale Regulation, Telomer-Biogenese	JEV	Replikation	(-)-5'UTR, Core	(Kato et al. 2011)
PABP	Translation	DENV	Translation	3'UTR	(Polacek et al. 2009b)
3-hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase	Cholesterinbiosynthese	WNV	Virus-induzierte Membranen	unbekannt	(Mackenzie et al. 2007)
Importin α/β	Proteintransport in den Zellkern	DENV	Import von NS5 in den Zellkern	NS5	(Pryor et al. 2007)
DNAJC14	Transport des Dopamin D ₁ -Rezeptors	YFV	Zusammenbau des Replikationskomplexes	NS3	(Yi et al. 2011; Yi et al. 2012)

eEF1A = eukaryotic elongation factor 1A; TIA-1 = T-cell-restricted intracellular antigen-1; TIAR = TIA-1-related protein; YB-1 = Y-box-binding protein 1; La = Autoantigen La; PTB = polypyrimidine tract binding protein; NFAR = nuclear factor associated with RNA; hnRNPA2 = heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2; PABP1 = poly(A)-binding protein 1

1.5. Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Wirtsfaktoren des West-Nil-Virus identifiziert und charakterisiert werden, die den RNA-Replikationsprozess und hier speziell den ersten Schritt dieses Prozesses, die Synthese des (-)-Strang-Intermediates, unterstützen. Das *Screening* nach solchen Faktoren sollte dabei mit Hilfe eines *in vitro*-Systems erfolgen, mit dem die (-)-Strang-RNA-Synthese durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5 *in vitro* dargestellt werden kann. In diesem *in vitro*-System identifizierte Kandidaten sollten dann weiter bezüglich ihrer spezifischen Rolle im WNV-Lebenszyklus untersucht werden. Insbesondere sollte der molekulare Mechanismus aufgeklärt werden, über den ein Wirtsfaktor die virale Replikation unterstützt.

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien, Puffer und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien, soweit nicht anders angegeben, wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Becton Dickinson (Heidelberg), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), ThermoFisher Scientific (Waltham, USA), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Serva (Heidelberg), Th. Geyer (Renningen) und Diagonal (Münster) bezogen. Die Herkunft kommerziell erhältlicher Enzyme ist an den jeweiligen Textstellen angegeben. Es wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

2.2. Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Konstruktion der Plasmide ist im Anhang aufgeführt.

Tabelle 2: Bakterienstämme und Plasmide

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
<i>Escherichia coli</i>			
One Shot®TOP10		F ⁻ , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$, $\phi80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(araleu)7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	life technologies, Darmstadt
BL21-CodonPlus®-RP		<i>E. coli</i> B F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>dcm</i> ⁺ , Tet ^r , <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> , Hte [<i>argU proL Cam</i> ^r]	life technologies, Darmstadt
	pGEM® -T Easy	<i>amp</i> ^r , <i>lacPOZ</i> ⁱ , zur Klonierung von PCR-Produkten	Promega, Madison, USA
	pCR®4-TOPO®	<i>amp</i> ^r , <i>kan</i> ^r , zur Klonierung von PCR-Produkten	life technologies, Darmstadt
	pUC18	<i>amp</i> ^r , Klonierungsvektor	NEB, Ipswich, USA
	pCDNA5/TO	<i>amp</i> ^r , Expressionsvektor	life technologies, Darmstadt
	pETSUMOadapt	<i>kan</i> ^r , Expressionsvektor, Derivat	Dr. Eva Bosse-Doenecke
	pWNVRep	WNV Replikon (Stamm NY 2000-crow3356)	(Shi et al. 2002)
	SFri2	<i>NS5</i> (West-Nil-Virus) in pETSUMOadapt	diese Arbeit
	SFri4	<i>HNRNPD</i> (Isoform p45) in pETSUMOadapt	diese Arbeit
	SFri8	Derivat von pWNVRep, Hepatitis-Delta-Ribozym (HDVr) <i>downstream</i> der 3'UTR	diese Arbeit

SFri9	Derivat von SFri8, NS5 D ₆₆₉ A, replikationsdefizient	diese Arbeit
SFri11	Derivat von SFri8, <i>Rluc FMDV2A</i> in <i>AflI</i> -Schnittstelle	diese Arbeit
SFri17	5'UTR (West-Nil-Virus) in pUC18	diese Arbeit
SFri18	3'UTR (West-Nil-Virus) in pUC18	diese Arbeit
SFri23	Derivat von SFri8, ΔNS1-NS5 (sgRNA)	diese Arbeit
SFri26	Derivat von SFri23, CS in der 5'UTR mutiert	diese Arbeit
SFri27	Derivat von SFri26, CS in der 3'UTR mutiert (Komplementationsmutation)	diese Arbeit
SFri28	Derivat von SFri23, SLA der 5'UTR mutiert	diese Arbeit
SFri30	Derivat von SFri 8, ΔNS1-NS5-3'UTR' (sgRNAΔAU)	diese Arbeit
SFri31	Derivat von SFri23, DAR2 in der 3'UTR mutiert	diese Arbeit
SFri32	Derivat von SFri31, DAR2 in der 5'UTR mutiert (Komplementationsmutation)	diese Arbeit
SFri33	Derivat von SFri23, DAR1 in der 5'UTR mutiert	diese Arbeit
SFri34	Derivat von SFri23, UAR in der 3'UTR mutiert	diese Arbeit
SFri35	Derivat von SFri34, UAR in der 5'UTR mutiert (Komplementationsmutation)	diese Arbeit
SFri36	Derivat von SFri33, DAR1 in der 3'UTR mutiert (Komplementationsmutation)	diese Arbeit
SFri43	<i>HNRNPD</i> (Isoform p45) in pCDNA5/TO; FLAG-tag-Sequenz <i>upstream</i>	diese Arbeit
SFri44	<i>HNRNPD</i> (Isoform p42) in pCDNA5/TO; FLAG-tag-Sequenz <i>upstream</i>	diese Arbeit
SFri45	<i>HNRNPD</i> (Isoform p40) in pCDNA5/TO; FLAG-tag-Sequenz <i>upstream</i>	diese Arbeit
SFri46	<i>HNRNPD</i> (Isoform p37) in pCDNA5/TO; FLAG-tag-Sequenz <i>upstream</i>	diese Arbeit
SFri48	<i>PRMT1</i> variant1 in pETSUMOadapt	diese Arbeit
SFri49	<i>PRMT1</i> variant2 in pETSUMOadapt	diese Arbeit
SFri50	<i>PRMT1</i> variant3 in pETSUMOadapt	diese Arbeit
SFri51	<i>PRMT1</i> variant5 in pETSUMOadapt	diese Arbeit
SFri57	Derivat von SFri4; <i>PRMT1</i> variant 1 <i>upstream</i> von <i>SMT3-HNRNPD</i> (Isoform p45)	diese Arbeit
SFri58	Derivat von SFri11, CS in der 5'UTR mutiert	diese Arbeit
SFri59	Derivat von SFri11, SLA der 5'UTR mutiert	diese Arbeit
SFri60	Derivat von SFri11, DAR1 in der 5'UTR mutiert	diese Arbeit

SFri61	Derivat von SFri11, DAR2 in der 3'UTR mutiert	diese Arbeit
SFri62	Derivat von SFri8, AU-reiche Region deletiert	diese Arbeit
SFri63	Derivat von SFri11, AU-reiche Region deletiert	diese Arbeit
SFri67	Derivat von SFri23, AU-reiche Region komplettiert (sgRNA ^{mod})	diese Arbeit
SFri68	Derivat von SFri4, HNRNPD S ₁₉₀ E, T ₁₉₃ D	diese Arbeit
SFri71	Dengue-Virus Replikon	Dr. Beate Kümmerer
pUC18-3'UTR_111 Nt	3'-terminalen 111 Nt (WNV) in pUC18	Diplomarbeit Anke Piechotta

2.3. Kultivierungsbedingungen für prokaryontische Zellen

2.3.1. Nährmedium und Zusätze

A) LB-Medium (Sambrook et al. 1989)

Dieses Komplexmedium diente der Zellanzucht von *E. coli*-Stämmen.

10 g Bacto-Trypton
 5 g Hefeextrakt
 10 g Natriumchlorid
 ad 1 l H₂O_{bidest}

Zur Herstellung von LB-Platten wurden dem Medium 15 g/l Agar zugesetzt.

B) Medienzusätze

Antibiotika

Die Herstellung der Antibiotika-Stammlösungen erfolgte nach Ausubel et al. (1993). Die Stammlösungen wurden bei –20°C aufbewahrt und den sterilen Medien in den in Tabelle 3 aufgeführten Endkonzentrationen zugesetzt.

Tabelle 3: Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentration im Medium

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 g/l in H ₂ O _{bidest}	100 mg/l
Kanamycin	50 g/l in H ₂ O _{bidest}	50 mg/l
Chloramphenicol	20 g/l in 100 % Ethanol	20 mg/l
Erythromycin	10 g/l in 100 % Ethanol	10 mg/l

Weitere Medienzusätze

Als weitere Zusätze in den Nährmedien dienten der künstliche Induktor IPTG sowie das chromogene Substrat X-Gal. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei -20°C. IPTG lag als wässrige Stammlösung von 100 mM vor und wurde in einer Endkonzentration von 1 mM den Flüssigkulturen zur Induktion der Genexpression zugesetzt. Von X-Gal wurde eine Stammlösung von 100 g/l in Dimethylformamid (DMF) hergestellt. Die Endkonzentration im Medium betrug 48 mg/l.

2.3.2. Anzucht und Zellernte

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium angezogen. Zur Selektion wurden die entsprechenden Medienzusätze in den beschriebenen Konzentrationen zugegeben. Als Anzuchtgefäße dienten sterile Reagenzgläser und Erlenmeyerkolben, wobei auf ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 geachtet wurde. Die Flüssigkulturen wurden bei 37°C (Brutschrank) in Reagenzgläsern bzw. Erlenmeyerkolben auf einem Rotationsschüttler (GFL-3005, Hilab, Düsseldorf) oder auf einem Universalschüttler (SM30, Edmund Bühler GmbH, Hechingen) bei 200 rpm angezogen. Das Zellwachstum wurde als Optische Dichte (OD₆₀₀) mit einem Spektrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) gegen unbeimpftes Medium gemessen. Die Zellernte erfolgte entweder in der Hettich-Zentrifuge Mikro 200 (Winkelrotor für 24 x 1,5 / 2 ml) oder in der Hettich-Zentrifuge Rotina 380R (Winkelrotor, 6-fach, Hettich, Tuttlingen). Beimpfte Agar-Platten wurden aerob bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.3.3. Stammhaltung

E. coli-Stämme wurden auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Bei Bedarf wurden die Stämme alle vier Wochen auf frische Platten überimpft. Nach der Inkubation bei 37°C wurden alle Platten bei 4°C aufbewahrt.

2.4. Kultivierung, Transfektion und Infektion humaner Zellen

2.4.1. Kultivierung von Huh7-Zellen

Die Kultivierung der humanen Leberkarzinomzelllinie Huh7 (*human hepatoma*, Prof. Dr. Ralf Bartschlagel, Universität Heidelberg) erfolgte in der Regel in 10 cm-Zellkulturschalen. Die Passage der Zellen erfolgte zweimal in der Woche. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0.5 ml 0.25 % Trypsin-EDTA (life technologies, Darmstadt) benetzt. Nach einer kurzen Inkubation wurden die abgelösten Zellen in einem entsprechenden Volumen an Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturschale überführt. Die Kultivierung erfolgte in DMEM (Dulbeccos *Modified Eagle-*

Medium, life technologies, Darmstadt) mit 100 U/ml Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin (life Technologies, Darmstadt), 0.25 µg/ml Hypoxanthin und 0.1 µg/ml D-Biotin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) sowie 10 % fötalem Kälberserum (FCS, PAN-Biotech, Aidenbach). Die Zelllinien wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

PBS: 137 mM NaCl
 2.7 mM KCl
 10 mM Na₂HPO₄
 2 mM KH₂PO₄
 pH 7.2

2.4.2. Transfektion von Plasmid-DNA

Die zu transfizierenden Huh7-Zellen wurden einen Tag zuvor ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu 80 - 90 % konfluent gewachsen waren. Zur Transfektion einer 10 cm-Kulturschale wurden 1.4 ml serum- und antibiotikafreies DMEM-Medium mit 20 µl TurboFect™ Transfektions-Reagenz (Thermo Scientific, Bonn) und 20 µg Plasmid-DNA vermischt und für 15 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde auf die Zellen verteilt und nach 24 h oder 48 h wurden die Zellen geerntet.

2.4.3. Transfektion von RNA

2.4.3.1. Elektroporation von viraler RNA

Huh7-Zellen wurden einen Tag vor der geplanten Transfektion ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu 80 - 90 % konfluent waren. Die Zellen wurden trypsinisiert, in Medium resuspendiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen einer 10 cm-Kulturschale wurden in 400 µl PBS resuspendiert, mit 0.03 – 3 µg Replikon-RNA vermischt und in eine Elektroporationsküvette (Gene Pulser/MicroPulser Cuvettes, 0.4 cm *gap*, Bio-Rad Laboratories, München) transferiert. Die Parameter der Elektroporation waren wie folgt:

Spannung U = 200 V
Widerstand R = ∞
Kapazität C = 950 µF
1 Puls

Anschließend wurden die Zellen mit zweimal 800 µl Medium aus den Küvetten in entsprechende Kulturschalen überführt. Die Transfektionseffizienz wurde nach 24 - 48 h mittels Immunfluoreszenz bestimmt. Die Analyse der viralen Proteinsynthese sowie die Quantifizierung der viralen RNA erfolgten nach verschiedenen Zeitpunkten mittels Western Blot und *real-time*-PCR.

2.4.3.2. Transfektion von siRNA mit Lipofectamine™ RNAiMAX Transfektions-Reagenz

siRNAs (Tabelle 4) wurden von kommerziellen Anbietern (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) bezogen. Sie wurden in 6 mM HEPES, 20 mM KCl, 0.2 mM MgCl₂, pH 7.3 gelöst (Stammlösung: 100 pmol/μl) und bei -20°C gelagert.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten siRNAs

Name	5' → 3'-Sequenz	Beschreibung
sihnrnpd	AGAAAGATCTGAAGGACTA	bindet im <i>open reading frame</i> von <i>HNRNPd</i> , erkennt alle Spleißvarianten
siPRMT1	CGTCAAAGCCAACAAGTTA	bindet im <i>open reading frame</i> von <i>PRMT1</i> , erkennt alle Spleißvarianten
siGFP	GGCUACGUCCAGGAGCGCACC	Kontroll-siRNA, bindet im <i>open reading frame</i> von <i>green fluorescent protein</i> (GFP)

Die zu transfizierenden Huh7-Zellen wurden einen Tag zuvor ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu 50 - 70 % konfluent gewachsen waren. Zur Transfektion einer 10 cm-Kulturschale wurden je 1.5 ml serum- und antibiotikafreies DMEM-Medium mit 30 μl Lipofectamine™ RNAiMAX Transfektions-Reagenz (life technologies, Darmstadt) bzw. 1200 pmol siRNA gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze vereint und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde auf die Zellen verteilt und nach 24 h wurden die Zellen 1:2 gesplittet. Nach weiteren 24 h erfolgte die Transfektion der viralen Replikon-RNA durch Elektroporation.

2.4.4. Infektionsexperimente mit West-Nil-Virus

Die RNAi-vermittelte Depletion von AUF1 in Huh7-Zellen wurde wie unter 2.4.3.2. beschrieben durchgeführt. Nach 72 h wurden ungefähr 5x10⁵ Huh7-Zellen mit WNV-Stamm 3356 [TCID₅₀ (*tissue culture infectious dose*) von 1x10⁴/ml für 1 h] infiziert. Nach 24, 48 und 72 h wurden die Zellen fixiert und mittels Immunfluoreszenz wie unter 2.7.12. beschrieben analysiert. Die Infektionsexperimente wurden von Stefan Chabierski (Fraunhofer Institut, Leipzig, Arbeitsgruppe Dr. Sebastian Ulbert) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Gerd Liebert (Institut für Virologie, Universität Leipzig) durchgeführt.

2.5. Molekulargenetische Arbeiten mit RNA

Für die Arbeiten mit RNA wurden RNase-freie Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) sowie RNase-freies Wasser (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. Als zusätzlichen Schutz vor endogenen RNasen wurden bei der Arbeit stets Handschuhe getragen, den Reaktionen gegebenenfalls der RNase Inhibitor RiboLock (Thermo Scientific, Bonn) zugesetzt und hitzelabile Geräte gründlich mit 70%igem (v/v) Ethanol behandelt.

2.5.1. RNA-Isolation mit TRIZOL

Gesamt-RNA aus humanen Zellen wurde mit der TRIZOL-Methode gewonnen. Dazu wurden Huh7-Zellen durch Trypsinierung von den Kulturschalen abgelöst, zentrifugiert (5 min, 380 x g, RT, Mikro 200, Hettich, Tuttlingen) und das Pellet einmal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 800 µl TRIZOL resuspendiert und für 5 min inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform und es wurde gründlich für 10 sec geschüttelt. Das Gemisch wurde für 15 min bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert und 400 µl der wässrigen Oberphase mit 400 µl Isopropanol versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Die gefällte RNA wurde für 10 min bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert und das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen (5 min, 4°C, 7500 x g). Das Pellet wurde kurz luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen an H₂O_{Sigma} aufgenommen. Die Konzentration wurde bei 260 nm gemessen und die Qualität der RNA auf einem Formaldehyd-Agarose-Gel überprüft.

TRIZOL: 0.8 M Guanidinthiocyanat
 0.4 M Ammoniumthiocyanat
 0.1 M Natriumacetat
 5 % Glycerin
 38 % Phenol (wassergesättigt, stabilisiert)

2.5.2. *in vitro* Transkription von nicht-markierter RNA

Als Template zur Herstellung von nicht-markierter RNA dienten Plasmide, die mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen linearisiert wurden bzw. PCR-Produkte. Ribonukleosidtriphosphate wurden von Jena Bioscience (Jena) bezogen. Der allgemein verwendete *in vitro* Transkriptions-Ansatz mit der T7 RNA Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), setzte sich folgendermaßen zusammen:

1 µg Plasmid _{linearisiert} bzw. 200 ng PCR-Produkt	x µl
5 x Transkriptionspuffer	8 µl
10 mM rNTPs	4 µl
100 mM DTT	4 µl
RiboLock (40 U/µl)	0.5 µl
T7 RNA Polymerase (50 U/µl)	1 µl
H ₂ O _{Sigma}	ad 40 µl

Für *in vitro* Transkriptionen von Replikon-RNA wurde ein cap Analog (Jena Bioscience, Jena) verwendet. Dazu wurde m⁷GpppG (West-Nil-Virus) bzw. m⁷GpppA (Dengue-Virus) der Reaktion in einer Endkonzentration von 0.8 mM zugesetzt. Die rGTP bzw. rATP-Konzentration wurde auf 0.5 mM reduziert.

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 U DNaseI (Roche, Mannheim) und eine weitere Inkubation für 1 h bei 37°C. Der Ansatz wurde

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Sigma}}$ auf 200 μl aufgefüllt und mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Der wässrige Überstand wurde mit 1 Vol Chloroform extrahiert und anschließend mit 2.36 Vol 100%igem Ethanol und 0.18 Vol 6 M Ammoniumacetat für 10 min auf Eis gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 16000 x g und 4°C (Mikro 200, Hettich, Tuttlingen). Das RNA-Pellet wurde mit 500 μl 70%igem Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen an $\text{H}_2\text{O}_{\text{Sigma}}$ aufgenommen. Die Konzentration wurde bei 260 nm gemessen und die Qualität der RNA auf einem Formaldehyd-Agarose-Gel überprüft.

2.5.3. Herstellung von radioaktiv-markierter RNA

Um radioaktiv-markierte RNA zu erhalten, wurde der unter 2.5.2. beschriebene Ansatz auf ein Volumen von 20 μl reduziert. Die Endkonzentration von rCTP wurde auf 0.1 mM gesenkt und dem Ansatz 0.66 μM [α - ^{32}P]CTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, Hartmann Analytic, Braunschweig) zugesetzt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde die Template-DNA mit 10 U DNaseI (Roche, Mannheim) für 1 h bei 37°C behandelt. Der Ansatz wurde mit 20 μl Formamid-Ladepuffer versetzt und vor dem Beladen auf ein denaturierendes 5%iges Harnstoff-Polyacrylamidgel bei 95°C für 5 min erhitzt. Die RNA wurde aus dem Gel mit 500 μl 0.5 M Ammoniumacetat, pH 7.0, 0.1 % SDS, 10 mM EDTA über Nacht eluiert. Es folgte eine Extraktion mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Der wässrige Überstand wurde mit 1 Vol Chloroform extrahiert und anschließend mit 2.5 Vol 100%igem Ethanol und 0.1 Vol 3 M Natriumacetat für 30 min bei -20°C gefällt. Die RNA wurde 30 min bei 15700 x g und 4°C zentrifugiert (*Centrifuge* 5415 R, Eppendorf, Hamburg), mit 70%igem Ethanol gewaschen, das Pellet kurz luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen an $\text{H}_2\text{O}_{\text{Sigma}}$ aufgenommen.

2.5.4. Konzentrationsbestimmung von RNA

Um die Konzentration der präparierten RNA zu bestimmen, wurde die optische Dichte bei 260 nm mit einem Photospektrometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) gemessen, wobei eine OD von 1.0 einer Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA entspricht. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm lässt Rückschlüsse auf Verunreinigungen zu. Ist dieser Wert kleiner als 1.7, ist die RNA-Präparation mit Proteinen verunreinigt. Beträgt der Wert 1.7 oder mehr, zeigt die RNA-Präparation keine Verunreinigung mit Proteinen.

2.5.5. Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

Für analytische Zwecke wurden 1%ige denaturierende Formaldehydgele verwendet. Für 50 ml Gel wurden 0.5 g Agarose in 44.5 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ mit 5 ml 10 x MOPS (0.2 M MOPS, 0.05 M Natriumacetat, 0.01 M EDTA in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, pH 7.0) in der Mikrowelle gelöst und auf ca. 50°C abgekühlt. Danach wurden 0.5 ml Formaldehyd hinzugegeben, gut gemischt und in eine

Minigelkammer gegossen. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS. Die RNA wurde mit 2 µl 5 x RNA-Ladepuffer (4 mM EDTA, 0.88 M Formaldehyd, 20 % Glycerin, 32 % Formamid, 0.1 mg/ml Ethidiumbromid, 4 x MOPS) gemischt, auf 10 µl mit H₂O_{Sigma} aufgefüllt und bei 70°C für 10 min denaturiert. Zum schnellen Abkühlen wurden die Proben für 2 min auf Eis gestellt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 Volt (MIDI POWER SUPPLY MP-300N, MRC, Holon, Israel).

2.5.6. Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Reinigung der RNA aus radioaktiven *in vitro* Transkriptionen bzw. zur Auftrennung der RNA-Produkte des radioaktiven RdRp-Assays wurden 5%ige denaturierende Harnstoff-Gele mit 0.5 x TBE (44.5 mM Tris, 44.5 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8.0) als Laufpuffer verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte zwischen Glasplatten der Abmessung 10 x 10 x 0.1 cm bzw. 20 x 10 x 0.1 cm. Pro Gel wurden 12 ml (kleines Gel) bzw. 25 ml (großes Gel) Gellösung hergestellt.

Gellösung 1: 1 x TBE-Puffer + 8 M Harnstoff

Gellösung 2: 0.5 x TBE-Puffer + 20 % Acrylamid:Bisacrylamid (19:1)

Beide Lösungen wurden gemischt (3 Vol Gellösung 1 und 1 Vol Gellösung 2) und mit 0.08 % (w/v) APS und 0.17 % (v/v) TEMED versetzt und in die vorbereiteten Platten gegossen. In das noch flüssige Gel wurde ein Probenkamm fixiert, der nach Polymerisation des Geles entfernt wurde und zur Ausbildung der Taschen zur Aufnahme der Proben diente. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1 Vol Formamid-Ladepuffer [10 mM EDTA (pH 8.0), 0.1 % (w/v) Xylencyanol, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau, 97.5 % (v/v) Formamid] versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei 10 W (kleines Gel) bzw. 15 W (großes Gel) pro Gel durchgeführt (Consort EV233 *Electrophoresis Power Supply*, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel in 5%iger Essigsäure für 20 min fixiert und auf Whatman®-Papier vakuumgetrocknet (Unigeldryer 3545, UniEquip, Planegg). Radioaktive RNA-Transkripte wurden mit Hilfe einer UV-Lampe und einer Dünnschichtchromatographie-Platte sichtbar gemacht und aus dem Gel ausgeschnitten.

2.5.7. RNA-Größenstandard

Die Bestimmung der Größe von RNA in Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe des RiboRuler™ *High Range RNA Ladder* (Thermo Scientific, Bonn) (8 Fragmentgrößen: 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500 und 200 bp).

2.5.8. Reverse Transkription

Zur Quantifizierung der Genexpression bzw. zur Klonierung von humanen Genen wurde die Methode der Reversen Transkription angewandt. Dabei wird die RNA mittels der Reversen Transkriptase (RevertAidTM, Thermo Scientific, Bonn) in cDNA umgeschrieben, die nachfolgend amplifiziert werden kann. Als Primer für die Reverse Transkriptase wurden ein Oligo (dT)-Primer (zur RT polyadenylierter mRNA) und genspezifische Primer eingesetzt.

Im ersten Schritt erfolgte die Synthese der cDNA:

Gesamt-RNA	0.5 - 2 µg
Primer	15 pmol
H ₂ O _{Sigma}	ad 12.5 µl

Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 70°C inkubiert und danach sofort auf Eis abgekühlt.

Danach erfolgte die Zugabe von:

5 x RT-Puffer	4 µl
10 mM dNTP-Lösung	2 µl
RiboLock (40 U/µl)	0.2 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	0.5 µl
H ₂ O _{Sigma}	0.8 µl

Daran schloss sich die Reaktion für 1 h bei 42°C an. Das Enzym wurde danach für 10 min bei 70°C inaktiviert. Die so gewonnene cDNA konnte nach dem unter 2.6.9.2 beschriebenen Protokoll amplifiziert werden.

2.6. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA

2.6.1. Isolation von DNA

Da es für die Arbeit mit DNA erforderlich war, vorhandene DNasen zu inaktivieren, wurden alle hitzebeständigen Geräte und Lösungen vor Beginn der Versuche bei 121°C autoklaviert. Hitzeinstabile Geräte wurden mit 70%igem (v/v) Ethanol abgerieben, hitzelabile Lösungen sterilfiltriert.

2.6.1.1. Mikroplasmidpräparation (nach Akada 1994)

Diese Methode diente der Größenabschätzung rekombinanter Plasmide. Auf Grund des geringen Aufwandes konnten so eine Vielzahl von Klonen relativ einfach überprüft werden. Je 100 µl einer Übernachtskultur der zu untersuchenden Klone wurden in ein steriles 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 50 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) sowie 10 µl Ladepuffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 60 % (v/v) Glycerin, 0.03 % (w/v) Xylen Cyanol FF, 60 mM EDTA, 0.03 % (w/v) Bromphenolblau] zugegeben. Nach Mischen mittels Vortex

Shaker (Vortex 3, IKA, Staufen) für 10 sec und Zentrifugation für 3 min bei 16000 x g in einer Tischzentrifuge (Mikro 200, Hettich, Tuttlingen) wurden 15 µl des wässrigen Überstandes im 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

2.6.1.2. Miniplasmidisoliation (verändert nach Sambrook et al. 1989)

Diese Methode diente der schnellen Analyse von Plasmid-DNA, deren Reinheit für Restriktionsanalysen und PCR ausreichend war. Die Anzucht der Zellen erfolgte in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum über Nacht. Die Zellen wurden in 1.5 ml-Reaktionsgefäße überführt und in einer Tischzentrifuge (Mikro 200, Hettich, Tuttlingen) sedimentiert. Nach sorgfältiger Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 150 µl Lösung I [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 0.1 mg/ml RNaseA] vollständig resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 150 µl Lösung II (0.2 M NaOH, 10 g/l SDS). Es wurde vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat) zugesetzt, gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Es schloss sich eine Zentrifugation für 10 min bei 16000 x g und 4°C an. Der wässrige Überstand wurde in ein neues steriles 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 2.5 Vol 100%igem Ethanol für 5 min auf Eis. Nach dem Mischen wurde für 10 min bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 50 µl sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.6.1.3. Plasmidisoliation mittels kommerziellem Kit

Diese Methode diente der Gewinnung hochreiner Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung und zur präparativen Restriktion eingesetzt wurde. Dabei kamen Plasmidisolationskits von PEQLAB (Erlangen) sowie von Thermo Scientific (Bonn) zum Einsatz. 3 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden bei 16000 x g pelletiert. Die anschließende Isolation von Plasmid-DNA erfolgte nach Anweisungen des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl sterilem H₂O_{bidest} eluiert.

Für die Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das Präparationskit *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega, Madison, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.6.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophoresekammern (Fisher Scientific, Schwerte). Dabei variierte die Gelkonzentration je nach Fragmentgröße von 0.8 % (w/v) bis zu 2.5 % (w/v).

Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 x TAE-Puffer [40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA (pH 8.0)] eingesetzt. Die Agarose wurde dem Puffer zugegeben und in einer Mikrowelle (AFK) gelöst. Dann wurde der abgekühlten, aber noch flüssigen Agaroselösung Ethidiumbromid (0.25 mg/l) zugesetzt und das Gel in den Träger in der Elektrophoresekammer gegossen. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0.2 Vol Ladepuffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 60 % (v/v) Glycerin, 0.03 % (w/v) Xylen Cyanol FF, 60 mM EDTA, 0.03 % (w/v) Bromphenolblau] versetzt. Die aufgetragene Menge richtete sich nach der DNA-Größe und deren Konzentration. Sie betrug 1-20 µl (analytische Gele) bzw. 20-100 µl (präparative Gele). Die Elektrophorese erfolgte bei 80–120 V (MIDI POWER SUPPLY MP-300N, MRC, Holon, Israel), bis die gewünschten Fragmente genügend aufgetrennt waren. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte durch UV-Licht (Geldokumentationsanlage EDAS 290, Kodak, Rochester, USA), die Dokumentation mittels der dazugehörigen Bild-Aufnahme-Software.

2.6.2.1. DNA-Größenstandard

Die Bestimmung der Größe linearer DNA-Fragmente in Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe des *Gene RulerTM 50 bp DNA Ladder* (Thermo Scientific, Bonn) (13 Fragmentgrößen: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 und 50 bp) und des *Gene RulerTM 1 kb DNA Ladder* (Thermo Scientific, Bonn) (14 Fragmentgrößen: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 und 250 bp).

2.6.3. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl (analytisch) bis 100 µl (präparativ). Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten Puffer, die zehnfach konzentriert vorlagen und auf einfache Konzentration im Ansatz verdünnt wurden. Pro 1 µg DNA wurden 1-5 U Restriktionsendonuklease zugegeben und für mindestens 1 h bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. 1 U eines Enzyms ist als die Aktivität definiert, die 1 µg DNA in 1 h bei 37°C spaltet.

2.6.4. Reinigung und Konzentrierung von DNA

Die Reinigung der DNA erfolgte über das *PCR Purification Kit* (Thermo Scientific, Bonn). Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen und die DNA mit 30-50 µl sterilem H₂O_{bidest} eluiert. Die Methode diente der Reinigung von PCR-Produkten, wurde aber auch zur Reinigung präparativer Restriktionen eingesetzt. Des Weiteren wurde DNA über Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und für 5 min bei 16000 x g zentrifugiert (Mikro 200, Hettich, Tuttlingen). Die Oberphase wurde mit 1 Vol Chloroform gemischt und für 5 min bei 16000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 2.5 Vol

Ethanol und 0.1 Vol 3 M Natriumacetat (pH 5.3) versetzt und für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei $16000 \times g$ und 4°C . Das DNA Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und in sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ resuspendiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C .

2.6.5. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu reinigenden DNA-Fragmente wurden in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt. Im langwelligen UV-Licht wurde das entsprechende Fragment aus dem Gel herausgeschnitten. Die Isolation der DNA aus diesem Agaroseblock erfolgte durch das *Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific, Bonn). Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen und die DNA mit 30-50 μl sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ eluiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C .

2.6.6. Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die Konzentration der präparierten DNA zu bestimmen wurde die optische Dichte bei 260 nm mit einem Photospektrometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) gemessen, wobei eine OD von 1.0 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA entspricht. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm lässt Rückschlüsse auf Verunreinigungen zu. Ist dieser Wert kleiner als 1.7, ist die DNA-Präparation mit Proteinen verunreinigt. Beträgt der Wert 1.7 oder mehr, zeigt die DNA-Präparation keine Verunreinigung mit Proteinen.

2.6.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 20 μl durchgeführt. Das Verhältnis der molaren Menge von Vektor- zu Fragment-DNA betrug ca. 1:5. Danach erfolgte die Zugabe von 2 μl 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific, Bonn). Für die Ligation von PCR-Produkten in pGEM[®]-T Easy wurden 0.5 μl Vektor-DNA eingesetzt und Ligationspuffer sowie T4-DNA-Ligase des Ligationskits (Promega, Madison, USA) verwendet. Der Ligationsansatz wurde für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.6.8. Phosphorylierung/Dephosphorylierung von DNA

Die Phosphorylierung von PCR-Produkten bzw. die Dephosphorylierung von Plasmid-DNA erfolgte mit der T4-Polynukleotidkinase (Thermo Scientific, Bonn) bzw. der Alkalischen Phosphatase (Thermo Scientific, Bonn). Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

2.6.9. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.6.9.1. Auswahl der Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer sind in Tabelle 10 im Anhang aufgelistet. Die Oligonukleotid-Primer wurden von kommerziellen Anbietern (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) bezogen. Sie wurden in sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst (Stammlösung: 100 pmol/ μl) und bei -20°C gelagert.

2.6.9.2. Standard-PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion diente der Amplifikation von DNA für präparative und analytische Zwecke. Für präparative Zwecke wurde *Phusion*-Polymerase (Finnzymes, Vantaa, Finnland) mit einer 5'-3'-*proof-reading*-Aktivität verwendet. Für analytische Zwecke wurde *DreamTaq*-Polymerase (Thermo Scientific, Bonn) verwendet. Hierbei wurde entweder gereinigte DNA oder frisches Koloniematerial als Template verwendet. Die Zellen wurden mittels sterilem Zahnstocher von der Agaroberfläche in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ überführt. Nach Erhitzung für 5 min bei 95°C konnten die somit aufgeschlossenen Zellen als Template eingesetzt werden. Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) wurden von Thermo Scientific (Bonn) bezogen. Der allgemeine PCR-Ansatz mit der *Phusion*-Polymerase setzte sich folgendermaßen zusammen:

Template	x μl
5 x <i>Phusion</i> HF-Puffer	10 μl
Primer 1 (10 pmol/ μl)	1 μl
Primer 2 (10 pmol/ μl)	1 μl
dNTPs (10 mM)	1 μl
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 50 μl
<i>Phusion</i> -Polymerase (2 U/ μl)	0.5 μl

Für PCR-Ansätze mit *DreamTaq*-Polymerase wurden 10 x PCR-Puffer sowie 0.2 μl Enzym (5 U/ μl) verwendet.

Die Ansätze wurden gemischt und die Reaktionen nach folgendem Protokoll gefahren:

1)	98°C	2-4 min	Denaturierung
2)	98°C	20 sec	Denaturierung
3)	x $^\circ\text{C}$	20 sec	<i>annealing</i>
4)	72°C	x sec	<i>extension</i>
Schritt 2-4: 26-32 Zyklen			
5)	72°C	2-5 min	Nachsynthese
6)	8°C	Pause	

Das Temperaturprotokoll wurde dem jeweiligen Primer-Paar (*annealing*-Temperatur) und Template (*extension*-Zeit: 1 min/kb für *DreamTaq*-Polymerase bzw. 15-30 sec/kb für *Phusion*-Polymerase) sowie der verwendeten Polymerase (Denaturierungs-Temperatur: 94°C für die *DreamTaq*-Polymerase / 98°C für die *Phusion*-Polymerase) angepasst.

2.6.9.3. *site-directed mutagenesis-PCR*

Diese Methode diente zur Mutagenese eines oder mehrerer Basenpaare. Wichtig hierfür ist das Vorliegen der zu mutierenden Sequenz in einem relativ kleinen doppelsträngigen, *supergecoilten* Vektor, der aus einem *dam*⁺ - *E. coli*-Stamm isoliert wurde. Je ein Mutagenese-Primer für jeden Strang, die zueinander komplementär sind, diente zum Einführen der gewünschten Mutation. Sie wurden in einer PCR-Reaktion eingesetzt, die dann das gesamte Plasmid mit Insert amplifizierte. Um *secondsite*-Reversionen zu begegnen, wurde die *Phusion*-Polymerase (mit Korrekturlesefunktion) eingesetzt. Wichtig war außerdem nur wenige Zyklen zu durchlaufen (18 Zyklen). Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 10 U *DpnI* für 1 h bei 37°C umgesetzt. Dieses Enzym spaltet spezifisch die parentale, *dam*-methylierte DNA, nicht aber das PCR-Produkt. Der mutierte Vektor konnte dann direkt für Transformations-Experimente eingesetzt werden.

2.6.9.4. *real-time-PCR*

Die Methode der *real-time-PCR* erlaubt eine Quantifizierung der Genexpression. Es wurde eine relative Quantifizierung von viraler Replikon-RNA unter dem Einfluss von siRNA-vermittelter Depletion zellulärer Proteine im Vergleich zu einer *mock*-Depletion durchgeführt. Es wurden spezifische Primer ausgewählt, die zwischen 18 und 22 bp lang waren, am 3'-Ende nicht mehr als drei Basen G oder C besaßen und nicht mit der Base T am 3'-Ende endeten. Das Amplikon hatte eine Länge von ca. 80 – 90 bp.

Die *real-time-PCR* wurde mit dem *QuantiTect™SYBR®Green* PCR-Kit (QIAGEN, Hilden) am LightCycler® 1.5 (Roche, Mannheim) durchgeführt. Dafür wurden 10 µl Gesamtansätze pipettiert:

H ₂ O _{Sigma}	3 µl
2x QuantiTect <i>SYBR Green</i> PCR Master Mix*	5 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	0.5 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	0.5 µl
cDNA-Template (1:3 bis 1:5 verdünnt)	1 µl

* Der 2x QuantiTect *SYBR Green* PCR Master Mix enthält:

- *HotStarTaq™* DNA Polymerase
- QuantiTect *SYBR Green* PCR Puffer
- dNTP-Mix
- *SYBR Green I*
- ROX (passiver interner Referenz-Puffer)
- 5 mM MgCl₂

Die cDNA wurde nach folgendem Programm amplifiziert:

1)	95°C	15 min	Initialer Aktivierungsschritt für die <i>HotStarTaq™</i> DNA-Polymerase
2)	95°C	20 sec	Denaturierung

3)	53°C	20 sec	<i>annealing</i>
4)	72°C	20 sec	<i>extension</i>

Schritt 2 - 4 wurde in 40 Zyklen wiederholt.

Die *annealing*-Temperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der Primer und sollte 5-8°C darunter liegen. Während der Primer-*Extension* wurde die Fluoreszenz gemessen. Diese wurde nach Anregung von *SYBR Green I* emittiert, wenn es an doppelsträngige DNA gebunden hatte. Für jeden PCR-Lauf wurde eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte erstellt, um zu überprüfen, ob spezifische Produkte gebildet wurden oder, ob auch unspezifische Produkte oder Primerdimere auftraten. Dafür wurde am Ende der 40 Zyklen die Fluoreszenz gemessen, während die Temperatur langsam von 60°C auf 95°C erhöht wurde. Bei niedrigen Temperaturen sind die PCR-Produkte aufgrund ihrer höheren spezifischen Schmelztemperaturen doppelsträngig, so dass *SYBR Green I* gebunden und die Fluoreszenz hoch ist. Dagegen sind die PCR-Produkte bei hohen Temperaturen denaturiert, wodurch die Fluoreszenz schnell abnimmt. Das Programm (LightCycler® Software 3.5.3), mit dem die Auswertung vorgenommen wurde, stellte die erste Ableitung der aus den Messungen der Fluoreszenz erhaltenen Kurven dar. Diese erste Ableitung enthielt Peaks bei der spezifischen Schmelztemperatur der PCR-Produkte. Peaks, die bei einer niedrigeren Temperatur auftreten, sind ein Zeichen für die Bildung von Primerdimeren. Peaks, die bei verschiedenen Temperaturen auftreten oder Plateaus besitzen, weisen auf die Bildung unspezifischer Produkte hin.

Für die Analyse der Daten mittels der LightCycler® Software 3.5.3 wird die Fluoreszenz für jeden Zyklus gemessen und die Rohdaten gegen die Zykluszahl aufgetragen. Mit der Amplifikation des PCR-Produkts erhöht sich auch die Fluoreszenz durch gebundenes *SYBR Green I*. Der c_p -Wert ist definiert als der Zyklus, an dem die Fluoreszenz einer Probe signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt und den Übergang in die exponentielle Phase andeutet. Als internes Referenzgen wurde *GAPDH* verwendet, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Die unterschiedliche Expression wurde als n-fache Expression mit Hilfe des $\Delta\Delta c_p$ -Wertes angegeben. Wichtig bei diesem Verfahren ist eine vergleichbare Effizienz der beiden beteiligten PCR-Reaktionen. Die Differenz der c_p -Werte (*GAPDH* und Zielgen) wird gebildet (Δc_p). Anschließend wird die Differenz der Δc_p -Werte der einzelnen Proben (*knockdown*/Kontroll-*knockdown*) gebildet ($\Delta\Delta c_p$ -Wert) und in die Gleichung n-fache Expression (*knockdown*/Kontroll-*knockdown*) = $2^{-\Delta\Delta c_p}$ eingesetzt.

2.6.10. Transformation nach der CaCl₂-Methode

A) Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Mandel und Higa 1970). Die Transformation selbst wurde nach Sambrook et al. (1989)

durchgeführt. Über Nacht wurde eine Vorkultur des zu transformierenden Stammes angezogen. Diese Kultur wurde in frischem LB-Medium (50 ml) 1:100 verdünnt und bei 37°C bis zu einer Optischen Dichte (OD_{600}) von 0.3 kultiviert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und in ein steriles, vorgekühltes Zentrifugenröhrchen überführt. Es erfolgte die Sedimentation durch Zentrifugation für 10 min bei 9200 x g und 4°C in der Hettich-Zentrifuge Rotina 380R (Hettich, Tuttlingen). Das Pellet wurde vorsichtig in 10 ml eiskalter 0.1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 2 ml 0.1 M $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen und bis zur Transformation 1-24 h auf Eis gestellt. Nicht verwendete kompetente Zellen wurden mit Glycerin [Endkonzentration 25 % (v/v)] versetzt und bei -80°C gelagert.

B) Transformation

Je 100 µl $CaCl_2$ -kompetente Zellen (frisch oder auf Eis aufgetaut) wurden mit der DNA (z.B. Ligationsansatz) vorsichtig gemischt und ca. 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem folgenden Hitzeschock von 20 - 60 sec (je nach Bakterienstamm) bei 42°C wurde der Ansatz für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 0.4 ml LB-Medium und Inkubation für 45 min schüttelnd bei 37°C wurde ein Teil des Ansatzes auf Selektionsagar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

C) Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

Die Transformanten wurden auf LB-Platten unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums ausplattiert. Bei rekombinanten Klonen, die durch Test auf α -Komplementation identifiziert werden konnten, wurde den Selektionsplatten IPTG und X-Gal zugegeben. Dem Selektionsprinzip liegt die Aufhebung der α -Komplementation der β -Galaktosidase, durch im Plasmid integrierte Fremd-DNA und der damit verbundene Verlust der Fähigkeit zur Bildung des Indigo-Farbstoffes aus X-Gal (weiße Kolonien), zugrunde.

2.6.11. DNA-Sequenzierung

Nach der Konstruktion neuer Plasmide wurden diese durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung wurde von kommerziellen Anbietern (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) durchgeführt.

2.7. Proteinbiochemische Methoden

2.7.1. Rekombinante Expression und Reinigung von SUMO-Fusionsproteinen

Alle Säulenchromatographien wurden an der FPLC (*fast protein liquid chromatography*)-Anlage ÄKTA Purifier (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) sowie mit Hilfe einer Peristaltikpumpe P1 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) durchgeführt.

2.7.1.1. Rekombinante Herstellung von NS5 des West-Nil-Virus

Die Sequenz von NS5 des West-Nil-Virus wurde über PCR in den Expressionsvektor pETSUMOADAPT kloniert und das resultierende Plasmidkonstrukt (SFri2) in den Expressionsstamm *E. coli* BL21- CodonPlus®-RP transformiert. Die Anzucht einer 50 ml Vorkultur erfolgte in LB-Medium unter Zusatz von Kanamycin und Chloramphenicol über Nacht bei 37°C. Die zu 1 % mit der Vorkultur angeimpften Hauptkulturen wurden bei 37°C ohne Zugabe von Antibiotika bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 1$ angezogen und die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Carl Roth, Karlsruhe) induziert. Nach 4 h Inkubation erfolgte die Zellernte für 20 min bei 6340 x g und 6°C (SORVALL RC 6 Plus, Rotor: SLC 3000). Das Zellpellet wurde direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Das Zellpellet wurde auf Eis in 20 mM Natriumphosphat, 0.5 M NaCl, 30 mM Imidazol, 10 % Glycerin (v/v), pH 7.5 resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 0.5 mg/ml Lysozym (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) erfolgte eine Inkubation für 2 h auf Eis. Die Zellen wurden mit der *french press* (Gaulin Homogenisator, APV Homogenisator GmbH, Lübeck) aufgeschlossen und anschließend bei 6°C und 43000 x g für 1.5 h zentrifugiert (SORVALL RC 6 Plus, Rotor: SS34). Der lösliche Überstand wurde über eine Nickel-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (HisTrap™ HP, GE Healthcare, Uppsala, Schweden).

NiNTA: Puffer A	20 mM Natriumphosphat 0.5 M NaCl 30 mM Imidazol 10 % Glycerin (v/v) pH 7.5	Puffer B	20 mM Natriumphosphat 0.5 M NaCl 500 mM Imidazol 10 % Glycerin (v/v) pH 7.5
-----------------	--	----------	---

Das durch steigende Imidazolkonzentration eluierte Fusionsprotein SUMO-NS5 wurde gegen 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 10 % Glycerin (v/v), 5 mM DTT, pH 7.6 dialysiert und anschließend mit 1 % (v/v) SUMO-Protease für 0.5 h auf Eis gespalten. Die Salzkonzentration wurde auf 130 mM NaCl gesenkt und das native NS5 einer Poly(U)-Sephrose-Affinitätschromatographie (PolyU-Sephrose 4B, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) unterzogen.

Poly(U)-Säule: Puffer A	50 mM Tris-HCl 130 mM NaCl 10 % Glycerin (v/v) 5 mM DTT pH 7.6	Puffer B	50 mM Tris-HCl 1 M NaCl 10 % Glycerin (v/v) 5 mM DTT pH 7.6
-------------------------	--	----------	---

Die Elution erfolgte durch kontinuierliches Erhöhen der NaCl-Konzentration. Das gereinigte NS5 wurde anschließend über eine Gelfiltration (HiLoad™ 16/600 Superdex 200™, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) aufgetrennt (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin (v/v), pH 7.6) und mit einer Vivaspin-Konzentrationseinheit (Sartorius, Göttingen, Ausschlussgröße 50 kDa) konzentriert. Die finale Lagerung des Proteins erfolgte bei -20°C in 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 40 % Glycerin (v/v), pH 7.6.

2.7.1.2. Rekombinante Herstellung von AUF1 Isoform p45

Die für die Isoform p45 kodierende cDNA von *HNRNPD* wurde über PCR in den Expressionsvektor pETSUMOadapt kloniert und das resultierende Plasmidkonstrukt (SFri4) in den Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus®-RP transformiert. Die Anzucht, Zellernte und der Zellaufschluss erfolgte wie unter 2.7.1.1. für NS5 beschrieben, außer, dass das Zellpellet in 20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 30 mM Imidazol, 10 % Glycerin, pH 7.5 resuspendiert wurde. Der lösliche Überstand wurde über eine Nickel-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (HisTrap™ HP, GE Healthcare, Uppsala, Schweden).

NiNTA: Puffer A	20 mM Tris-HCl	Puffer B	20 mM Tris-HCl
	1 M NaCl		0.5 M NaCl
	30 mM Imidazol		500 mM Imidazol
	10 % Glycerin (v/v)		10 % Glycerin (v/v)
	pH 7.5		pH 7.5

Das durch steigende Imidazolkonzentration eluierte Fusionsprotein SUMO-AUF1p45 wurde 1:2 mit 20 mM Tris-HCl, 1 mM TCEP, pH 7.6 verdünnt und anschließend mit 1 % (v/v) SUMO-Protease für 1 h bei 4°C gespalten. Es wurde nochmals die Salzkonzentration durch eine 1:2 Verdünnung mit 20 mM Tris-HCl, 1 mM TCEP, pH 7.6 gesenkt und das native AUF1p45 einer Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie (HiTrap Heparin HP, 5 ml, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) unterzogen.

Heparin-Säule:	Puffer A	20 mM Tris-HCl	Puffer B	20 mM Tris-HCl
		100 mM NaCl		1 M NaCl
		1 mM TCEP		1 mM TCEP
		pH 7.6		pH 7.6

Die Elution erfolgte durch kontinuierliches Erhöhen der NaCl-Konzentration. Das gereinigte AUF1p45 wurde anschließend über eine Gelfiltration (HiLoad™ 16/600 Superdex 200™, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) aufgetrennt (20 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 1 mM TCEP, pH 7.6), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C in Aliquots gelagert.

2.7.1.3. Rekombinante Herstellung von PRMT1

Die cDNAs von *PRMT1*, die die Isoformen v1, v2, v3 und v5 kodieren, wurden über PCR in den Expressionsvektor pETSUMOadapt kloniert und die resultierenden Plasmidkonstrukte (SFri48-51) in den Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus®-RP transformiert. Die Anzucht einer 50 ml Vorkultur erfolgte in LB-Medium unter Zusatz von Kanamycin und Chloramphenicol über Nacht bei 37°C. Die zu 1 % mit der Vorkultur angeimpften Hauptkulturen wurden bei 37°C ohne Zugabe von Antibiotika bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0.4$ angezogen und die Expression durch Zugabe von 0.4 mM IPTG (Carl Roth, Karlsruhe) induziert. Nach Inkubation über Nacht bei 22°C erfolgte die Zellernte für 20 min bei 6340 x g und 6°C (SORVALL RC 6 Plus, Rotor: SLC 3000). Das Zellpellet wurde direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Reinigung wurde für alle Isoformen von PRMT1 analog durchgeführt.

Das Zellpellet wurde auf Eis in 20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 30 mM Imidazol, 10 % Glycerin (v/v), pH 7.5 resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 0.5 mg/ml Lysozym (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) erfolgte eine Inkubation für 2 h auf Eis. Die Zellen wurden mit der *french press* (Gaulin Homogenisator, APV Homogenisator GmbH, Lübeck) aufgeschlossen und anschließend bei 6°C und 43000 x g für 1.5 h zentrifugiert (SORVALL RC 6 Plus, Rotor: SS34). Der lösliche Überstand wurde über eine Nickel-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (HisTrap™ HP, GE Healthcare, Uppsala, Schweden).

NiNTA: Puffer A	20 mM Tris-HCl 1 M NaCl 30 mM Imidazol 10 % Glycerin (v/v) pH 7.5	Puffer B	20 mM Tris-HCl 0.5 M NaCl 500 mM Imidazol 10 % Glycerin (v/v) pH 7.5
-----------------	---	----------	--

Das durch steigende Imidazolkonzentration eluierte Fusionsprotein SUMO-PRMT1 wurde 1:2 mit 20 mM Tris-HCl, 1 mM TCEP, pH 7.6 verdünnt und anschließend mit 1 % (v/v) SUMO-Protease (AG Behrens) für 1 h bei 4°C gespalten. Die Salzkonzentration wurde durch eine 1:2 Verdünnung mit 20 mM Tris-HCl, 1 mM TCEP, pH 7.6 gesenkt und das native PRMT1 einer Anionenaustausch-Chromatographie (Resource Q, 6 ml, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) unterzogen.

Resource Q: Puffer A	20 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 1 mM DTT 5 % Glycerin (v/v) pH 7.6	Puffer B	20 mM Tris-HCl 1 M NaCl 1 mM DTT 5 % Glycerin (v/v) pH 7.6
----------------------	---	----------	--

Die Elution erfolgte durch kontinuierliches Erhöhen der NaCl-Konzentration. Das gereinigte PRMT1 wurde anschließend gegen 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 5 % Glycerin (v/v), 1 mM TCEP, pH 7.6 dialysiert und mit einer Vivaspin-Konzentrationseinheit (Sartorius, Göttingen, Ausschlussgröße 30 kDa) konzentriert, in flüssigem Stickstoff in Aliquots eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.7.1.4. Rekombinante Herstellung von methyliertem AUF1 Isoform p45 (AUF1p45^{aDMA})

Zur Herstellung größerer Mengen an methyliertem AUF1p45 wurde *upstream* von *SMT3-HNRNPD* (Isoform p45, Plasmid SFri4) die cDNA des *PRMT1*-Gens (Isoform v1) inseriert. Dies ermöglichte die Transkription einer bicistronischen mRNA und die Translation beider Proteine in einem äquimolaren Verhältnis in *E. coli*-Zellen. Das erhaltene Plasmidkonstrukt (SFri57) wurde in den Expressionsstamm *E. coli* BL21- CodonPlus®- RP transformiert. Die Anzucht einer 50 ml Vorkultur erfolgte in LB-Medium unter Zusatz von Kanamycin und Chloramphenicol über Nacht bei 37°C. Die zu 1 % mit der Vorkultur angeimpften Hauptkulturen wurden bei 30°C ohne Zugabe von Antibiotika bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0.5 angezogen und die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Carl Roth, Karlsruhe) induziert. Nach einer Inkubation für 4 h bei 30°C erfolgte die Zugabe von 10 µg/ml Erythromycin zur Inhibition der Translation und es wurde für weitere 2 h bei 30°C inkubiert. Die Zellernte, der Zellaufschluss sowie die Reinigung von AUF1p45^{aDMA} erfolgte wie unter 2.7.1.2. beschrieben, außer, dass die abschließende Gelfiltration entfiel und die Elutionsfraktionen der Heparin-Sepharose mit einer Vivaspin-Konzentrationseinheit konzentriert und gleichzeitig in 20 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 1 mM TCEP, pH 7.6 umgepuffert wurden. AUF1p45^{aDMA} wurde in flüssigem Stickstoff in Aliquots eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.7.1.5. Rekombinante Herstellung einer pseudophosphorylierten Variante von AUF1p45

Durch *site-directed mutagenesis*-PCR wurden zwei Pseudophosphomutationen in das AUF1p45-Gen (*HNRNPD*, Isoform p45, kloniert in Plasmid SFri4) eingefügt. Dies führte zum Austausch der Aminosäure Serin an Position 190 zu Aspartat (S₁₉₀E) und Threonin an Position 193 zu Glutamat (T₁₉₃D). Die rekombinante Herstellung dieser Variante erfolgte wie unter 2.7.1.2. beschrieben.

2.7.2. Reinigung von RNA-Bindeproteinen aus HeLa-Zellen

Um neue Wirtsfaktoren zu identifizieren, die in der Replikation des West-Nil-Virus involviert sind, kam eine Poly(I):(C)-Säulenchromatographie (Liao et al. 1998) zum Einsatz. Mit Hilfe dieser Poly-Inosin/Poly-Cytosin konjugierten Sepharose-*beads* können spezifisch RNA-bindende Proteine aus Zellextrakten angereichert werden. Um eine höhere Reinheit der Proteinfractionen zu erhalten, wurden weitere Säulenchromatographien einbezogen. Die

stimulierende Aktivität dieser Proteinfractionen wurde parallel mit Hilfe des *in vitro* RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Assays untersucht. Im Folgenden ist das Reinigungsschema aus HeLa-Zellen beschrieben.

Cytoplasmatische Extrakte und Kernextrakte aus 2.5×10^9 HeLa-Zellen (Cilbiotech, Bergen, Belgien) wurden nach (Dignam et al. 1983) präpariert. Die Extrakte wurden gegen 20 mM HEPES-NaOH, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.01 % Tween 20, pH 7.6 dialysiert und präzipitierte Proteine bei 4°C, 43000 x g für 1 h zentrifugiert (SORVALL RC 6 Plus, Rotor: SS34). Der Überstand wurde einer Anionenaustausch-Chromatographie (Resource Q, 6 ml, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) unterzogen.

Resource Q:	Puffer A	20 mM HEPES-NaOH 100 mM KCl 3 mM MgCl ₂ 0.01 % Tween 20 pH 7.6	Puffer B	20 mM HEPES-NaOH 100 mM KCl 1 M NaCl 3 mM MgCl ₂ 0.01 % Tween 20 pH 7.6
-------------	----------	---	----------	---

Die Salzkonzentration des Durchfluss' der Resource Q wurde auf etwa 200 mM KCl eingestellt und über eine Poly(I):(C)-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Elution erfolgte durch kontinuierliches Erhöhen der NaCl-Konzentration.

Poly(I):(C)-Säule:

Puffer A	20 mM HEPES-NaOH 200 mM KCl 3 mM MgCl ₂ 0.01 % Tween 20 pH 7.6	Puffer B	20 mM HEPES-NaOH 100 mM KCl 2 M NaCl 3 mM MgCl ₂ 0.01 % Tween 20 pH 7.6
----------	---	----------	---

Proteinfractionen mit der höchsten stimulierenden Aktivität im *in vitro* RdRp-Assay wurden vereinigt, auf etwa 50 mM NaCl verdünnt und über eine Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie (HiTrap Heparin HP, 1 ml, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) weiter aufgereinigt. Die Elution erfolgte durch kontinuierliches Erhöhen der NaCl-Konzentration.

Heparin-Säule:

Puffer A	20 mM HEPES-NaOH 50 mM KCl 3 mM MgCl ₂ 0.01 % Tween 20 pH 7.6	Puffer B	20 mM HEPES-NaOH 50 mM KCl 1 M NaCl 3 mM MgCl ₂ 0.01 % Tween 20 pH 7.6
----------	--	----------	--

Der Durchfluss, welcher den Großteil der stimulierenden Aktivität enthielt, wurde mit einer Vivaspin-Konzentrationseinheit (Sartorius, Göttingen, Ausschlussvolumen 5 kDa) konzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die so gewonnenen Proteine wurden anschließend durch Massenspektrometrie analysiert.

2.7.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Zellextrakten wurde am Photospektrometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt (Bradford 1976). Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit einer Eichgerade, die durch Verdünnung einer 10 mg/ml-BSA-Stammlösung (NEB, Ipswich, USA), erstellt wurde.

Die Konzentration von rekombinant gereinigten Proteinen wurde am UV/VIS Spektrometer V-550 (JASCO, Groß-Umstadt) bestimmt. Mittels Lambert-Beerschem Gesetz konnte die Proteinkonzentration nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

E = Absorption bei 280 nm

ϵ = Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

c = Proteinkonzentration (M)

d = optische Weglänge (cm)

2.7.4. Konzentrierung von Proteinen

Die Konzentrierung von Proteinen wurde mittels einer VivaSpin-Konzentrationseinheit (Sartorius, Göttingen, Ausschlussvolumen 5, 30 bzw. 50 kDa) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.7.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die analytische und präparative Auftrennung von Proteinen wurde ein diskontinuierliches Gelsystem nach (Laemmli 1970) verwendet. Die Elektrophorese wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die Gellösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Trenngel: 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8
 10 % Acrylamid (Rotiphorese 30, Carl Roth, Karlsruhe)
 0.1 % (w/v) SDS
 0.125 % (w/v) APS
 0.25 % (v/v) TEMED

Sammelgel:	62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8 4 % Acrylamid (Rotiphorese 30, Carl Roth, Karlsruhe) 0.05 % (w/v) SDS 0.07 % (w/v) APS 0.3 % (v/v) TEMED
Elektrophoresepuffer:	25mM Tris 0.19 M Glycin 0.1 % (w/v) SDS pH 8.3

Die Proben wurden mit 2 x SDS-Ladepuffer [10 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20 % (v/v) Glycerin, 0.01 % (w/v) Bromphenolblau, 6 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol] versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei maximaler Spannung und bei einer Stromstärke von 25-50 mA (je nach Gelgröße, *Electrophoresis power supply* EC 135-90, Thermo Scientific, Bonn) pro Gel durchgeführt.

2.7.6. Färbung mit Coomassie

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden für mindestens 15 min leicht schwenkend in Coomassie-Färbelösung [0.2 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250, 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure] inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes durch Entfärberlösung [30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure].

2.7.7. Silberfärbung

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in 60 ml Fixierlösung [50 % (v/v) Aceton, 1.25 % (w/v) Trichloressigsäure] für 5 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal (5 sec, 5 min, 5 sec) in H_2O_{bidest} gewaschen und für 5 min in 60 ml 50 % (v/v) Aceton inkubiert. Es folgte eine Vorbehandlung in $Na_2S_2O_3$ (20 mg in 60 ml H_2O_{bidest}) für 1 min, bevor das Gel für 8 min imprägniert wurde [160 mg $AgNO_3$ und 600 μ l 37%iges (v/v) Formaldehyd in 60 ml H_2O_{bidest}]. Es wurde dreimal 5 sec in H_2O_{bidest} gewaschen. Es schloss sich die Entwicklung [1.2 g Na_2CO_3 , 2 mg $Na_2S_2O_3$ und 25 μ l 37%iges (v/v) Formaldehyd in 60 ml H_2O_{bidest}] an. Sobald die Proteinbanden die gewünschte Intensität hatten, wurde die Färbereaktion durch Zugabe von 5%iger Essigsäure gestoppt. Anschließend konnte das Gel in H_2O_{bidest} aufbewahrt oder getrocknet werden.

2.7.8. Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation wurde mit einer BECKMAN Optima XL-A, einem Rotor An50Ti und Doppelsektorzellen (Beckman Coulter, Brea, USA) durchgeführt. Für das spezifische Partikelvolumen wurde 0.73 ml/g angenommen. Der Sedimentations-

Gleichgewichtslauf bei 12000 rpm und 20°C erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 5 µM in 20 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 1 mM TCEP, pH = 7.6. Mit Hilfe der Svedberg-Gleichung wurde das apparente Molekulargewicht der Proteinlösung bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software von Beckman Coulter durch PD Dr. Hauke Lilie, Institut für Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg.

2.7.9. Präparation von Gesamtzellextrakt

Nach erfolgter Trypsinierung und Sedimentation der Zellen bei 380 x g für 5 min (Mikro 200, Hettich, Tuttlingen) wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen und anschließend in RIPA-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 14000 x g für 15 min bei 4°C. Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Zelllysats erfolgte photometrisch nach (Bradford 1976) wie unter 2.7.3. beschrieben.

RIPA-Puffer: 50 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
1 % (v/v) NP-40
0.5 % (w/v) Natriumdesoxycholat
0.1 % (w/v) SDS
pH 8.0

2.7.10. Präparation von cytoplasmatischen Zellextrakt

Nach erfolgter Trypsinierung und Sedimentation der Zellen bei 380 x g für 5 min (Mikro 200, Hettich, Tuttlingen) wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in Zelllyse-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 380 x g für 5 min bei 4°C. Die Bestimmung der Proteinkonzentration des cytoplasmatischen Extraktes erfolgte photometrisch nach (Bradford 1976) wie unter 2.7.3. beschrieben.

Zelllyse-Puffer: 50 mM Tris-HCl
5 mM MgCl₂
100 mM NaCl
1 % (v/v) NP-40
pH 8.0

2.7.11. Western Blot

Zur spezifischen Detektion bestimmter Proteine wurde ein Western Blot durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe mittels einer SDS-PAGE erfolgte deren elektrophoretischer Transfer auf eine Nitrocellulosemembran. Die Membran (Protran[®], Whatman GmbH, Dassel) wurde auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt.

Ebenso wurden vier Lagen Whatman-Papier (GB005, Whatman GmbH, Dassel) zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. In der Blotapparatur (V10SDB und V20SDB, biostep GmbH, Jahnsdorf) wurden zwei Lagen Whatman-Papier, die Nitrocellulosemembran, das Proteingel und zwei weitere Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei übereinandergelegt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei konstanter Stromstärke (0.8 mA/cm^2 Gelfläche) für 1 - 3 h. Durch eine Ponceau-S-Färbung der Proteine auf der Membran konnte die *blotting*-Effizienz abgeschätzt werden. Zur Reduktion unspezifischer Interaktionen wurde die Membran mit 5 % Milchpulver (Carl Roth, Karlsruhe) in TN-Tween-Puffer für mindestens 30 min inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (angemessen verdünnt mit TN-Tween-Puffer/5 % Milchpulver) für 1 - 2 h. Es wurde dreimal für 5 min mit TN-Tween-Puffer gewaschen, bevor ein mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelter sekundärer Antikörper (angemessen verdünnt mit TN-Tween-Puffer) mit der Membran für 1 h inkubiert wurde. Danach wurde nochmals dreimal für 5 min mit TN-Tween-Puffer gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einer Chemilumineszenzreaktion. Die am sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase setzt dabei einen Farbstoff (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Bonn) um, wobei Lichtenergie frei wird und von einem Röntgenfilm (CL-XPosureTM, Thermo Scientific, Bonn) detektiert werden kann.

Transferpuffer: 48 mM Tris
 39 mM Glycin
 1.3 mM SDS
 20 % (v/v) Methanol

TN-Tween: 20 mM Tris-HCl
 150 mM NaCl
 0.05 % (v/v) Tween 20
 pH 7.5

Ponceau-S-Lösung: 0.5 % (w/v) Ponceau S
 1 % (v/v) Essigsäure

2.7.12. Immunfluoreszenz

Die Methode der Immunfluoreszenz wurde angewendet, um Zellen zu identifizieren, in denen eine Replikation der West-Nil-Virus-RNA stattfindet. Die Anzucht transfizierter Zellen erfolgte auf sterilen Deckgläschen. Zur Fixierung der Zellen wurde eine Inkubation mit Formalin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 20 min bei RT durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und mit 0.5 % Triton X-100/PBS für 5 min permeabilisiert. Um unspezifische Bindungen zu minimieren erfolgte eine Inkubation

mit 1 % FCS/PBS für 1 h bei RT. Der primäre Antikörper Anti-NS5 wurde 1:2000 in 1 % FCS/PBS verdünnt und für 1 h bei RT mit den Zellen inkubiert. Es wurde dreimal mit 1 % FCS/PBS gewaschen und anschließend erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörpers Alexa Fluor® 488 *goat* Anti-*rabbit* (life technologies, Darmstadt, Verdünnung 1:500 in 1 % FCS/PBS) für 1 h bei RT unter Lichtausschluss. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurde das Deckgläschen mit den Zellen nach unten in ProLong® Gold *Antifade Reagent with* DAPI (life technologies, Darmstadt) auf einem Objektträger platziert. Replizierende Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena) sichtbar gemacht. Die Replikationseffizienz wurde durch das Verhältnis replizierender zu nicht-replizierenden Zellen bestimmt.

2.7.13. Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen NS5

Polyklonale Antikörper gegen NS5 wurden durch die Firma Eurogentecs (Seraing, Belgien) generiert. Dazu wurde 0.4 mg NS5-Protein in vier *Boosts* über einen Zeitraum von vier Wochen einem Kaninchen gespritzt. Dann wurde das Tier ausgeblutet und die IgG-Fraktion gewonnen.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Name	Anwendung	Anbieter	Bestellnummer
Primäre Antikörper			
Anti-NS5	WB, IF	Eurogentecs, Seraing, Belgien	-
Anti-FLAG	WB, IP	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	200472-21
Anti-GAPDH	WB	Santa-Cruz	sc-47724
Anti-AUF1	WB	Millipore, Billerica, USA	07-260
Anti-AUF1	WB	Abcam, Cambridge, UK	ab50692
Anti-hnRNPH1	WB	AbD Serotec, Oxford, UK	AHP882
Anti-PRMT1	WB	Millipore, Billerica, USA	07-404
Anti-Vinculin	WB	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	V9131
Anti-aDMA (ASYM24)	WB	Millipore, Billerica, USA	07-414
Sekundäre Antikörper			
<i>donkey</i> Anti- <i>rabbit</i> IgG-HRP	WB	GE Healthcare	NA934V
<i>sheep</i> Anti- <i>mouse</i> IgG-HRP	WB	GE Healthcare	NXA931
Alexa Fluor® 488 <i>goat</i> Anti- <i>rabbit</i>	IF	life technologies, Darmstadt	A-11008

2.7.14. FLAG-Immunpräzipitation

Die cDNAs des AUF1-Gens, die die Isoformen p37, p40, p42 und p45 kodieren, wurden über Reverse Transkription aus Gesamt-RNA von Huh7-Zellen generiert und in den eukaryotischen Expressionsvektor pCDNATM5/TO (life technologies, Darmstadt) kloniert. Der N-terminale FLAG-tag wurde über den *forward* Primer eingefügt. Die resultierenden Plasmidkonstrukte (SFri43-46) wurden, wie unter 2.4.2. beschrieben, in Huh7-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, das Zellpellet mit PBS gewaschen, in Zellyse-Puffer [20 mM HEPES-NaOH, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 % (v/v) NP-40, 1 mM PMSF, pH 7.9] resuspendiert und für 30 min bei 4°C rotierend inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 12000 g für 10 min bei 4°C. Der Überstand wurde mit ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in Anwesenheit von 0.1 mg/ml RNase A bei 4°C über Nacht inkubiert. Die immunpräzipitierten FLAG-Fusionsproteine wurden sechsmal mit 500 µl Puffer [20 mM HEPES-NaOH, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) NP-40, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, pH 7.6] gewaschen und anschließend mit 500 ng/µl 3X FLAG[®]-Peptid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in 20 mM HEPES-NaOH, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.01 % Tween 20, pH 7.6 für 1 h auf Eis inkubiert. Die eluierten FLAG-Fusionsproteine wurden durch Zentrifugation für 1 min bei 5000 g und 4°C von der ANTI-FLAG[®] M2-Agarose getrennt. Die Immunpräzipitation wurde durch Western Blot mit ANTI-FLAG-Antikörper und SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung bestätigt. Die so gewonnenen FLAG-getaggten AUF1-Isoformen konnten nun auf Aktivität im *in vitro* RNA-abhängigen RNA-Polymerase Assay untersucht werden.

2.7.15. Massenspektrometrie

Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden für 45 min bei 50°C mit 10 mM DTT in 100 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift für 45 min mit 55 mM Iodacetamid in 100 mM Ammoniumbicarbonat unter Ausschluss von Licht um Cysteine zu modifizieren. Danach wurden die Gelstücke dreimal mit Wasser, zweimal mit 10 mM Ammoniumbicarbonat und abschließend einmal mit 10 mM Ammoniumbicarbonat in 50 % Acetonitril gewaschen. Nach der Trocknung der Gelstücke unter N₂-Begasung wurden diese in 20 µl einer 10 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung (pH 8.0) gelöst und anschließend mittels Trypsin (Promega, Madison, USA) über Nacht bei 37°C verdaut. 1 µl des Verdaus wurde auf den Matrix-layer getropft. Als Matrix wurde eine gesättigte 2,5-Dihydroxybenzoesäure/Methanol-Lösung verwendet. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte an einem Ultraflex-II TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) mit einer MALDI-Quelle. Für die Kalibrierung des Peptid-*fingerprints* wurde ein Kalibrierungsstandard von Bruker Daltonics verwendet. Zur Auswertung und Dokumentation wurde die Software Flex Control 2.4, Flex Analysis 2.4 und Biotools 3.0 genutzt. Die methylierten Peptide wurden mit

Hilfe der LIFT-Methode fragmentiert (Suckau et al. 2003). Alle Arbeitsschritte in diesem Absatz wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Schierhorn durchgeführt.

Die unter 2.7.2. gereinigten RNA-Bindeproteine aus HeLa-Zellen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Ruppert (Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg, Core Facility for Mass Spectrometry and Proteomics, Heidelberg) mittels Massenspektrometrie analysiert. Dabei wurde die finale Proteinfraction mit 1 Vol 20%iger Trichloressigsäure präzipitiert, das Pellet mit Aceton gewaschen und in SDS-Ladepuffer resuspendiert. Die Proteine wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, die Spur in 12 Gelstücke geteilt und mittels MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie identifiziert.

2.8. Enzymologische Methoden

2.8.1. *in vitro* RNA-abhängiger RNA-Polymerase-Assay (RdRp-Assay)

Der *in vitro* RdRp-Assay wurde in einem Gesamtvolumen von 40 µl durchgeführt. Als Inkubationspuffer diente 50 mM HEPES-NaOH, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM MnCl₂, 1 mM DTT, pH 8.0. Weiterhin enthielt der Ansatz je 500 µM ATP, GTP, UTP, 0.1 µM rCTP, 10 µCi [α -³²P] CTP, 10 nM Template RNA und 100 nM rekombinant gereinigtes NS5. Die Reaktion wurde für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Um den Einfluss von gereinigten Proteinfractionen aus Zellextrakten oder rekombinanten Proteinen auf die Polymerase-reaktion zu untersuchen, wurden die jeweiligen Proteine mit der RNA für 1 bis 30 min prä-inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von NS5 gestartet. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz mit H₂O_{Sigma} auf 200 µl aufgefüllt und mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Der wässrige Überstand wurde mit 2.36 Vol 100%igem Ethanol und 0.18 Vol 6 M Ammoniumacetat für 30 min bei -20°C gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 16000 x g (Mikro 200, Hettich, Tuttlingen). Das RNA-Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet, in 20 µl Ladepuffer (siehe 2.5.6.) resuspendiert und für 3 min bei 95°C erhitzt. Die Auftrennung der RNA-Produkte durch Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte wie unter 2.5.6. beschrieben. Die getrockneten Polyacrylamidgele wurden unter *Storage-Phosphor-Screens* (GE Healthcare) für 16 - 24 h exponiert. Mit Hilfe eines *Phosphor Imager* (Molecular Dynamics, STORM 860) konnten die Signale gemessen und die jeweiligen Bandenintensitäten über das Softwareprogramm *Image Quant 5.0* (GE Healthcare) ausgewertet werden. Dabei wurde die Kontrollreaktion (keine Zugabe von Protein, nur Zugabe des Lagerungspuffers des Proteins) als Faktor 1 festgelegt.

2.8.1.1. RNase-Spaltung des RdRp-Produkts

Zum Nachweis der *de novo*-Initiation durch NS5 wurde das RNA-Produkt mit RNase A bzw. RNase T₁ behandelt. Dazu wurde ein *in vitro* RdRp-Assay wie unter 2.8.1. beschrieben durchgeführt, das RNA-Pellet in 30 µl H₂O_{Sigma} resuspendiert und mit 7 U RNase A und 3.5 U RNase T₁ (Thermo Scientific, Bonn) für 30 min bei 30°C umgesetzt. Dabei wurde eine Reaktion ohne Zugabe von NaCl und eine Reaktion in Anwesenheit von 300 mM NaCl angesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6 mM Tris-HCl, 30 mM EDTA, 0.12 % (w/v) SDS, pH 8.0 beendet und die RNA wurde wie unter 2.8.1. beschrieben aufgereinigt und analysiert.

2.8.2. Radioaktive *in vitro* Methylierung von Protein

Der Reaktionsansatz (100 µl) enthielt 50 mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.2 mg/ml BSA, 0.5 mM DTT. Für die *in vitro* Methylierung von 1.2 µM AUF1p45 bzw. 1 µM hnRNPH1 wurden 0.5 µM PRMT1 eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 µM [¹⁴C]adenosylmethionine (60 mCi/mmol, GE Healthcare) gestartet und bei 30°C durchgeführt. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden je 10 µl entnommen, mit 1 Vol 2 x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wie unter 2.7.5. beschrieben aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend dreimal für je 10 min in Fixierlösung (10 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Methanol) inkubiert und anschließend unter Vakuum getrocknet. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte mit *Storage-Phosphor-Screens* (GE Healthcare). Mit Hilfe eines *Phosphor Imager* (Molecular Dynamics, STORM 860) konnten die Signale gemessen und die jeweiligen Bandenintensitäten über das Softwareprogramm *Image Quant 5.0* (GE Healthcare) ausgewertet werden.

2.8.3. Messung von Renilla-Luziferase Aktivität

Dieser Assay diente der Bestimmung der Translations- bzw. Replikationseffizienz viraler Replikon-RNAs nach siRNA-vermittelter Depletion von AUF1 in Huh7-Zellen. Des Weiteren konnte die Auswirkung von Mutationen, die in die Replikon-RNA eingeführt wurden, untersucht werden. Das Renilla-Luziferase-Gen wurde in die *AflII*-Schnittstelle von pWNVRepHDVr eingefügt. Nach Transfektion dieses Renilla-Replikons konnte die Renilla-Luziferase somit als Teil des Polyproteins translatiert werden. Die gemessene Renilla-Luziferase-Aktivität 3 - 4 h und 24 - 72 h nach der Transfektion repräsentierte die Translation bzw. die Replikation der viralen Replikon-RNA. Transfizierte Zellen wurden zu frühen Zeitpunkten durch Zentrifugation und zu späten Zeitpunkten durch Trypsinierung geerntet. Die Quantifizierung der Renilla-Luziferase-Aktivität erfolgte mit dem *Renilla Luciferase Assay System* nach Anweisung des Herstellers (Promega, Madison, USA). Die Renilla-Luziferase-

Aktivität wurde sofort nach Gewinnung des Zellextrakts am Luminometer (Berthold Detection Systems, Pforzheim) gemessen, indem 2 µl Zellextrakt mit 20 µl des Assay-Reagenz gemischt wurden.

2.9. Filter-Bindungs-Assay zur Bestimmung von RNA-Protein-Interaktionen

Ein Filter-Bindungs-Assay (FBA) ist eine Methode, um Affinitäten zwischen Protein und RNA bzw. Protein und DNA zu bestimmen. Die Grundlage dieser Methode ist die Bindung von Proteinen an Nitrocellulose, welche negativ geladen ist. Nukleinsäuren mit ihrer negativen Ladung binden allein nicht an Nitrocellulose. Bindet ein Protein Nukleinsäuren, dann wird dieser Komplex von der Nitrocellulose zurückgehalten. Bei konstanter Nukleinsäurekonzentration und ansteigender Proteinkonzentration kann dann mit Hilfe des FBA die Affinität zwischen beiden Molekülen gemessen werden.

Radioaktiv markierte RNA wurde wie unter 2.5.3. beschrieben hergestellt. Der Reaktionsansatz enthielt 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 nM ³²P-radioaktiv-markierte RNA und ansteigende Konzentrationen von Protein in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Der Ansatz wurde für 30 min bei RT inkubiert. Die Nitrocellulosemembran (Protran[®], Whatman GmbH, Dassel) wurde in einer Dot-Blot Apparatur eingesetzt und mit 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ equilibriert. Der Ansatz wurde auf die Membran gegeben und mittels Vakuum wurde die Flüssigkeit durch die Membran gesaugt. Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend luftgetrocknet und unter *Storage-Phosphor-Screens* (GE Amersham Bioscience) für 16 - 24 h exponiert. Die radioaktiven Signale wurden mit Hilfe eines *Phosphor Imager* (Molecular Dynamics, STORM 860) gemessen und Intensitäten über das Softwareprogramm *Image Quant 5.0* (GE Healthcare) ausgewertet. Die Intensitäten wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und mit folgender Gleichung mit KaleidaGraph[™] (Synergy software) gefittet:

$$S = \left[\frac{(b + c + K_D) - \sqrt{(b + c + K_D)^2 - 4 \cdot b \cdot c}}{2 \cdot b} \right] \cdot S_{\max} + S_{\text{offset}}$$

(Gleichung 1)

S - radioaktives Signal, b - Konzentration der RNA, c - Konzentration des Proteins, K_D - Dissoziationskonstante, S_{max} - maximale Signalamplitude, S_{offset} - *offset*

2.10. Fluorimetrischer RNA-RNA-Interaktions-Assay

Der fluorimetrische RNA-RNA-Interaktionsassay ist der Zyklisierungs-Reaktion der flaviviralen RNA angelehnt. Dabei kommt es aufgrund komplementärer RNA-Sequenzen zu einer Umstrukturierung der 5'UTR bzw. der 3'UTR. Die RNA-Oligonukleotide 5'-Cy5-AGAUCUUCUGCUCUGCACAAUGGUGCGAGAACACAGGAUCU-3'BHQ (3'SL^{trunc}) und 5' -UCUUAGCACGAAGAUCU -3' (5'UAR) wurden von IBA (Göttingen, Germany) bezogen. Die fluoreszenzspektroskopischen RNA-RNA-Interaktionsstudien wurden an einem FluoroMax-4 Spektrofluorometer (Jobin Yvon, Frankreich) bei 22°C durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 643 nm, die Emission bei 667 nm, jeweils mit 5 nm Spaltenbreite und einer Messung der Fluoreszenzintensität jede Sekunde. Es wurden 10 nM 5'-Cy5-markierte 3'SL^{trunc}-RNA mit ansteigenden Konzentrationen von AUF1p45, AUF1p45 S₁₉₀E/ T₁₉₃D bzw. AUF1p45^{adMA} in Assay-Puffer (50 mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂) für 100 s inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 nM unmarkierter 5'UAR-RNA und die Reaktion wurde für weitere 400 s verfolgt. Die normalisierten Fluoreszenzsignale wurden gegen die Zeit aufgetragen und nach einer Reaktion 1. Ordnung (ohne Protein, Gleichung 2) bzw. nach einer Reaktion 2. Ordnung (in Anwesenheit von Protein, Gleichung 3) mit KaleidaGraphTM (Synergy software) gefittet:

1. Ordnung
$$\Delta F = F_{\text{offset}} + F_{\text{max}} * (1 - \exp(-k_{\text{obs}} * t))$$

(Gleichung 2)

2. Ordnung
$$\Delta F = F_{\text{offset}} + F_{\text{max}} * (1 - 1/(k_{\text{obs}} * t + 1))$$

(Gleichung 3)

ΔF - Änderung der relativen Fluoreszenzamplitude, F_{offset} - Fluoreszenzintensität am Startpunkt der Reaktion, F_{max} - maximale Signalamplitude, k_{obs} - beobachtete Geschwindigkeitskonstante, t - Zeit

2.11. *bandshift*-Assay

Die *bandshift*-Methode diente der Detektion von RNA-RNA-Interaktionen. Die RNAs wurden wie unter 2.5.2. und 2.5.3. beschrieben hergestellt. Der Reaktionsansatz enthielt 5 mM HEPES-NaOH, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.9 in einem Gesamtvolumen von 20 μ l. Für die Analyse der RNA-RNA-Komplexbildung wurden 2 nM 3'Cyc RNA mit ansteigenden Konzentrationen von rekombinanten AUF1p45 für 2 min inkubiert. Es folgte

die Zugabe von 2 nM radioaktiv-markierter 5'UTR RNA. Die Reaktionen wurden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und durch die Zugabe von Stopplösung (0.5 % (w/v) SDS, 20 mM EDTA) beendet. Proteine wurden durch Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt. Die Proben wurden mit 2 µl 80%igem Glycerin versetzt und auf einem nativen 5%igen Polyacrylamidgel mit 0.5 x TBE als Laufpuffer bei 4°C aufgetrennt. Die getrockneten Polyacrylamidgele wurden unter *Storage-Phosphor-Screens* (GE Healthcare) für 16 - 24 h exponiert. Mit Hilfe eines *Phosphor Imager* (Molecular Dynamics, STORM 860) konnten die Signale gemessen werden.

2.12. Circular dichroismus

Diese spektroskopische Methode verwendet zirkular polarisiertes Licht, welches durch optisch aktive (chirale) Moleküle mit Chromophor eine messbare Änderung erfährt (Circular dichroismus, CD). Die Peptidbindung von Proteinen stellt ein Chromophor dar. Nach Anregung der Peptidbindung mit zirkular polarisiertem Licht wird ein distinktes CD-Signal erhalten. Dieses CD-Signal kann zur Auswertung von Sekundärstrukturelementen genutzt werden. Sowohl α -Helices, β -Faltblätter als auch *random-coil*-Strukturen zeigen ein charakteristisches CD-Spektrum, wodurch eine Unterscheidung der Sekundärstrukturelemente möglich ist. Der Spektralbereich, in dem der Circular dichroismus der Peptidbindung detektiert wird, umfasst die Wellenlänge von 190 bis 250 nm und wird als Fern-UV oder Amidregion bezeichnet. Des Weiteren gibt es den Nah-UV oder Aromatenbereich von 250 bis 300 nm zur Charakterisierung der Tertiärstrukturumgebung von aromatischen Seitenketten.

Messungen des Circular dichroismus` wurden am JASCO J-810 Spectropolarimeter bei 22°C in einer HELLMA-Küvette (1 mm optische Weglänge) durchgeführt. Die Berechnung der Elliptizität erfolgte nach folgender Gleichung:

$$[\theta]_{MRW} = \theta \cdot \Phi \cdot [MRW] \cdot 3300 / (c \cdot d)$$

(Gleichung 4)

θ = gemessene Elliptizität (mdeg)

$[\theta]_{MRW}$ = *mean residue weight ellipticity*

c = Proteinkonzentration (mg/ml)

d = optische Weglänge (cm)

Φ = Eichfaktor des Geräts (142,5/5610051)

[MRW] = mittleres Molekulargewicht einer Aminosäure des Proteins

III. ERGEBNISSE

3.1. Etablierung eines *in vitro* WNV RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Assays

Zunächst sollte ein System etabliert werden, das es ermöglicht zelluläre Proteine zu identifizieren, die an der Replikation des WNV beteiligt sind. Speziell sollte dazu der erste Replikationsschritt, die Synthese des viralen (-)-Strang-Intermediates, mit gereinigtem NS5 und einem RNA-Template (siehe Abb. 3) *in vitro* rekonstituiert werden. In Komplementationsversuchen mit zellulären Fraktionen sollten dann in diesem *in vitro* RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Assay (RdRp-Assay) zelluläre Proteine identifiziert werden, die die Effizienz der (-)-Strang-RNA-Synthese beeinflussen und somit putative Wirtsfaktoren repräsentieren.

3.1.1. Reinigung des Nichtstrukturproteins NS5 rekombinant aus *E. coli*

Für die Etablierung des *in vitro* RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Assays (RdRp-Assay) wurde das Nichtstrukturprotein 5 (NS5) heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und nativ gereinigt. Hierfür wurde das pETSUMO Expressionssystem verwendet. Dabei wird das gewünschte Protein N-terminal mit dem SUMO (*small ubiquitin-related modifier*)-Protein fusioniert, welches zusätzlich am N-Terminus mit einem Hexahistidin-*tag* versehen ist. Der Vorteil besteht in der durch das SUMO-Protein vermittelten erhöhten Löslichkeit des Fusionsproteins sowie in der Generierung des Zielproteins in nativer Form, nachdem das SUMO-Protein spezifisch durch eine SUMO-Protease abgespalten wurde.

NS5 wurde wie unter 2.7.1.1. beschrieben aus *E. coli* rekombinant gereinigt. Das so gewonnene NS5 wurde in einer 10%igen SDS-PAGE analysiert und war frei von Verunreinigungen (Abb. 5A). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration und des Verhältnisses der OD₂₈₀ zur OD₂₆₀ wurde ein UV-Absorptionsspektrum aufgenommen. Der Koeffizient OD₂₈₀/OD₂₆₀ betrug 1.8 und zeigte somit keine Kontamination mit Nukleinsäuren an (Abb. 5B).

3.1.2. NS5 katalysiert die *de novo* Synthese von (-)-Strang RNA auf einem subgenomischen RNA-Template

Die enzymatische Aktivität des rekombinant gereinigten NS5 wurde durch einen radioaktiven *in vitro* RdRp-Assay untersucht. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Detektion der neu-synthetisierten RNA, ausgehend von einer Template-RNA, durch den Einbau eines radioaktiv-markierten Nukleotids und anschließender Autoradiographie. Ein Reaktionsansatz

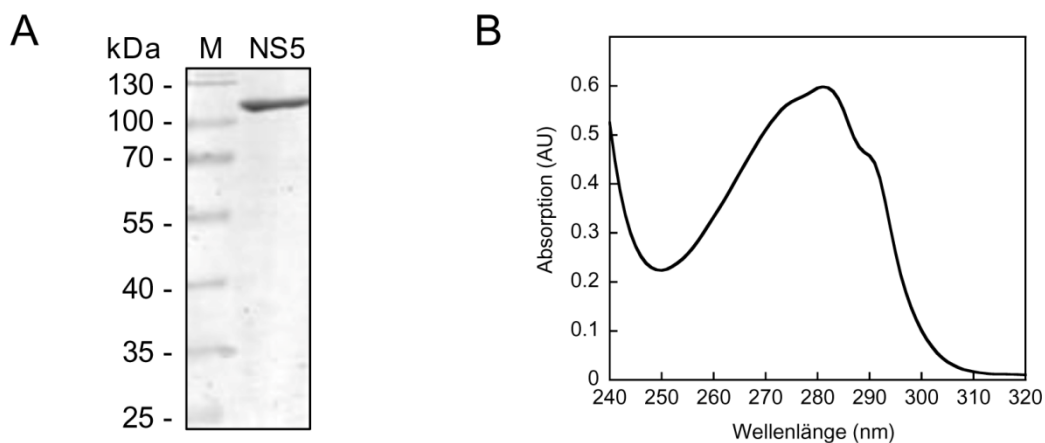


Abb. 5: Rekombinante Reinigung von NS5 (A) NS5 wurde als SUMO-Fusionsprotein in *E. coli* BL21(RP) exprimiert und wie unter Material und Methoden beschrieben gereinigt. 2 µg gereinigtes Protein wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Die Molekulargewichte des Markers sind indiziert. **(B)** UV-Absorptionsspektrum von rekombinant gereinigtem NS5.

setzte sich dementsprechend aus der viralen Polymerase NS5, einem RNA-Template und einem Nukleotidgemisch (ATP, CTP, GTP, UTP) zusammen, von dem eines radioaktiv markiert war (^{32}P -CTP). Als RNA-Template wurde eine subgenomische RNA (sgRNA) des WNV verwendet, welche die 5'-terminalen 184 Nt und die 3'-terminalen 611 Nt der WNV-RNA enthält. Aufgrund der Klonierungsstrategie der für diese RNA kodierenden cDNA fehlen die 5'-terminalen 20 Nt der 3'UTR. Die sgRNA enthält jedoch alle Sequenzen, die für eine Replikation essentiell sind. Dazu gehören die Zyklisierungssequenzen CS, UAR, DAR1 und DAR2 sowie das Promoterelement SLA und der konservierte terminale 3'-SL (siehe Einleitung und Abb. 6A).

Die Durchführung des RdRp-Assays mit dieser sgRNA resultierte in der Bildung von hauptsächlich zwei Produkten, die auf einem 7 M Harnstoffgel mit 5 % Polyacrylamid aufgetrennt werden konnten (Abb. 6B, Spur 1). Das erste Produkt wies die Größe der Template-RNA (ca. 800 Nt) auf und das zweite Produkt migrierte deutlich schneller im Gel. Keine Synthese von RNA wurde detektiert, wenn die Reaktionen ohne NS5 bzw. mit DNA anstelle von RNA als Template durchgeführt wurden (Abb. 6B, Spur 2 und 3). Des Weiteren wurde keine RNA-Synthese beobachtet, wenn nur radioaktiv-markiertes ^{32}P -CTP verwendet wurde, wodurch eine terminale Transferase-Aktivität (Hinzufügen von Nukleotiden an das 3'-Ende der RNA) von NS5 ausgeschlossen werden kann (Abb. 6B, Spur 4). Bei dem ca. 800 Nt langen RNA-Produkt handelt es sich dementsprechend um *de novo* synthetisierte (-)-Strang-RNA. Dagegen stellt das schneller migrierende RNA-Produkt sehr wahrscheinlich ein in der Literatur schon beschriebenes *hairpin*-Produkt dar. Dessen Synthese kommt durch ein Umklappen des 3'-Endes der RNA (*copy-back*-Mechanismus) zustande, wodurch ein

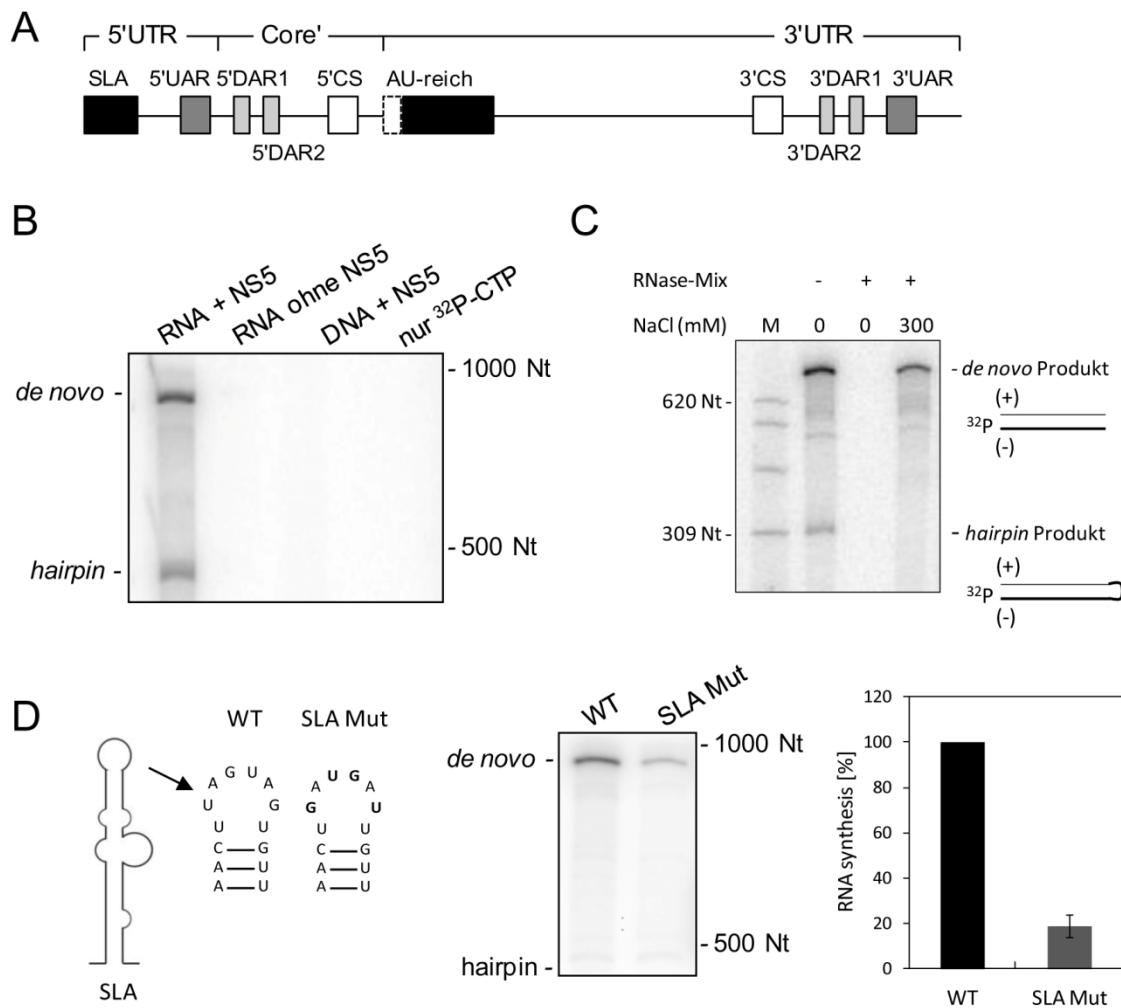


Abb. 6: In vitro RNA-abhängiger RNA-Polymerase-Assay. **(A)** Schematische Darstellung der subgenomischen RNA (sgRNA), die als Template in dem *in vitro* RdRp-Assay verwendet wurde. Die sgRNA besteht hauptsächlich aus der 3'UTR und der 5'UTR, inklusive eines kleinen Teils der kodierenden Sequenz für das Core-Protein. Sie enthält alle Zyklisierungssequenzen CS, UAR, DAR1 und DAR2. *Stem-loop A* (SLA) dient als Promoterelement für NS5 zur Initiation der (-)-Strang-RNA-Synthese am 3'Ende der RNA. **(B)** Radioaktiv-markierte Produkte des *in vitro* RdRp-Assays mit NS5 wurden auf einem 5%igen, 7 M Harnstoffgel aufgetrennt. Spur 1: Standardreaktion, Spur 2: Reaktion ohne NS5, Spur 3: DNA als Template anstelle von RNA, Spur 4: Reaktion nur mit radioaktiv-markiertem CTP. *De novo*- und *hairpin*-synthetisierte RNA-Produkte sind links, Markergrößen sind rechts angezeigt. **(C)** Die radioaktiv-markierten Produkte des *in vitro* RdRp-Assays mit NS5 wurden in Gegenwart von 0 (Spur 3) bzw. 300 mM NaCl (Spur 4) mit RNase A/RNase T₁ behandelt und auf einem 5%igen, 7 M Harnstoffgel aufgetrennt. Markergrößen (M) sind links und die schematische Darstellung der RNA-Produkte ist rechts angezeigt. **(D)** Schematische Darstellung des *stem-loop A* der 5'UTR und seines *top-loops* mit einer Mutation, die als essentiell für die RNA-Replikation des WNV-Replikons *in vivo* identifiziert wurde. Die WT-sgRNA sowie die sgRNA mit der Mutation (SLA Mut) wurden in einem *in vitro* RdRp-Assay analysiert und die Produkte mit *Image Quant* quantifiziert. Das Ergebnis aus fünf verschiedenen Experimenten ist gezeigt, wobei die RNA-Synthese mit der WT-sgRNA auf 100 % gesetzt wurde. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an.

einzelsträngiger Bereich entsteht (schematisch dargestellt in Abb. 6C). Aufgrund der semi-denaturierenden Bedingungen der Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese migriert diese eigentlich doppelt so lange RNA aufgrund stabiler Sekundärstrukturen deutlich schneller als das *de novo*-RNA-Produkt (Behrens et al. 1996). Um dies zu bestätigen, wurden die neu-synthetisierten RNAs durch eine RNase-Behandlung charakterisiert. Dazu wurden die RNA-Produkte mit einem Gemisch aus den RNasen A und T₁ ohne zusätzliches NaCl (Niedrigsalz)

bzw. bei hohen NaCl-Konzentrationen (Hochsalz) umgesetzt. RNase T₁ ist eine einzelstrang-spezifische Endonuklease. RNase A ist in der Lage einzelsträngige RNA bei Niedrigsalz und Hochsalz abzubauen, doppelsträngige RNA jedoch nur bei Niedrigsalz. Die RNase-Behandlung bei Niedrigsalz führte zu einem Abbau aller radioaktiven RdRp-Produkte (Abb. 6C, Spur 3). Dagegen liess sich das ca. 800 Nt lange RNA-Produkt bei Hochsalz (300 mM NaCl) auch nach RNase-Behandlung nachweisen (Abb. 6C, Spur 4). Da die schneller migrierende RNA-Bande nach RNase-Behandlung unter Hochsalz nicht mehr nachweisbar war, wurde daraus geschlossen, dass es sich um die oben erwähnte *hairpin*-RNA handelte. Bei RNase-Behandlung wird die *hairpin*-RNA durch Schnitte in dem einzelsträngigen Bereich in doppelsträngige RNA überführt. Der neu-synthetisierte, radioaktiv-markierte RNA-Strang migriert dann an gleicher Stelle wie das *de novo*-RNA-Produkt (Behrens et al. 1996).

In einem weiteren Experiment wurde der RdRp-Assay mit einer sgRNA durchgeführt, die eine Mutation im SLA-Promoter enthält. Diese Mutation im *toploop* des SLA hatte einen negativen Effekt auf die *in vivo* Replikation von WNV (Dong et al. 2008b, Abbildung 6D). Die RNA-Synthese von NS5 auf dieser sgRNA (SLAMut) war im Vergleich zur Wildtyp-RNA um ca. 80 % reduziert. Somit wurde ein RdRp-Assay etabliert, der den ersten Schritt der RNA-Replikation, d.h. die (-)-Strang-RNA-Synthese des WNV, *in vitro* authentisch rekonstituiert.

3.1.3. Bedeutung der Zyklisierungssequenzen in den 5'- und 3'UTRs der West-Nil-Virus-RNA für die *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese durch NS5

Komplementäre Sequenzen in den untranslatierten Regionen der 5'-und 3'-Enden der genomischen RNA sind essentiell für die flavivirale Replikation (siehe Einleitung). Um den Einfluss bereits bekannter sowie putativer Zyklisierungssequenzen auf die *in vitro* Aktivität von NS5 zu untersuchen, wurden Mutationen in die RNA eingeführt, die die Interaktion der komplementären Sequenzen unterbinden. Die Mutagenese der 5'CS-Sequenz orientierte sich an Lo et al. (2003). Bei der Mutagenese der 3'UAR-, 5'DAR1- und 3'DAR2-Zyklisierungssequenzen wurde darauf geachtet, dass die eingeführten Mutationen die Sekundärstruktur der übrigen RNA-Elemente nicht beeinflussten. Dies wurde durch das Strukturvorhersageprogramm *mfold* (Zuker 2003) abgesichert. Die Zyklisierungsmutanten wurden *in vitro* transkribiert und die RNA-Synthese von NS5 auf diesen sgRNAs wurde mit der WT-sgRNA verglichen. Die Intensitäten der *de novo* synthetisierten RNA-Produkte wurden mit dem Programm *Image Quant* bestimmt, wobei das radioaktive Signal der WT-sgRNA auf 100 % gesetzt wurde. Die Mutationen der 5'CS-Sequenz (5'CSMut) bzw. der 3'DAR2-Sequenz (3'DAR2Mut) hatten einen deutlichen Effekt auf die (-)-Strang-RNA-Synthese. In beiden Fällen wurde die Effizienz der (-)-Strang-RNA-Synthese auf ca. 10 % der WT-sgRNA vermindert (Abb. 7A, C und D). Die Mutagenese der 3'UAR-Sequenz bzw. der 5'DAR1-

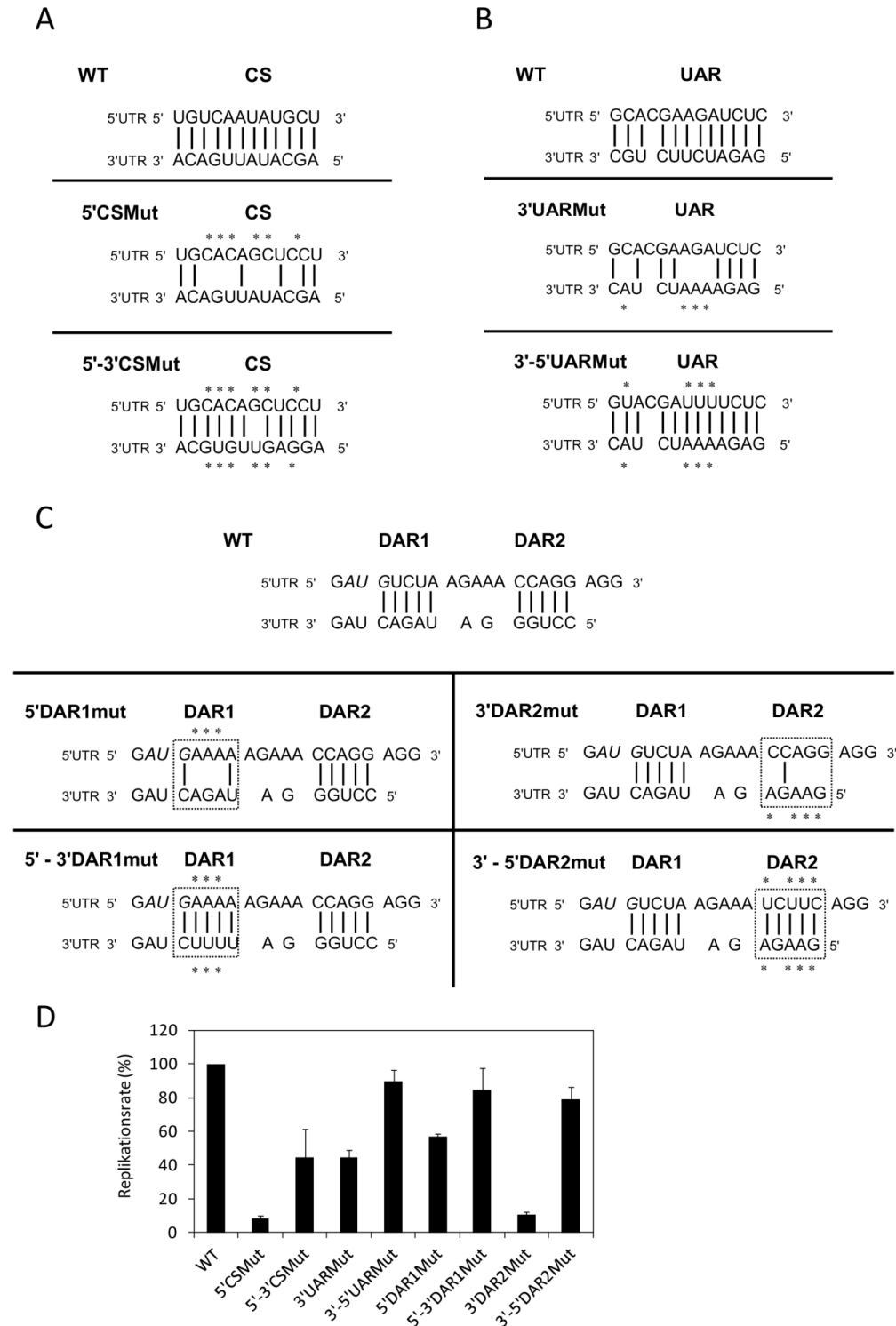


Abb. 7: Zyklisierungssequenzen sind für eine effiziente *in vitro* (-)Strang-RNA-Synthese von NS5 wichtig. (A) Basenpaarung der CS-Zyklisierungssequenz in der 5'UTR und 3'UTR. Komplementäre Nukleotide sind durch einen Bindestrich indiziert. Eingeführte Mutationen sind mit einem Stern markiert. **(B)** Basenpaarung der UAR-Zyklisierungssequenz in der 5'UTR und 3'UTR. Komplementäre Nukleotide sind durch einen Bindestrich indiziert. Eingeführte Mutationen sind mit einem Stern markiert. **(C)** Basenpaarung der DAR1 und DAR2-Zyklisierungssequenzen in der 5'UTR und 3'UTR. Das AUG-Startcodon ist kursiv dargestellt. Komplementäre Nukleotide sind durch einen Bindestrich indiziert. Eingeführte Mutationen sind mit einem Stern markiert. Links ist die Mutagenese für DAR1 gezeigt, rechts für DAR2. Beide Zyklisierungssequenzen sind jeweils mit einer Linie umrandet. **(D)** Die WT-sgRNA und die Zyklisierungsmutanten wurden in einem *in vitro* RdRp-Assay analysiert und die *de novo*-synthetisierten RNA-Produkte mit *Image Quant* quantifiziert. Das Ergebnis aus drei verschiedenen Experimenten ist gezeigt, wobei die RNA-Synthese mit der WT-sgRNA auf 100 % gesetzt wurde. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an.

Sequenz führte zu einer etwas moderateren Reduktion der (-)-Strang-RNA-Synthese auf ca. 40 % bzw. ca. 60 % im Vergleich zur WT-sgRNA (Abb. 7B, C und D). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Interaktion der einzelnen Zyklisierungssequenzen der 5'- und 3'UTR wichtig ist für die *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese durch NS5. In einem nächsten Experiment sollte untersucht werden, ob eine Komplementationsmutagenese, d.h. eine Wiederherstellung der Basenpaarung durch Einführen von Mutationen in die dazugehörige Zyklisierungssequenz am anderen Ende der RNA, die Effizienz der RNA-Synthese wiederherstellen kann. Dazu wurden Mutationen eingeführt, die eine vollständige Basenpaarung wiederherstellten (Abb. 7A-C). Mit Ausnahme von Mutanten, die die CS-Sequenz betrafen, wurde bei der Komplementationsmutagenese der UAR-, DAR1- und DAR2-Sequenzen eine RNA-Syntheserate durch NS5 erreicht, die fast wieder der Rate auf der ursprünglichen WT-sgRNA entsprach (Abb. 7D). Dies zeigte, dass die Hybridisierung der jeweils komplementären RNA-Elemente *per se* wichtiger ist als die Primärsequenz der RNA. Damit konnte die Bedeutung der schon beschriebenen Zyklisierungssequenzen CS, UAR und DAR2 mit dem in dieser Arbeit etablierten *in vitro* RdRp-Assay bestätigt werden (Lo et al. 2003; Nomaguchi et al. 2004; Zhang et al. 2008; Friebe et al. 2011). Darüber hinaus konnte erstmals der bisher putativen Zyklisierungssequenz DAR1 eine funktionelle Bedeutung in der (-)-Strang-RNA-Synthese zugeschrieben werden.

3.2. Etablierung eines West-Nil-Virus-Replikon-Systems in Huh7-Zellen

Um die Replikation des WNV *in vivo* näher zu untersuchen, wurde ein Replikon-System in humanen Leberkarzinomzellen (Huh7) etabliert. Das dafür verwendete WNV-Replikon (pWNVRep) wurde zuerst von Shi et al. (2002) beschrieben. Der Großteil der Sequenz für die Strukturgene ist deletiert, wodurch kein infektiöses Virus gebildet werden kann. Die virale RNA wird jedoch effizient repliziert, da diese Replikon-RNA alle RNA-Elemente enthält und für alle Proteine kodiert, die für eine autonome RNA-Replikation wichtig sind (Abb. 8A). Das für das WNV-Replikon kodierende Plasmid pWNVRep wurde mit *Xba*I linearisiert. Um ein natives Ende der RNA am 3'-Ende zu gewährleisten, wurden die durch die *Xba*I-Restriktion entstandenen, überhängenden Nt durch Umsetzung mit Mung Bean Nuklease entfernt. Die ca. 9 kb lange Replikon-RNA wurde *in vitro* transkribiert und die strukturelle Integrität auf einem 1%igen Formaldehyd-Agarosegel überprüft (Abb. 8B). Die so gewonnene Replikon-RNA wurde in Huh7-Zellen durch Elektroporation transfiziert. Nach 48 h wurde cytoplasmatischer Extrakt präpariert und mittels Western Blot NS5 detektiert. Dafür wurde ein Antikörper verwendet, der nach Immunisierung eines Kaninchens mit dem gereinigten NS5-Protein (siehe 3.1.1.) gewonnen wurde. NS5 konnte ausschließlich in Zellen detektiert

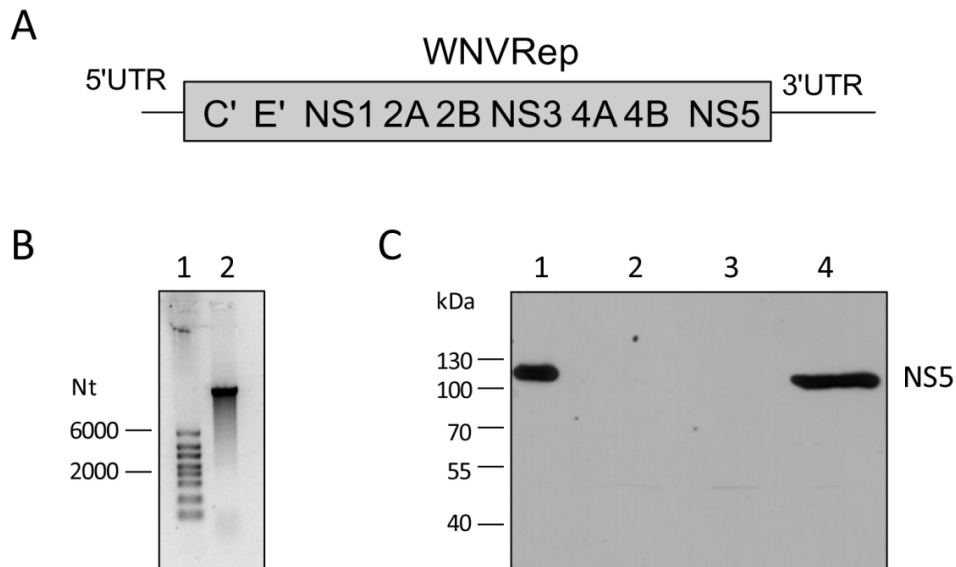


Abb. 8: Nachweis der RNA-Replikation des WNV-Replikons *in vivo*. (A) Schematische Darstellung der genomischen Organisation des WNV-Replikons (Shi et al. 2002). Der Hauptteil der Strukturgene, die für das Core-Protein und die beiden Hüllproteine prM und E kodieren, sind deletiert. Der offene Leserahmen wird beidseitig von untranslatierten Regionen flankiert (5'UTR und 3'UTR). (B) Das Plasmid pWNVRep wurde mit *Xba*I linearisiert, mit Mung Bean Nuklease behandelt und in einer *in vitro* Transkription als Template eingesetzt. Es wurden ungefähr 500 ng RNA-Produkt (Spur 2) auf einem 1%igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Die Größen des RNA-Markers (Spur 1) sind indiziert. (C) Huh7-Zellen einer 10 cm-Kulturschale wurden mit 3 µg Replikon-RNA transfiziert. Nach 48 h wurde cytoplasmatischer Extrakt präpariert und mittels Western Blot die NS5-Expression überprüft. Spur 1: 70 ng rekombinant gereinigtes NS5, Spur 2: cytoplasmatischer Extrakt einer *mock*-Transfektion, Spur 3: cytoplasmatischer Extrakt einer Transfektion mit einem replikationsdefizienten Replikon, Spur 4: cytoplasmatischer Extrakt einer Transfektion mit dem WT-Replikon.

werden, die mit dem WT-Replikon transfiziert wurden (Abb. 8C, Spur 4). Dagegen wurde kein NS5-Protein in Zellen detektiert, die mit einem replikationsdefizienten Replikon transfiziert wurden. Dieses Replikon enthielt eine Mutation im *NS5*-Gen und kodierte entsprechend eine enzymatisch inaktive NS5-Polymerase (Abb. 8C, Spur 3). Weiterhin konnte die RNA-Replikation des WNV-Replikons *in vivo* durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert werden. Dafür konnte wiederum der polyklonale Anti-NS5-Antikörper verwendet werden, da dieser NS5 nur in Zellen detektierte, die mit dem WT-Replikon transfiziert wurden, nicht aber in Zellen, die mit dem replikationsdefizienten Replikon transfiziert wurden. Die Analyse der RNA-Replikation des WNV-Replikons in den transfizierten Zellen mittels Immunfluoreszenz zeigte jedoch in diesen initialen Experimenten nur eine sehr geringe Replikationseffizienz (Verhältnis replizierender zu nicht replizierenden Zellen) von ca. 10 – 20 %. (Abb. 9A und B).

3.2.1. Die Fusion eines Ribozym-Elements an das 3'-Ende der WNV-Replikon-RNA verbessert die Replikationsrate

Tilgner und Shi konnten 2004 zeigen, dass die Sequenz der letzten fünf Nukleotide am 3'-Terminus der viralen RNA essentiell für die Replikation sind. Da die Mung Bean Nuklease unter gewissen Bedingungen auch dsDNA degradieren kann, war es möglich, dass ein fehlerhafter Abbau des ssDNA-Überhangs der *Xba*I-Restriktionsschnittstelle zur Transkription

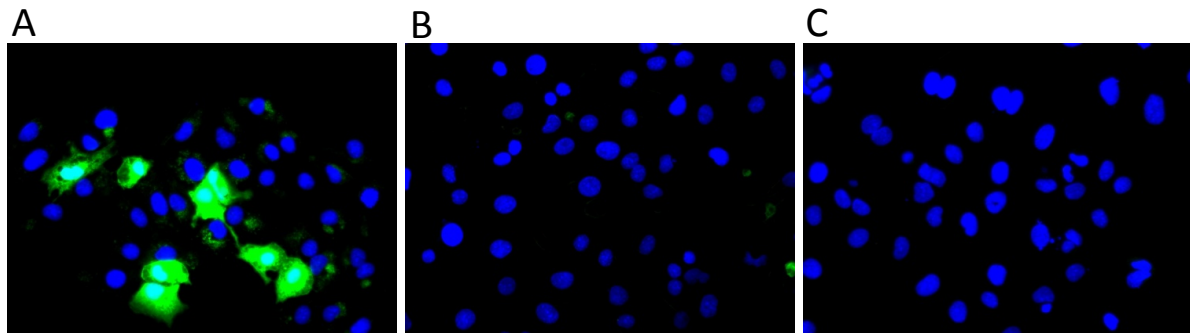


Abb. 9: Detektion von NS5 in WNV-transfizierten Huh7-Zellen mittels Immunfluoreszenz. Huh7-Zellen einer 10 cm-Kulturschale wurden mit 3 µg Replikon-RNA transfiziert. Nach 48 h Inkubation wurde NS5 über indirekte Immunfluoreszenz detektiert. Die Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. **(A)** Transfektion mit WT-Replikon-RNA und Immunfluoreszenz mit Anti-NS5 Antikörper **(B)** Transfektion mit einem replikationsdefizienten Replikon und Immunfluoreszenz mit Anti-NS5 Antikörper **(C)** Transfektion mit WT-Replikon-RNA und Immunfluoreszenz mit Prä-Immunsersum.

von viralen RNA-Molekülen führt, die ineffizient oder nicht replizierten. Tilgner und Shi konnten in der gleichen Publikation die Replikationsrate des WNV-Replikons in BHK-(*baby hamster kidney*) Zellen durch Fusion des Hepatitis-Delta-Virus-Ribozyms (HDVr) an das 3'-Ende der RNA steigern. Das HDVr ist ein katalytisch aktives RNA-Molekül, welches das RNA-Genom des HDV in einer *self-cleavage*-Reaktion prozessiert. Die Fusion des HDVr an das 3'Ende der WNV-RNA erzeugt nach Abspaltung des Ribozyms das native 3'-Ende (schematisch dargestellt in Abb. 10B). Die Steigerung der Replikationsrate durch Fusion des HDVr and das 3'Ende der WNV-RNA konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Transfektion eines WNV-Replikons mit einer fusionierten HDVr-Sequenz erhöhte dessen Replikationseffizienz in Huh7-Zellen auf ca. 90 % (Abb. 10A und B).

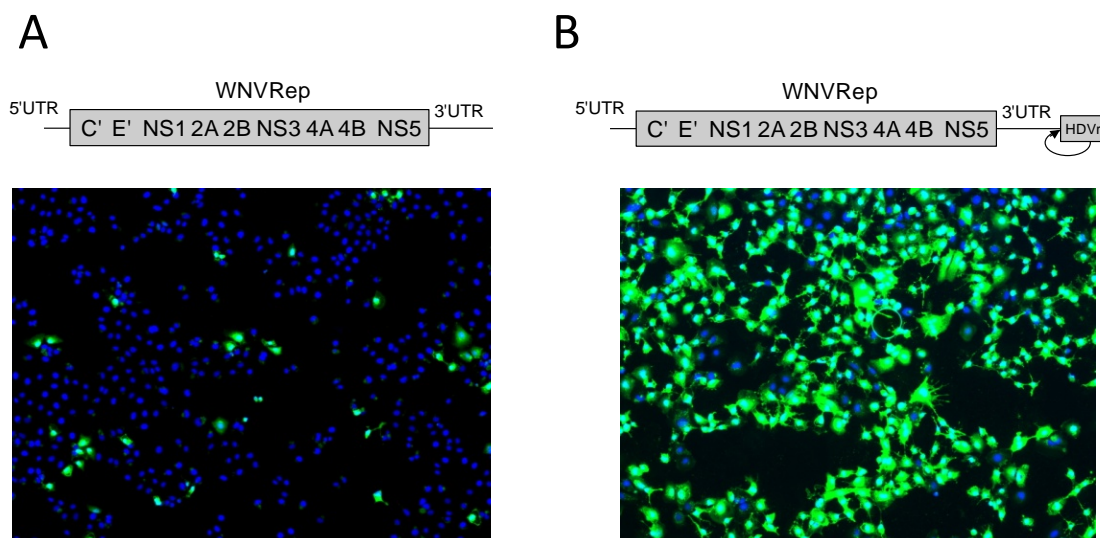


Abb. 10: Fusion des Hepatitis-Delta-Virus-Ribozyms an das 3'-Ende der viralen RNA erhöht die Replikationseffizienz. Huh7-Zellen einer 10 cm-Kulturschale wurden mit 3 µg Replikon-RNA transfiziert. Nach 48 h Inkubation wurde NS5 über indirekte Immunfluoreszenz detektiert. Die Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. **(A)** Transfektion von Replikon-RNA und Immunfluoreszenz mit Anti-NS5 Antikörper **(B)** Transfektion von Replikon-RNA mit am 3'-Ende fusioniertem Hepatitis-D-Virus-Ribozym (HDVr) und Immunfluoreszenzanalyse mit Anti-NS5 Antikörper.

3.2.2. Bedeutung der Zyklisierungssequenzen in den 5'- und 3'UTRs der West-Nil-Virus-RNA für die RNA-Replikation des WNV-Replikons in transfizierten Zellen

Zur näheren Charakterisierung des WNV-Replikons wurde die für das Reporterogen Renilla-Luziferase kodierende Sequenz (*Rluc*) *in frame* in den 5'-Bereich des durch die Replikon-RNA kodierten ORF integriert (Abb. 11A). Mit Hilfe dieses Reportersystems ist es möglich, zwischen der Translation der *input*-RNA und der Replikation der viralen RNA zu unterscheiden (Lo et al. 2003). Die *Rluc*-Aktivität zeigte einen zeitabhängigen Verlauf, wobei der Wert 3 h nach der Transfektion des Replikons als Indikation für die Translation der *input*-RNA dient und die stark ansteigende *Rluc*-Aktivität ab ca. 20 h die einsetzende Replikation der viralen RNA reflektiert (Abb. 11B). Dieses *Rluc*-Reporter-Replikon wurde zunächst genutzt, um den generellen Einfluss essentieller RNA-Elemente im hier etablierten WNV-Replikonsystem zu überprüfen. Dazu wurden die unter 3.1.3. bereits beschriebenen Mutationen der Zyklisierungssequenzen CS, DAR1 und DAR2 sowie die unter 3.1.2. beschriebene Mutation im SLA in das *Rluc*-Reporter-Replikon eingeführt und die *Rluc*-Aktivität nach 3 h (repräsentativ für die Translation der viralen RNA), 24 h und 48 h (repräsentativ für die Replikation der viralen RNA) bestimmt und mit der *Rluc*-Aktivität des WT-Replikons verglichen. Die Mutagenese der 5'-CS-Sequenz hatte, ebenso wie die Mutation in der SLA-Struktur der 5'UTR (SLAMut), keinen Einfluss auf die Translationsaktivität der viralen RNA. Die *Rluc*-Aktivität nach 24 h bzw. 48 h war jedoch deutlich reduziert im Vergleich zum WT (Abb. 11C). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Integrität dieser Sequenzen essentiell für die Replikation der viralen RNA ist und bestätigen bereits publizierte Daten (Lo et al. 2003; Dong et al. 2008b). Die Mutagenese der DAR-Sequenzen hatte einen moderaten (DAR1) bzw. deutlichen Effekt (DAR2) auf die Translation des WNV-Replikons. Die Reduktion der Translation des DAR1Mut-Replikons spiegelte sich in einer drastischen Abnahme der Replikation nach 24 h wider, dieser Effekt wurde jedoch nach 48 h wieder aufgehoben. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine Reversion der Mutation zur ursprünglichen WT-Sequenz bzw. kompensatorische Mutationen innerhalb der Replikon-RNA, die während der viralen Replikation auftreten können. Die deutliche Abnahme der Translation des DAR2Mut-Replikons hingegen konnte nicht kompensiert werden und führte zu einem replikationsdefizienten Phänotyp (Abb. 11C). Damit konnte zusätzlich zur bereits publizierten Beteiligung der DAR2-Sequenz an der Replikation (Friebe et al. 2011) auch eine funktionelle Bedeutung der DAR2-Sequenz an der Translation der WNV-RNA nachgewiesen werden.

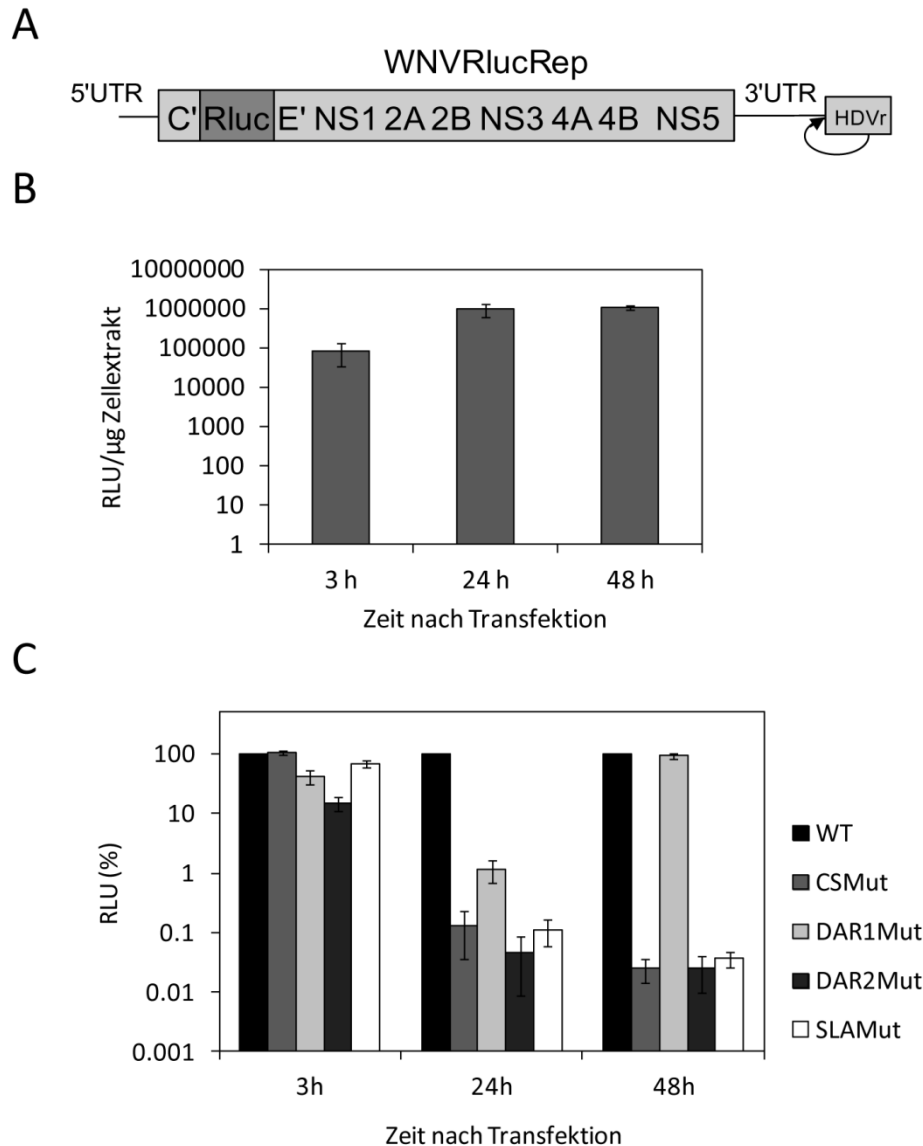


Abb. 11: Komplementäre Zyklierungssequenzen sind wichtig für die Translation bzw. Replikation der WNV-RNA. (A) Schematische Darstellung der Genomorganisation des Renilla-Luziferase-Reporter-WNV-Replikons. Die kodierende Sequenz für die Renilla-Luziferase (*Rluc*) wurde in die *AflII*-Schnittstelle von pWNVRepHDVr inseriert. (B) Nachweis der Rluc-Aktivität. Huh7-Zellen einer 10 cm-Kulturschale wurden mit 1 µg Rluc-Reporter-Replikon-RNA transfiziert. 3, 24 und 48 h nach Transfektion wurde die Aktivität der Rluc pro µg Zellextrakt bestimmt. (C) Replikationsrate verschiedener Rluc-Reporter-Replikon-RNAs. Huh7-Zellen einer 10 cm-Kulturschale wurden mit 1 µg RNA transfiziert. 3, 24 und 48 h nach Transfektion wurde die Aktivität der Rluc bestimmt. Das Ergebnis aus drei verschiedenen Experimenten ist gezeigt, wobei die Rluc-Aktivität des WT-Replikons auf 100 % gesetzt wurde. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. RLU = *relative light units*.

3.3. Reinigung putativer Wirtsfaktoren des WNV aus HeLa-Zellen

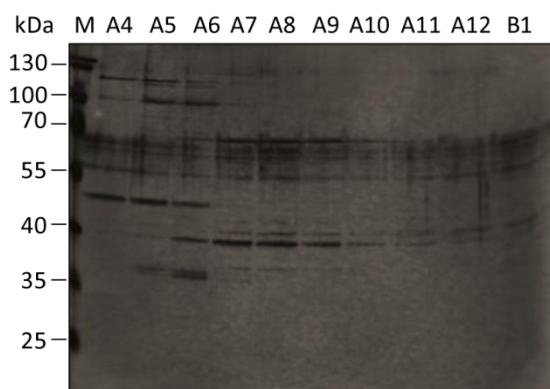
Der *in vitro* RdRp-Assay (siehe 3.1.) wurde etabliert, um den Einfluss zellulärer Proteine auf die virale (-)-Strang-RNA-Synthese (putative Wirtsfaktoren) zu untersuchen. Ziel war dabei zunächst diesen Assay zur Identifizierung putativer Wirtsfaktoren in einer Komplementationsreaktion mit Zellfraktionen einzusetzen. Dabei wurde die Effizienz der (-)-Strang-RNA-Synthese als *read out* für die Aktivität der putativen Wirtsfaktoren genutzt. Da das WNV ein

RNA-Virus ist, sollten gezielt zelluläre Proteine untersucht werden, die eine RNA-Bindeaktivität aufweisen. Dazu wurde ein Protokoll zur Reinigung von RNA-Bindeproteinen aus HeLa-Zellen (Epithelzelllinie isoliert aus Gebärmutterhalskrebs) etabliert. Da es sich bei dem WNV um ein vorwiegend im Cytoplasma replizierendes RNA-Virus handelt, wurde die Reinigung aus cytoplasmatischen (S100) Extrakten durchgeführt. Bei der Verwendung von zunächst unfraktionierten S100-Extrakten konnte in den Komplementationsassays keine Stimulierung der *in vitro* (-)-RNA-Synthese festgestellt werden (Abb. 12A, Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde entschieden eine Anionenaustausch-Chromatographie durchzuführen um die endogenen Nukleinsäuren der S100-Zellextrakte zu entfernen. Im Anschluss daran konnte im Durchfluss eine leichte stimulatorische Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 12A, Daten nicht gezeigt). Zur spezifischen Anreicherung von RNA-

A

Reinigungsschritt	stimulatorische Aktivität
HeLa-Zellextrakt	nicht nachweisbar
Anionenaustausch-Chromatographie	Durchfluss
Poly (I):(C)-Chromatographie	Elution
Heparin-Chromatographie	Durchfluss und Elution

B



C

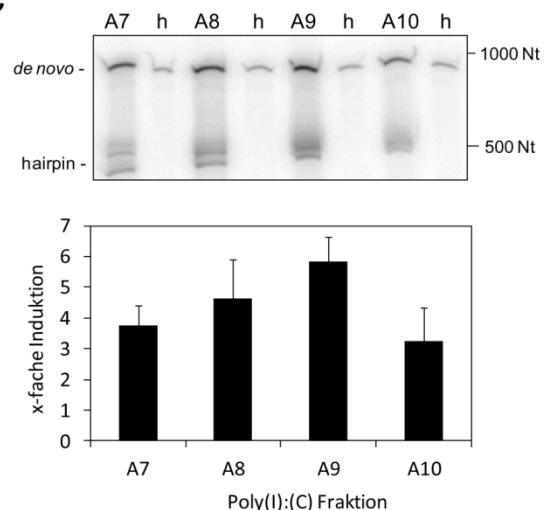


Abb. 12: Reinigung zellulärer RNA-Bindeproteine aus HeLa-Zellen. (A) Übersicht über die Reinigungsprozedur zellulärer RNA-Bindeproteine mit stimulatorischer Aktivität im *in vitro* RdRp-Assay. (B) 25 µl der Elutionsfraktionen A4-B1 der Poly(I):(C)-Chromatographie wurden auf einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Silber gefärbt. Die Molekulargewichte des Markers sind indiziert. (C) Die Poly(I):(C)-Fraktionen A7-A10 aus (B) wurden auf stimulatorische Aktivität im *in vitro* RdRp-Assay getestet. Dazu wurde der Assay mit 1 µl der Elutionsfraktionen komplementiert. Als Kontrolle dienten Reaktionen, die mit hitzeinaktivierten (h) Elutionsfraktionen komplementiert wurden. Die radioaktiv-markierten Produkte wurden auf einem 5%igen, 7 M Harnstoffgel aufgetrennt und die *de novo*-synthetisierten RNA-Produkte nach Autoradiographie mit *Image Quant* quantifiziert. Das Ergebnis aus drei verschiedenen Experimenten ist gezeigt, wobei die RNA-Synthese mit der Kontrollreaktion (h) auf 1 gesetzt wurde. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an.

Bindeproteinen wurde der Durchfluss des Anionenaustauschers anschließend über eine Poly(I):(C)-Chromatographie weiter fraktioniert. Poly(I):(C) simuliert die Struktur von dsRNA und kann somit zur Reinigung von dsRNA-Bindeproteinen genutzt werden (Liao et al. 1998; Isken et al. 2003). Die mit einem NaCl-Gradienten eluierten Proteinfractionen der Poly(I):(C)-Chromatographie (Abb. 12B) wurden auf stimulatorische Aktivität im *in vitro* RdRp-Assay getestet. Dabei zeigte sich, dass die Komplementation mit bestimmten Elutionsfraktionen die *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese von NS5 auf der sgRNA bis zu 6fach stimulierte im Vergleich zu Reaktionen, die mit den hitzeinaktivierten Fraktionen versetzt wurden (Abb. 12C). Des Weiteren zeigte sich kein Unterschied im Ausmaß der stimulatorischen Aktivität, wenn S100-Extrakte oder Kernextrakte für die Aufreinigung verwendet wurden (Daten nicht gezeigt). Die Poly(I):(C)-Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden vereint und einer

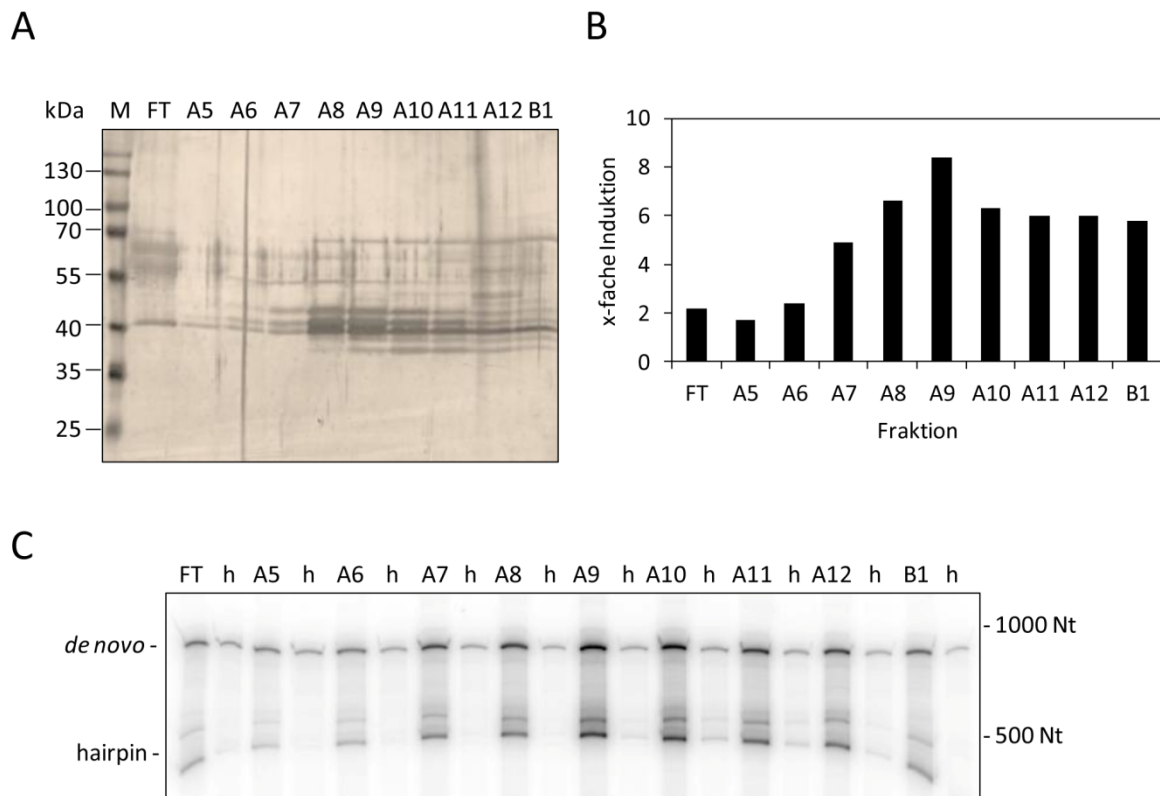


Abb. 13: Heparin-Chromatographie zellulärer RNA-Bindeproteine und Analyse im *in vitro* RdRp-Assay (A) 170 μ l des Durchflusses (FT) und 100 μ l der Elutionsfraktionen A5-B1 der Heparin-Chromatographie wurden mit Trichloressigsäure präzipitiert, auf einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Silber gefärbt. Die Molekulargewichte des Markers sind angedeutet. **(B)** Die Heparin-Fractionen (A) wurden auf stimulatorische Aktivität im *in vitro* RdRp-Assay getestet. Dazu wurde der Assay mit 10 μ l (FT) bzw. mit 5 μ l (A5-B1) der Heparin-Fractionen komplementiert. Als Kontrolle dienten Reaktionen, die mit hitzeinaktivierten (h) Proteinfractionen komplementiert wurden. Die radioaktiv-markierten Produkte wurden auf einem 5%igen, 7 M Harnstoffgel aufgetrennt und die *de novo*-synthetisierten RNA-Produkte nach Autoradiographie mit *Image Quant* quantifiziert. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt, wobei die RNA-Synthese mit der Kontrollreaktion (h) auf 1 gesetzt wurde.

weiteren Reinigung mit einer Heparin-Chromatographie unterzogen (Abb. 12A und 13A). Die stimulatorische Aktivität auf die *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese konnte dabei im Durchfluss sowie in bestimmten Elutionsfraktionen detektiert werden (Abb. 13B und C). Der Durchfluss der Heparin-Chromatographie wurde dann aufkonzentriert und mittels Massenspektrometrie (MS) analysiert. Um zu überprüfen, ob sich mit der Aufkonzentrierung auch die stimulatorische Aktivität steigern ließ, wurde der Durchfluss vor und nach der Konzentrierung im *in vitro* RdRp-Assay getestet. Dabei zeigte sich, dass die RNA-Syntheserate durch das Konzentrieren der Proteinfraction noch deutlich gesteigert werden konnte (Abb. 14A). Die massenspektrometrische Analyse bestätigte die Anreicherung bekannter RNA-Bindeproteine, wobei das Poly(rC)-binding protein 1 (PCBP1, auch hnRNPE1 genannt) am stärksten angereichert wurde (Abb. 14B, Tabelle 6). Ein weiteres identifiziertes RNA-Bindeprotein ist das *AU-rich element binding protein* 1 (AUF1, auch hnRNPD genannt). Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass AUF1 in den Poly(I):(C)-Fraktionen präsent war, die die höchste stimulatorische Wirkung auf die *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese hatten (Abb. 14C).

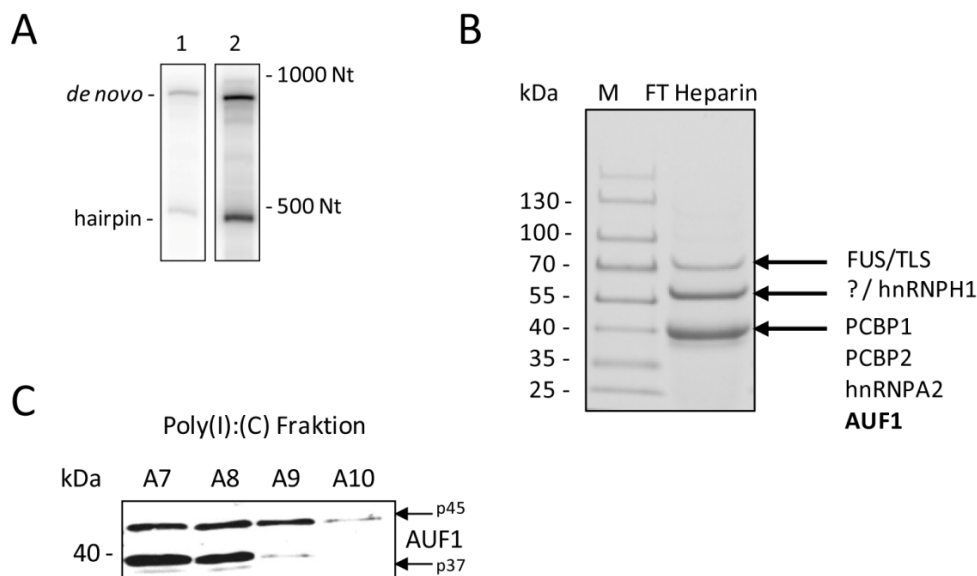


Abb. 14: Analyse des Durchflusses der Heparin-Chromatographie zellulärer RNA-Bindeproteine (A) 25 ml des Durchflusses der Heparin-Chromatographie wurden mit Vivaspin-Konzentratoren um den Faktor 10 konzentriert und auf stimulatorische Aktivität im *in vitro* RdRp-Assay getestet. Dazu wurde der Assay mit 5 µl komplementiert. 1 = vor Konzentrierung, 2 = nach Konzentrierung. Die radioaktiv-markierten Produkte wurden auf einem 5%igen, 7 M Harnstoffgel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. (B) Der konzentrierte Durchfluss der Heparin-Chromatographie wurde auf einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Die Molekulargewichte der Marker sind indiziert. Einige der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine sind durch einen Pfeil markiert. Die SDS-PAGE sowie die MS-Analyse wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Ruppert, ZMBH, Heidelberg durchgeführt. (C) 300 µl der Poly(I):(C)-Fraktionen A7-A10 wurden mit Trichloressigsäure präzipitiert und mittels Western Blot AUF1 detektiert.

Tabelle 6: Durch Massenspektrometrie identifizierte zelluläre Proteine aus dem Durchfluss der Heparin-Chromatographie

Protein	Protein-Nr. in der NCBI-Datenbank	Anzahl der Peptide
Poly(rC)-binding protein 1 (PCBP1)	GI:42560548	665
Poly(rC)-binding protein 2 (PCBP2)	GI:2500577	91
RNA-binding protein FUS	GI:544357	87
hnRNPA2/B1	GI:133257	53
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	GI:51702775	20
Far upstream element-binding protein 2 (KHSRP)	GI:313104306	14
Interleukin enhancer-binding factor 2 (NF45)	GI:62510764	14
hnRNPH1	GI:1710632	8
TIA-1	GI:206729905	5
5'-3' exoribonuclease 2 (XRN2)	GI:30173484	7
Protein angel homolog 2	GI:74746929	7
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	GI:121940728	6
Zinc finger protein 9	GI:50401852	5
RNA 3'-terminal phosphate cyclase isoform a	GI:195927044	4
hnRNPD (AUF1)	GI:13124489	3
Interleukin enhancer-binding factor 3 (NF90)	GI:62512150	2

FUS = *Fused in Sarcoma*; KHSRP = *K homology splicing regulatory protein*; NF45/NF90 = *Nuclear factor 45/90*; TIA-1 = *T-cell restricted intracellular antigen-1*

3.4. Die RNAi-vermittelte Depletion von AUF1 in Huh7-Zellen hat einen negativen Einfluss auf die RNA-Replikation des WNV-Replikons

Einige der durch MS identifizierten Proteine wurden hinsichtlich einer möglichen Beteiligung an der RNA-Replikation des WNV-Replikons überprüft. Dazu wurden die intrazellulären Konzentrationen der Proteine durch RNAi-vermittelte Depletion reduziert. 48 h nach Transfektion der siRNAs in Huh7-Zellen wurde das WNV-Replikon transfiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen. Die Effizienz der Depletion der zellulären Proteine wurde mittels Western Blot verifiziert. Die Effizienz der RNA-Replikation wurde durch Messung der viralen RNA mittels quantitativer Reverse Transkriptions-PCR (qRT-PCR) bestimmt. Von allen getesteten Proteinen (PCBP1, PCBP2, FUS, hnRNPA2/B1, Cyclophilin A, NF45, TIA-1, NF90) hatte ausschließlich die Reduktion von AUF1 einen Einfluss auf die

Replikation des WNV-Replikons in Huh7-Zellen (Abb. 15 und Daten nicht gezeigt). So war die Proteinmenge von NS5 24 h und 48 h nach Transfektion des WNV-Replikons in AUF1-depletierten Zellen reduziert im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA (siC) transfiziert wurden (Abb. 15B). Ebenso war die Menge an viraler RNA nach Depletion von AUF1 im Vergleich zur Kontrolle auf ca. 20 % reduziert (Abb. 15B). Um herauszufinden, an welchem Prozess AUF1 beteiligt ist, wurde das Rluc-Reporter-WNV-Replikon verwendet, mit dem man, wie oben beschrieben, zwischen Translation und Replikation unterscheiden kann (Abb. 15C). Die Effizienz der AUF1-Reduktion wurde 48 h nach Transfektion der siRNA verifiziert und die Rluc-Aktivität nach 3 h bzw. 48 h nach Transfektion des Reporter-

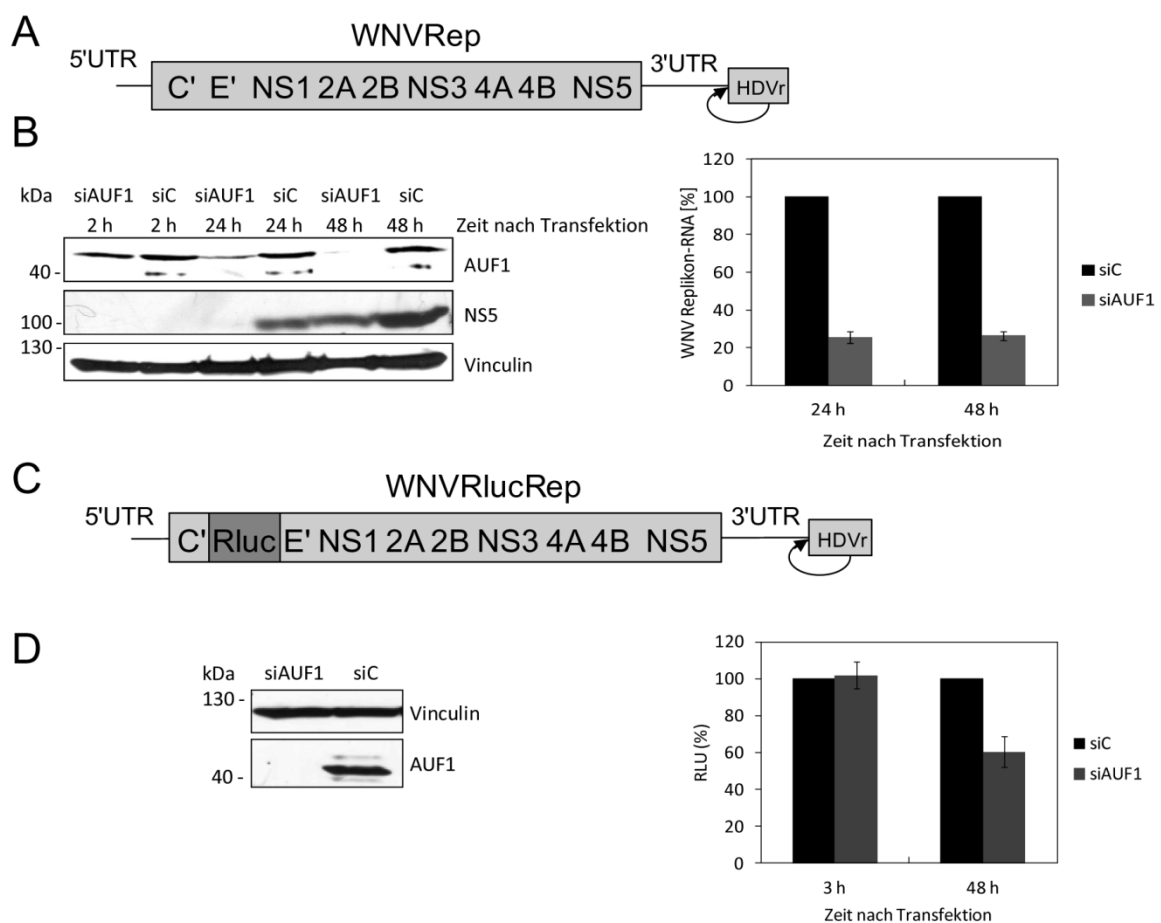


Abb. 15: Die Depletion von AUF1 vermindert die RNA-Replikation des WNV-Replikons *in vivo* (A) Schematische Darstellung des WNV-Replikons. (B) Huh7-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA bzw. mit einer siRNA gegen AUF1 transfiziert. Nach 48 h wurde die Replikon-RNA (300 ng) transfiziert. Die Proteinmengen von AUF1, NS5 und Vinculin wurden nach verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Die Quantität der viralen RNA wurde mit qRT-PCR quantifiziert. Das Ergebnis aus drei verschiedenen Experimenten ist gezeigt. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. (C) Schematische Darstellung des Rluc-Reporter-WNV-Replikons. (D) Huh7-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA bzw. mit einer siRNA gegen AUF1 transfiziert. Nach 72 h wurden die Proteinmengen von AUF1 und Vinculin analysiert und die Rluc-Reporter-Replikon-RNA (30 ng) transfiziert. Die Rluc-Aktivität wurde nach 3 und 48 h bestimmt. Das Ergebnis aus drei verschiedenen Experimenten ist gezeigt. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. RLU = relative light units.

Replikons bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Rluc-Aktivität in AUF1-depletierten Zellen nach 3 h im Vergleich zur Kontrolle unverändert war. Dagegen war nach 48 h ein Abfall der Rluc-Aktivität sichtbar, was auf eine Beteiligung von AUF1 an der Replikation und nicht an der Translation der viralen RNA schließen lässt (Abb. 15D).

3.5. Die RNAi-vermittelte Depletion von AUF1 in Huh7-Zellen verzögert die Vermehrung des West-Nil-Virus

Um die Beteiligung von AUF1 an der Replikation des WNV weiter zu bestätigen, wurde der Einfluss des Proteins auf eine Infektion mit dem WNV untersucht. Dazu wurden Huh7-Zellen 72 h nach RNAi-vermittelter Depletion von AUF1 im Vergleich zu *mock*-depletierten Kontrollzellen mit dem WNV-Stamm 3356 infiziert. Die Effizienz der Depletion von AUF1 wurde mittels Western Blot verifiziert (Abb. 16A). Die Expression von NS5 (und damit die Virusreplikation) wurde mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dabei wurde 24 und 48 h *post infection* (p.i.) deutlich, dass die Zahl der WNV-infizierten Zellen nach AUF1-Depletion im Vergleich zur Kontrolle erheblich reduziert war. Bei den Kontroll-Zellen zeigte sich 72 h p.i. zudem ein deutlicher cytopathischer Effekt (CPE), während dies bei den AUF1-depletierten Zellen nicht der Fall war (Abb. 16B). Nach 72 h p.i. war der Infektionsstatus der AUF1-depletierten Zellen auf dem Stand der Kontroll-Zellen 48 h p.i. Diese Experimente zeigen, dass AUF1 für eine effiziente Vermehrung des WNV notwendig ist und dass bei einer Reduktion von AUF1 eine Verzögerung des WNV-Infektionsverlaufes erfolgt.

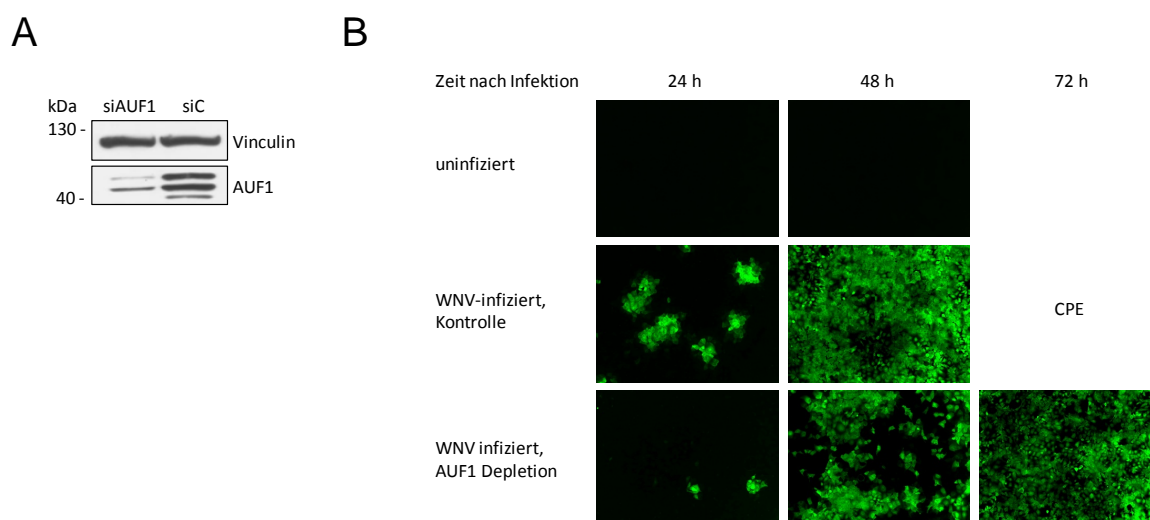


Abb. 16: Die Depletion von AUF1 verzögert die Vermehrung des WNV (A) Huh7-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA bzw. mit einer siRNA gegen AUF1 transfiziert. Nach 48 h wurden die Proteinmengen von AUF1 und Vinculin mittels Western Blot analysiert. **(B)** Huh7-Zellen wurden 72 h nach Depletion von AUF1 mit WNV-Stamm 3356 infiziert. Nach 24, 48 und 72 h wurde die Expression von NS5 mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Uninfizierte Huh7-Zellen dienten als Kontrolle. CPE = Cytopathischer Effekt.

3.6. FLAG-AUF1 Isoform p45 stimuliert die virale (-)-Strang-RNA-Synthese

Um die Beteiligung von AUF1 an der Replikation des WNV näher zu untersuchen, sollte das Protein ektopisch in Huh7-Zellen exprimiert werden. Es existieren vier verschiedene Isoformen von AUF1, die durch alternatives Spleißen eines einzigen Transkripts generiert werden (Wagner et al. 1998). Bezogen auf ihr Laufverhalten in einer SDS-PAGE werden sie als p37, p40, p42 und p45 bezeichnet (Abb. 17A). Entsprechend wurden die für die vier Isoformen kodierenden cDNAs durch Reverse Transkription aus Gesamt-RNA von Huh7-Zellen isoliert und in den Vektor pCDNA5/TO kloniert. Alle vier Isoformen, N-terminal mit einem FLAG-tag versehen, wurden dann individuell in Huh7-Zellen exprimiert und mit einem Anti-FLAG-Antikörper immunpräzipitiert. Die Elution der FLAG-AUF1-Fusionsproteine erfolgte durch Konkurrenz mit einem FLAG-Peptid (Abb. 17B). Die so eluierten FLAG-AUF1 Isoformen wurden nun auf stimulatorische Aktivität im *in vitro* RdRp-Assay getestet. Die Analyse ergab, dass die Komplementation des Assays mit den Isoformen p37, p40 und p42 keinen Einfluss auf die (-)-Strang-RNA-Synthese hatte. Dagegen führte die Komplementation mit FLAG-AUF1 Isoform p45 zu einer deutlichen Erhöhung der (-)-Strang-RNA-Synthese (Abb. 17C).

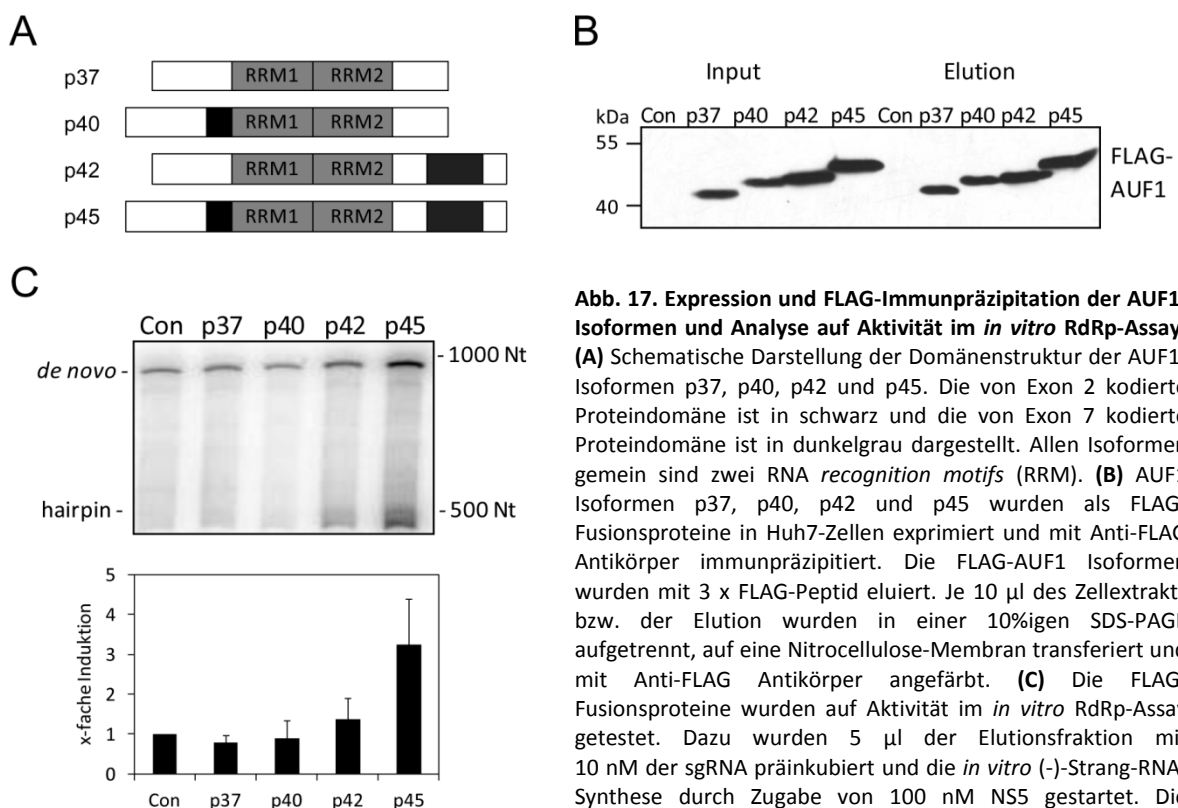


Abb. 17. Expression und FLAG-Immünpräzipitation der AUF1-Isoformen und Analyse auf Aktivität im *in vitro* RdRp-Assay. **(A)** Schematische Darstellung der Domänenstruktur der AUF1-Isoformen p37, p40, p42 und p45. Die von Exon 2 kodierte Proteindomäne ist in schwarz und die von Exon 7 kodierte Proteindomäne ist in dunkelgrau dargestellt. Allen Isoformen gemein sind zwei RNA *recognition motifs* (RRM). **(B)** AUF1 Isoformen p37, p40, p42 und p45 wurden als FLAG-Fusionsproteine in Huh7-Zellen exprimiert und mit Anti-FLAG Antikörper immunpräzipitiert. Die FLAG-AUF1 Isoformen wurden mit 3 x FLAG-Peptid eluiert. Je 10 µl des Zellextrakts bzw. der Elution wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit Anti-FLAG Antikörper angefärbt. **(C)** Die FLAG-Fusionsproteine wurden auf Aktivität im *in vitro* RdRp-Assay getestet. Dazu wurden 5 µl der Elutionsfraktion mit 10 nM der sgRNA präinkubiert und die *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese durch Zugabe von 100 nM NS5 gestartet. Die Reinigung und Analyse der RdRp-Produkte erfolgte wie unter 2.8.1. beschrieben. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse aus drei verschiedenen Experimenten. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

3.7. Rekombinantes AUF1p45 stimuliert die virale (-)-Strang-RNA-Synthese

Im Folgenden sollte nun überprüft werden, ob auch rekombinant aus *E. coli* gereinigtes AUF1p45 in ähnlicher Weise die virale (-)-Strang-RNA-Synthese *in vitro* unterstützt. Für die Expression und Reinigung von AUF1p45 (siehe 2.7.1.2.) wurde, wie schon für NS5 beschrieben, das pETSUMO-Expressionssystem verwendet. Die so gewonnene Isoform p45 von AUF1 wurde in einer 10%igen SDS-PAGE analysiert und zeigte keine Verunreinigungen mit anderen Proteinen (Abb. 18A). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration und des Verhältnisses der OD₂₈₀ zur OD₂₆₀ wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Der Koeffizient OD₂₈₀/OD₂₆₀ betrug 1.8 und implizierte, dass die Proteinpräparation frei von Nukleinsäuren war (Abb. 18B).

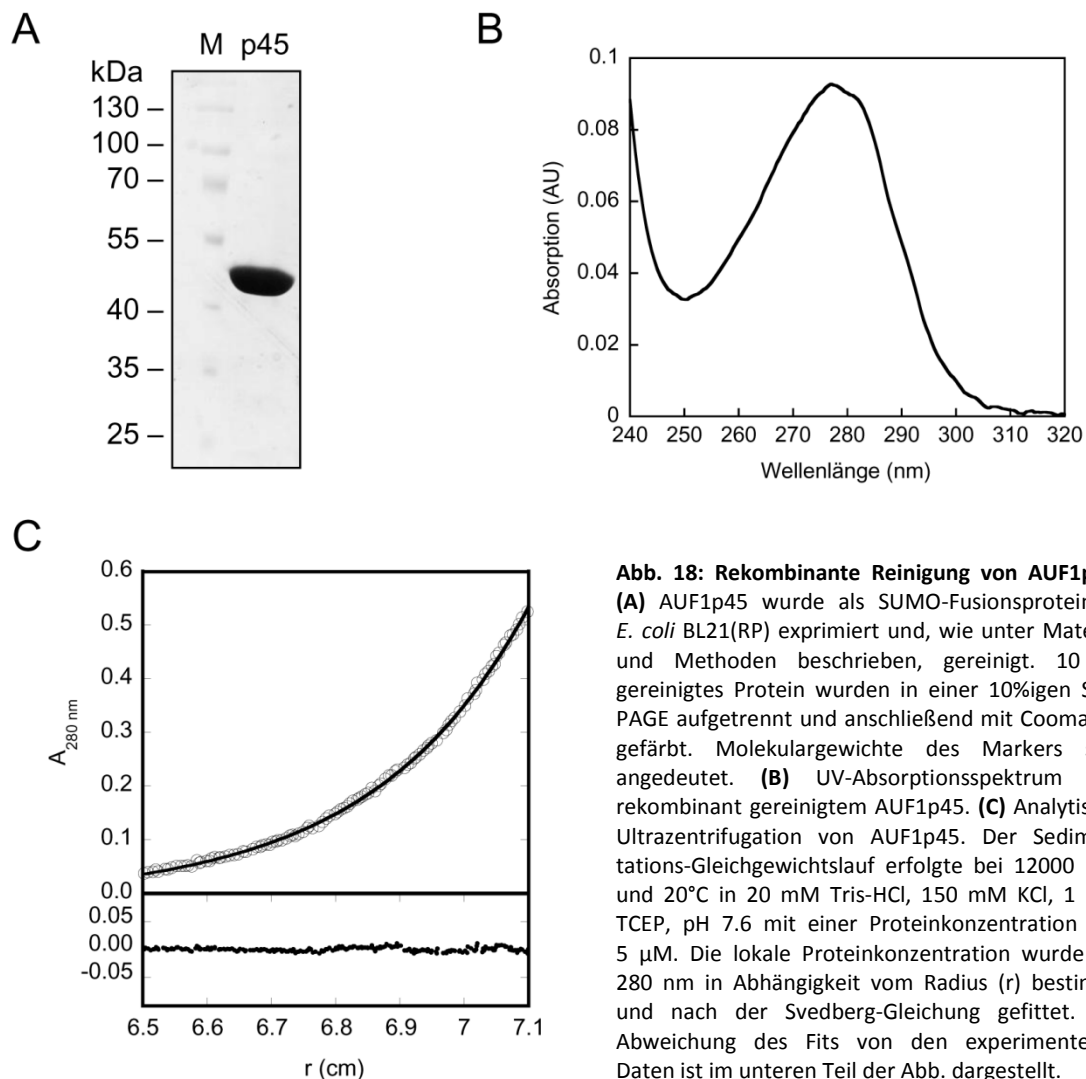


Abb. 18: Rekombinante Reinigung von AUF1p45. (A) AUF1p45 wurde als SUMO-Fusionsprotein in *E. coli* BL21(RP) exprimiert und, wie unter Material und Methoden beschrieben, gereinigt. 10 µg gereinigtes Protein wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Molekulargewichte des Markers sind angedeutet. (B) UV-Absorptionsspektrum von rekombinantem gereinigtem AUF1p45. (C) Analytische Ultrazentrifugation von AUF1p45. Der Sedimentations-Gleichgewichtslauf erfolgte bei 12000 rpm und 20°C in 20 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 1 mM TCEP, pH 7.6 mit einer Proteinkonzentration von 5 µM. Die lokale Proteinkonzentration wurde bei 280 nm in Abhängigkeit vom Radius (r) bestimmt und nach der Svedberg-Gleichung gefittet. Die Abweichung des Fits von den experimentellen Daten ist im unteren Teil der Abb. dargestellt.

Das Retentionsvolumen, bei dem AUF1p45 bei der abschließenden Gelfiltration während der Reinigungsprozedur eluierte, ließ auf ein monomeres Molekulargewicht schließen. Da dies widersprüchlich zur Literatur ist, die AUF1 als ein Dimer beschreibt (Zucconi et al. 2010), wurde das Molekulargewicht von AUF1p45 mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmt (durchgeführt von PD Dr. Hauke Lilie, Institut für Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg). Dabei wurde ein Molekulargewicht von 39.8 kDa bestimmt, welches mit dem theoretischen Molekulargewicht von 38.3 kDa gut übereinstimmt. Folglich liegt AUF1p45 in dem verwendeten Puffer als Monomer vor (Abb. 18C). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich das Laufverhalten von AUF1p45 in der Gelfiltration in verschiedenen Puffersystemen (Tris-, Phosphat-, HEPES- und MOPS-Puffer) nicht verändert, woraus sich schließen lässt, dass das Protein seinen monomeren Zustand auch unter anderen Pufferbedingungen beibehält (Daten nicht gezeigt).

Das gereinigte AUF1p45 wurde nun auf stimulatorische Aktivität im *in vitro* RdRp-Assay getestet. Dazu wurden ansteigende Konzentrationen von AUF1p45 mit 10 nM sgRNA kurz prä-inkubiert, bevor die Reaktion mit 100 nM NS5 gestartet wurde. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung der *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese von NS5 nach Komplementation mit AUF1p45 festgestellt werden. Bei 200 nM AUF1p45 wurde die maximale Stimulierung beobachtet, während bei noch höheren Konzentrationen (500 nM AUF1p45) der stimulatorische Effekt wieder aufgehoben wurde (Abb. 19A und B). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass AUF1p45 unabhängig von anderen Faktoren die (-)-Strang-RNA-Synthese durch NS5 signifikant stimuliert.

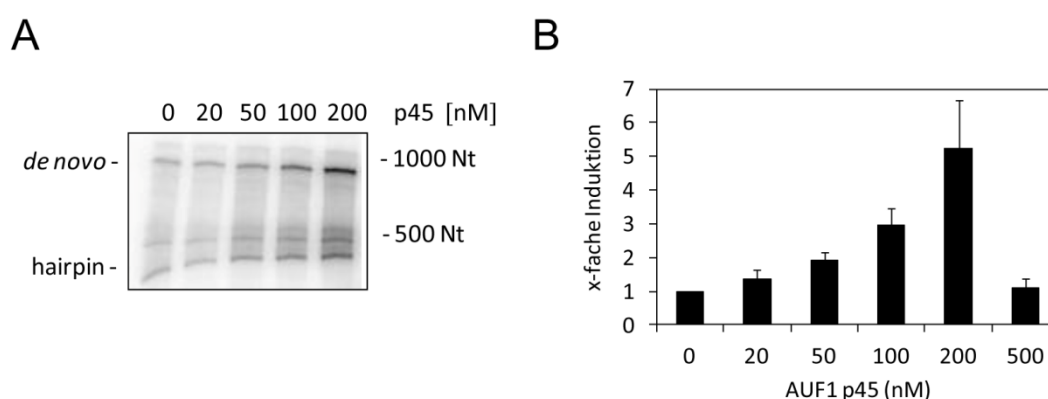


Abb. 19: Rekombinant gereinigtes AUF1p45 stimuliert die (-)-Strang-RNA-Synthese von NS5 (A) Das rekombinant exprimierte und gereinigte AUF1p45 aus *E. coli* wurde auf Aktivität im *in vitro* RdRp-Assay getestet. Dazu wurden ansteigende Konzentrationen von AUF1p45 mit 10 nM der sgRNA prä-inkubiert und die *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese durch Zugabe von 100 nM NS5 gestartet. Die radioaktiv-markierten RdRp-Produkte wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. **(B)** Die *de novo*-synthetisierten RNA-Produkte wurden mit Image Quant quantifiziert, wobei die Reaktion ohne AUF1p45 auf 1 gesetzt wurde. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse aus drei verschiedenen Experimenten. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

Anschließend wurde überprüft, ob AUF1p45 generell die *in vitro* RNA-Synthese von NS5 stimuliert. Dazu wurden die 5' oder die 3'UTR der WNV-RNA jeweils als RNA-Templates in dem *in vitro* RdRp-Assay eingesetzt. Mit beiden Templates konnte keine Steigerung der *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese von NS5 durch AUF1p45 festgestellt werden (Abb. 20A und B). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass beide Enden der viralen RNA notwendig für die stimulatorische Aktivität von AUF1p45 sind. Darüber hinaus wurde die RNA-Synthese von NS5 mit Poly(rC) als unspezifisches RNA-Templete in Abhängigkeit von AUF1p45 untersucht. Hierbei konnte ebenfalls keine signifikante Steigerung der *in vitro* RNA-Synthese nachgewiesen werden (Abb. 20C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass AUF1p45 keinen direkten Einfluss auf die Aktivität von NS5 hat.

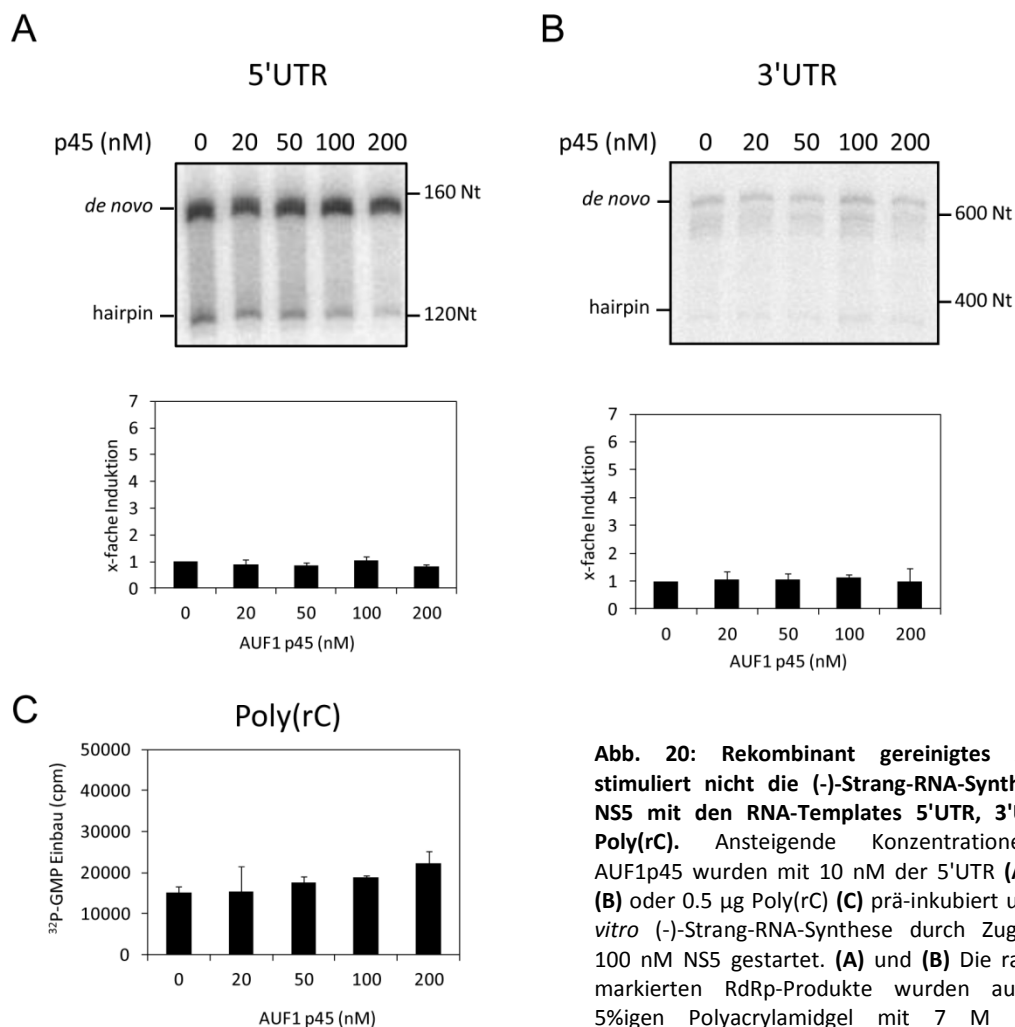


Abb. 20: Rekombinant gereinigtes AUF1p45 stimuliert nicht die (-)-Strang-RNA-Synthese von NS5 mit den RNA-Templates 5'UTR, 3'UTR und Poly(rC). Ansteigende Konzentrationen von AUF1p45 wurden mit 10 nM der 5'UTR (A), 3'UTR (B) oder 0.5 µg Poly(rC) (C) prä-inkubiert und die *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese durch Zugabe von 100 nM NS5 gestartet. (A) und (B) Die radioaktiv-markierten RdRp-Produkte wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die *de novo*-synthetisierten RNA-Produkte wurden mit Image Quant quantifiziert, wobei die Reaktion ohne AUF1p45 auf 1 gesetzt wurde. (C) Der Einbau an ³²P-GMP wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt. Die Diagramme zeigen die Ergebnisse aus drei verschiedenen Experimenten. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standard-abweichung.

3.8. AUF1p45 bindet mit hoher Affinität an die AU-reiche Region der 3'UTR der WNV-RNA

Um die molekularen Ursachen des stimulatorischen Effekts von AUF1p45 auf die *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese verstehen zu können, war es wichtig, das Protein auf eine mögliche Interaktion mit der viralen RNA hin zu untersuchen. Dazu wurden Filter-Bindungs-Assays mit verschiedenen viralen RNAs durchgeführt (Abb. 21A). Die RNAs wurden durch radioaktive *in vitro* Transkription generiert. Zunächst wurde die Interaktion zwischen AUF1p45 und der sgRNA, die als Template für den *in vitro* RdRp-Assay verwendet wurde, analysiert. Hierfür wurden 0.1 nM ³²P-markierte sgRNA mit ansteigenden Konzentrationen an rekombinantem, aus *E. coli* gereinigtem AUF1p45 bei RT für 30 min inkubiert. Die radioaktiven Signale wurden quantifiziert und gegen die Proteinkonzentration aufgetragen (Abb. 21B und C). Die Daten wurden mit Gleichung 1 (siehe 2.9.) analysiert. Auf diese Weise wurde eine Dissoziationskonstante von 34 nM für den sgRNA-AUF1p45-Komplex ermittelt (Abb. 21D). Um die Bindungsstelle von AUF1p45 innerhalb der ca. 800 Nt-langen sgRNA näher einzugrenzen, wurde die Interaktion zur 5'UTR und zur 3'UTR untersucht. Dabei zeigte sich, dass AUF1p45 eine höhere Affinität zur 3'UTR ($K_D = 11$ nM) als zur 5'UTR ($K_D = 290$ nM) aufweist (Abb. 21D). Die 3'UTR weist am 5'-Ende eine ca. 100 Nt lange AU-reiche Region auf (Abb. 21A). Die Dissoziationskonstante von AUF1p45 zu diesem RNA-Element betrug 16 nM. Dagegen wurde eine sgRNA, bei der ein Großteil der 3'UTR, inklusive der AU-reichen Region, deletiert wurde (sgRNA Δ AU), von AUF1p45 mit deutlich verminderter Affinität gebunden ($K_D = 328$ nM) (Abb. 21D). Somit konnte die AU-reiche Region der 3'UTR als ein RNA-Element identifiziert werden, welches AUF1p45 mit hoher Affinität bindet. Die 3'terminalen 111 Nt der 3'UTR (3'Cyc), welche den stark konservierten 3'SL enthalten, wurden mit einer Dissoziationskonstante von 151 nM gebunden (Abb. 21D). Diese Ergebnisse bestätigen die hohe Affinität von AUF1 zu *AU-rich elements* (AREs), die in den 3'UTRs zellulärer mRNAs häufig zu finden sind (siehe Diskussion). Jedoch wurde auch deutlich, dass AUF1 an andere Elemente der WNV-RNA bindet, wenn auch mit geringerer Affinität.

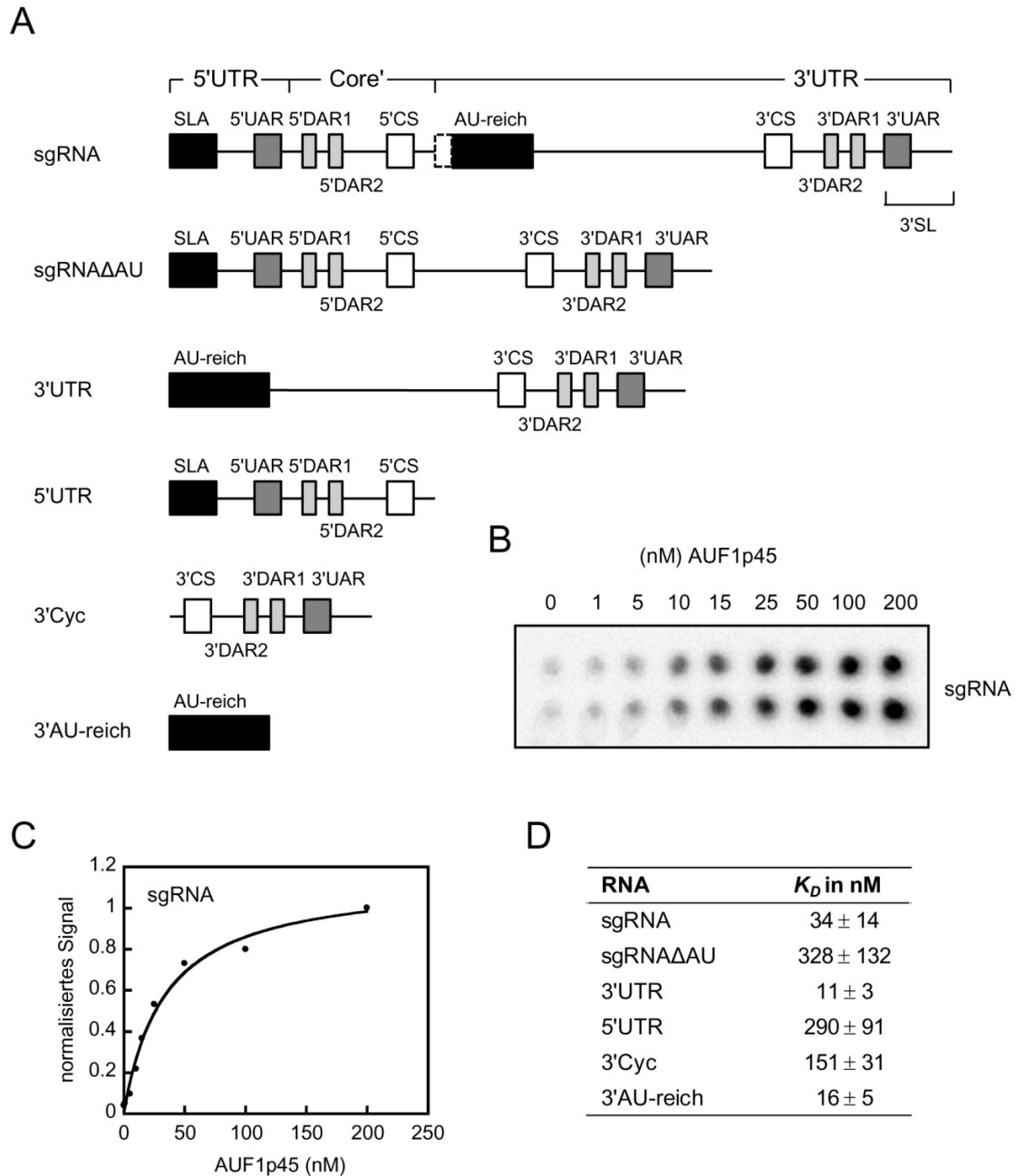


Abb. 21: AUF1p45 bindet mit hoher Affinität an die AU-reiche Region in der 3'UTR der WNV-RNA (A) Schematische Abb. der RNAs, die für den Filter-Bindungs-Assay eingesetzt wurden. **(B)** Repräsentativer Filter-Bindungs-Assay zur Analyse der Interaktion zwischen AUF1p45 und der sgRNA. 32 P-markierte sgRNA (0.1 nM) wurde mit ansteigenden Konzentrationen von AUF1p45 für 30 min bei RT inkubiert. Die RNA-Protein-Komplexe wurden mittels einer Dot-Blot Apparatur auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. **(C)** Die radioaktiven Signale, die von der Nitrocellulose-Membran zurückgehalten wurden, wurden mit *Image Quant* quantifiziert, gegen die Konzentration von AUF1p45 aufgetragen und mit Gleichung 1 analysiert (siehe 2.9.) **(D)** Zusammenfassung der ermittelten Dissoziationskonstanten (K_D) für die Interaktion von AUF1p45 mit den jeweiligen RNAs. Die Mittelwerte inklusive der Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten sind aufgeführt.

3.9. Einfluss der AU-reichen Region der 3'UTR auf die Replikation von WNV

3.9.1. Die AU-reiche Region der 3'UTR ist essentiell für die RNA-Replikation des WNV-Replikons

Da AUF1p45 spezifisch mit der AU-reichen Region der 3'UTR der WNV-RNA interagiert, wurde im Folgenden untersucht, ob diese Region des viralen Genoms wichtig für den RNA-Replikationsprozess ist. Dazu wurde die AU-reiche Region des WNV-Replikons deletiert. Die Deletion umfasst dabei die 5'-terminalen 99 Nukleotide der 3'UTR (Abb. 22A). Huh7-Zellen wurden mit dem WT-bzw. Δ AU-Replikon transfiziert und nach 3 h die virale RNA mittels qRT-PCR quantifiziert. Dabei konnte kein Unterschied in der Quantität der viralen RNA festgestellt werden, wodurch geschlossen werden konnte, dass die Deletion der AU-reichen Region keinen Einfluss auf die Stabilität der Replikon-RNA hat (Abb. 22B). Weiterhin wurden die Proteinmengen von NS5 24 und 48 h nach Transfektion der Replikon-RNAs mittels Western Blot analysiert. Im Vergleich zur Transfektion mit dem WT-Replikon konnte zu beiden Zeitpunkten kein NS5-Protein in Zellextrakten von Huh7-Zellen nachgewiesen werden, die mit der Δ AU-Replikon-RNA transfiziert wurden (Abb. 22C). Um herauszufinden, ob die Deletion der AU-reichen Region die Translation oder die Replikation beeinflusst, kam wiederum das Rluc-Reporter-Replikon zum Einsatz (Abb. 22D). Die Translation des Δ AU-Reporter-Replikons, repräsentiert durch die Rluc-Aktivität 3 h nach Transfektion, sank leicht auf ca. 80 % im Vergleich zum WT-Reporter Replikon. Im Gegensatz dazu konnte nach 24 und 48 h keine Rluc-Aktivität in Zellen nachgewiesen werden, die mit der Δ AU-Reporter-Replikon-RNA transfiziert wurden (Abb. 22E). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die AU-reiche Region essentiell für die Replikation des WNV ist. Diese Beobachtung ist besonders interessant, da in Experimenten mit dem Kunjin-Virus, einem Subtyp des WNV, gezeigt werden konnte, dass die AU-reiche Region nicht essentiell für die Kunjin-Virus-Replikation ist (Khromykh und Westaway 1997; Pijlman et al. 2008).

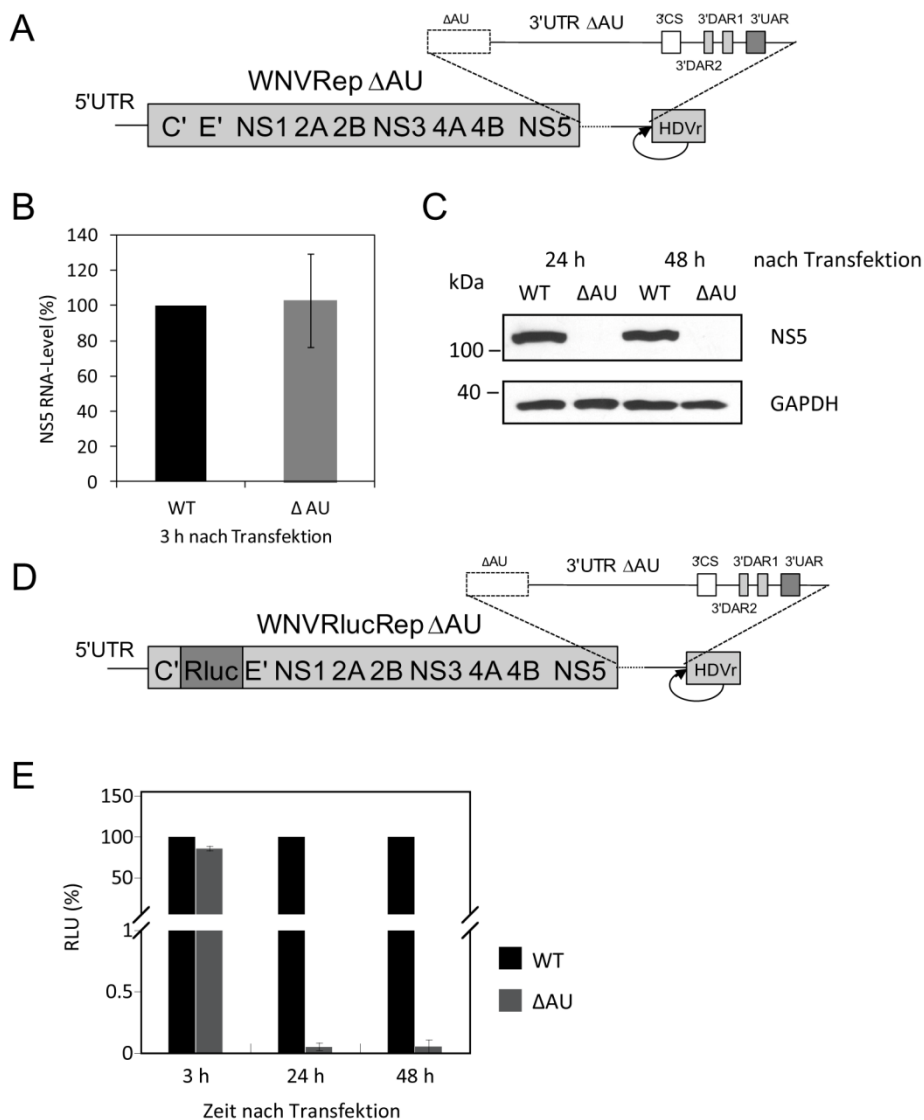


Abb. 22: Die AU-reiche Region der 3'UTR ist essentiell für die RNA-Replikation des WNV-Replikons *in vivo* (A) Schematische Darstellung des WNV-Replikons mit der Deletion der AU-reichen Region in der 3'UTR. **(B)** Huh7-Zellen wurden mit 100 fmol WT- bzw. ΔAU-Replikon transfiziert. Nach 3 h wurde die Replikon-RNA Menge mit qRT-PCR bestimmt. Das Ergebnis aus drei verschiedenen Experimenten ist gezeigt. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. **(C)** Die Proteinmengen von NS5 und GAPDH wurden 24 h und 48 h nach Transfektion der Replikon-RNAs mittels Western Blot analysiert. **(D)** Schematische Darstellung des ΔAU-Rluc-Reporter-WNV-Replikons. **(E)** Huh7-Zellen wurden mit 90 fmol WT- bzw. ΔAU-Reporter-Replikon transfiziert. Die Rluc-Aktivität wurde nach 3, 24 und 48 h bestimmt. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei verschiedenen Experimenten sind dargestellt. RLU = *relative light units*.

3.9.2. Die AU-reiche Region ist nicht essentiell für die AUF1p45-vermittelte Stimulierung der *in vitro* (-)-Strang RNA-Synthese durch NS5

Da die AU-reiche Region essentiell für die RNA-Replikation des WNV-Replikons *in vivo* ist und AUF1p45 spezifisch an diesen Bereich der viralen RNA bindet, sollte untersucht werden, ob die Interaktion von AUF1p45 mit der AU-reichen Region Voraussetzung für die zuvor festgestellte stimulatorische Aktivität des Proteins auf die (-)-Strang-RNA-Synthese ist. Dazu wurde ein *in vitro* RdRp-Assay, der als Template die sgRNA Δ AU enthielt, mit FLAG-getaggttem AUF1p45 komplementiert und das Ausmaß der stimulatorischen Aktivität mit der auf der

sgRNA verglichen. In beiden Fällen war FLAG-AUF1p45 in der Lage die *in vitro* (-)Strang-RNA-Synthese von NS5 zu stimulieren (Abb. 23A und B). Daraus lässt sich schließen, dass die Bindung von AUF1p45 an die AU-reiche Region nicht notwendig für dessen aktivierenden Effekt auf die *in vitro* (-)Strang-RNA-Synthese ist.

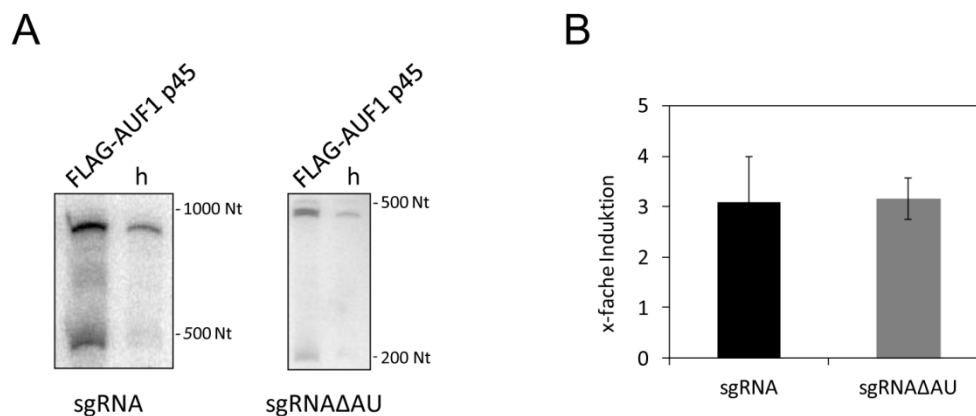


Abb. 23: Die Präsenz der AU-reichen Region in der WNV 3'UTR ist nicht essentiell für die stimulatorische Aktivität von AUF1p45 auf die RNA-Synthese durch NS5 (A) FLAG-AUF1p45 aus Huh7-Zellen wurde mit 10 nM sgRNA bzw. sgRNAΔAU prä-inkubiert und die *in vitro* (-)Strang-RNA-Synthese durch Zugabe von 100 nM NS5 gestartet. Die radioaktiv-markierten RdRp-Produkte wurden auf einem 5%igen Polyacryl-amidgel mit 7 M Harnstoff aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. (B) Die *de novo*-synthetisierten RNA-Produkte wurden mit *Image Quant* quantifiziert, wobei die Reaktion mit hitzeinaktiviertem FLAG-AUF1p45 (h) auf 1 gesetzt wurde. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse aus drei verschiedenen Experimenten. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

3.10. Identifizierung von PRMT1 und hnRNPH1 als AUF1-assoziierte Proteine

In den in Kapitel 3.6. beschriebenen Experimenten wurde das AUF1p45 ektopisch in Huh7-Zellen exprimiert und anschließend über eine FLAG-Immunpräzipitation aus dem Zellextrakt gereinigt und in dem *in vitro* RdRp-Assay eingesetzt. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob noch weitere zelluläre Proteine an AUF1p45 assoziiert sind. Dazu wurde das FLAG-AUF1p45 Immunpräzipitat aus Huh7-Zellen mittels Silberfärbung analysiert. Zusätzlich zu FLAG-AUF1p45 waren zwei weitere dominante Proteinbanden im Proteingel sichtbar (Abb. 24A). MS-Analyse identifizierte die co-präzipitierenden Proteine als *heterogeneous ribonucleoprotein H1* (hnRNPH1) und als *protein arginine methyltransferase 1* (PRMT1) (Daten nicht gezeigt, Abb. 24A). Die Co-Präzipitation von hnRNPH1 und PRMT1 mit AUF1 konnte mittels Western Blot bestätigt werden. Dazu wurden alle vier Isoformen von AUF1 in Huh7-Zellen exprimiert, mit Anti-FLAG-Antikörper präzipitiert und mit FLAG-Peptid eluiert. Die Anwesenheit von hnRNPH1 und PRMT1 wurde mit spezifischen Antikörpern gegen beide Proteine analysiert. Dabei zeigte sich, dass hnRNPH1 und PRMT1 nur mit den Isoformen p42 und p45 von AUF1 interagieren (Abb. 24B).

Um herauszufinden, ob hnRNPH1 und PRMT1 für die RNA-Replikation des WNV-Replikons wichtig sind, wurden beide Proteine in Huh7-Zellen depletiert. Die siRNA-vermittelte Reduktion der Proteinmenge von hnRNPH1 erwies sich dabei jedoch als cytotoxisch für die Zellen (Daten nicht gezeigt). Entsprechend wurde auf eine Analyse der viralen Replikation verzichtet. Die Depletion von PRMT1 hingegen hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen, somit konnten die Auswirkungen dieser Depletion auf die Replikation der viralen RNA untersucht werden. Die erfolgreiche Depletion von PRMT1 wurde zunächst mittels Western Blot bestätigt (Abb. 24C). Da PRMT1 die Hauptmethyltransferase in Zellen darstellt (siehe

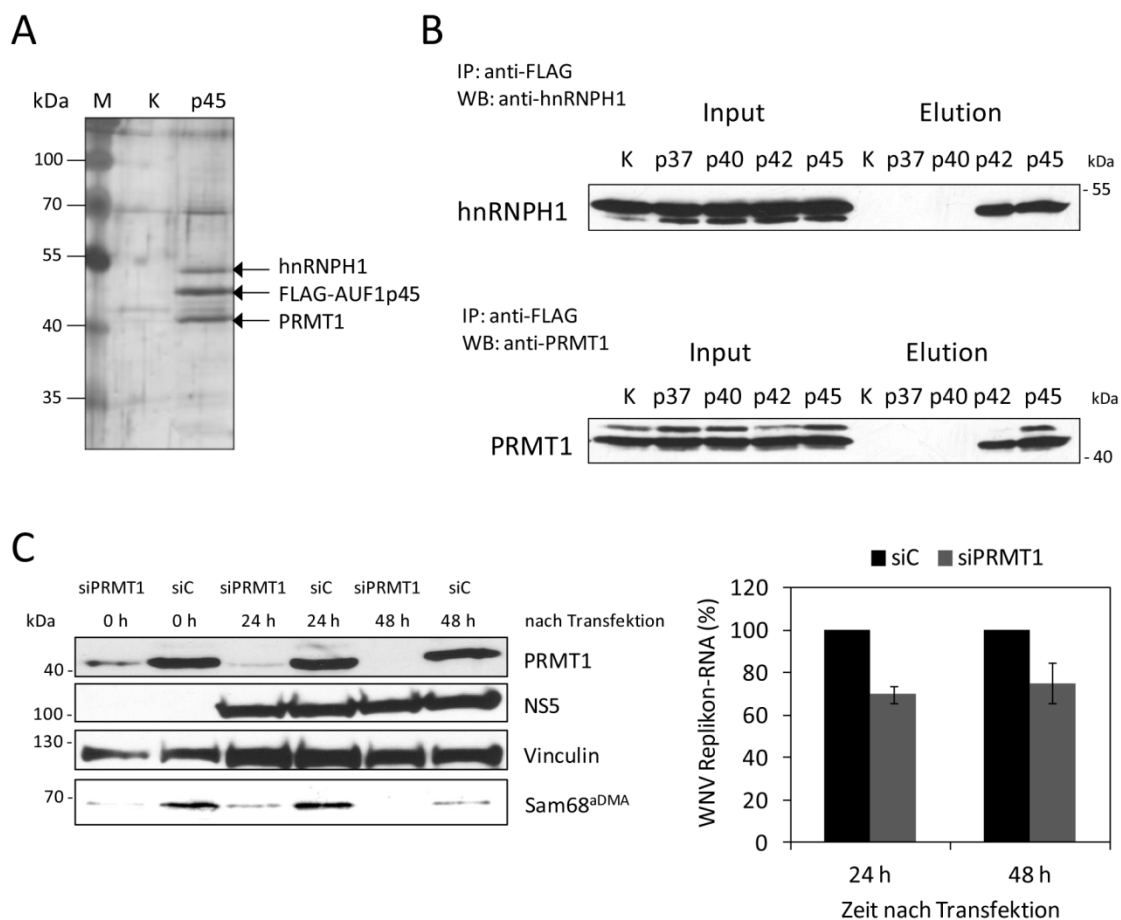


Abb. 24: PRMT1 und hnRNPH1 co-präzipitieren mit FLAG-AUF1p45 (A) AUF1 Isoform p45 wurde als FLAG-Fusionsprotein in Huh7-Zellen exprimiert, mit Anti-FLAG Antikörper immunpräzipitiert und mit 3 x FLAG-Peptid eluiert. 10 µl der Elution wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Die identifizierten Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Größen des Proteinmarkers sind indiziert. K = Kontroll-IP **(B)** AUF1 Isoformen p37, p40, p42 und p45 wurden als FLAG-Fusionsproteine in Huh7-Zellen exprimiert und mit Anti-FLAG Antikörper immunpräzipitiert. Die FLAG-AUF1 Isoformen wurden mit 3 x FLAG-Peptid eluiert. Je 10 µl des Zellextrakts bzw. der Elution wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit Anti-hnRNPH1 Antikörper bzw. Anti-PRMT1 Antikörper angefärbt. K = Kontroll-IP **(C)** Huh7-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA bzw. mit einer siRNA gegen PRMT1 transfiziert. Nach 48 h wurde die Replikon-RNA transfiziert. Die Proteinmengen von PRMT1, NS5, Vinculin und Sam68^{adMA} wurden nach verschiedenen Zeitpunkten mittels Western Blot analysiert. Die Quantität der viralen RNA wurde mit qRT-PCR quantifiziert. Das Ergebnis aus drei verschiedenen Experimenten ist gezeigt. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an.

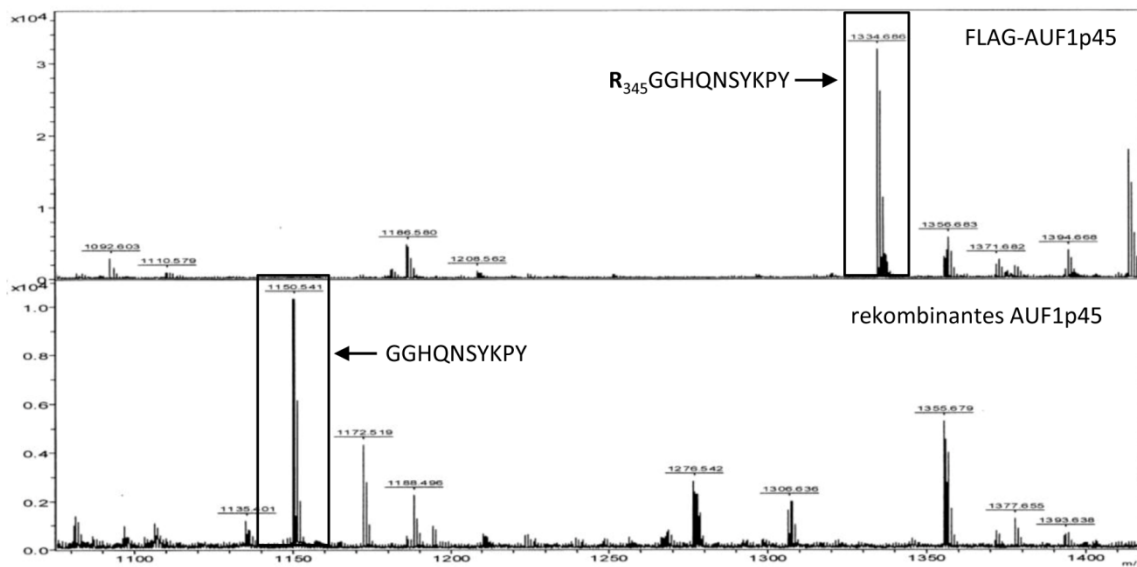
Diskussion), war es interessant zu überprüfen, ob die Reduktion von PRMT1 die Methylierung von zellulären Proteinen beeinflusst. Tatsächlich war nach Depletion von PRMT1 die Menge an methyliertem Sam68 (Sam68^{adMA}), einem Substrat von PRMT1 (Cote et al. 2003), im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA (siC) behandelt wurden, reduziert (Abb. 24C). 48 h nach Transfektion der siRNAs wurde das WNV-Replikon transfiziert und nach weiteren 24 und 48 h wurden Proben genommen. Die Proteinmenge von NS5 in PRMT1-depletierten Zellen erwies sich als unverändert im Vergleich zum Kontroll-*knockdown*, während die virale Replikon-RNA hingegen reduziert war (Abb. 24C). Diese Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung von PRMT1 an der Replikation der viralen RNA schließen.

3.11. Immunpräzipitiertes FLAG-AUF1p45 aus Huh7-Zellen ist methyliert

Da die Methyltransferase PRMT1 mit immunpräzipitiertem FLAG-AUF1p45 assoziiert ist, war es interessant zu untersuchen, ob das in Huh7-Zellen transient exprimierte FLAG-getaggte AUF1p45 methyliert ist. Der Methylierungsstatus von FLAG-AUF1p45 sollte durch Massenspektrometrie untersucht werden. Dazu wurde das aus Huh7-Zellen präzipitierte FLAG-AUF1p45 mit etwa gleichen Mengen an rekombinanten in *E. coli* exprimiertem und gereinigtem AUF1p45 auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt, die korrespondierenden Proteinbanden ausgeschnitten und mit Trypsin behandelt. Die Behandlung mit Trypsin, welches nach Lysin und Arginin im Protein schneidet, ergibt ein für das Protein spezifisches Peptidspektrum. Die Peptidfragmente wurden mittels MALDI-TOF-TOF von Dr. Angelika Schierhorn (Institut für Biochemie, MLU Halle-Wittenberg) analysiert. Rekombinantes AUF1p45 aus *E. coli* diente hierfür als nicht-methylierte Referenzprobe. Der Einbau einer Dimethylgruppe erzeugt einen Massenunterschied von ca. 30 Masseinheiten. Ein wichtiger Aspekt bei der Analyse der Peptidfragmente ist die Beobachtung, dass Trypsin unter den hier verwendeten Bedingungen nicht nach dimethyliertem Arginin proteolytisch gespalten wird. Aufgrund dieser Tatsache konnte die Dimethylierung von FLAG-AUF1p45 an Position 345 eindeutig nachgewiesen werden. Die Referenzprobe zeigte einen Peak bei 1150.528 Masseinheiten, welcher dem Peptid GGHQNSYKPY entsprach und welcher in der Analyse von FLAG-AUF1p45 nicht nachgewiesen werden konnte. Dagegen war hierbei ein Peak mit 1334.686 Masseinheiten sichtbar, der in der Referenzprobe nicht zu detektieren war (Abb. 25A und B). Der Massenunterschied zwischen beiden Peaks entspricht genau der Masse eines dimethylierten Arginins (ca. 184 Da). Dementsprechend repräsentiert dieser Peak das dimethylierte Fragment R₃₄₅GGHQNSYKPY. Die Analyse weiterer Peptide, die ein Arginin enthielten, ergab, dass diese in der rekombinanten Referenzprobe bzw. in der Probe des FLAG-getaggten AUF1p45 mit vergleichbaren Intensitäten nachgewiesen wurden. Daraus

lässt sich schließen, dass diese Arginine von FLAG-AUF1p45 nicht methyliert sind (Abb. 25B). Somit konnte nur das Arginin an Position 345 als zweifelsfrei dimethyliert identifiziert werden (zusammengefasst in Abb. 25C und D).

A



B

Peptid	Masse [M+H] ⁺	absolute Intensität	
		FLAG-AUF1p45	rekombinantes AUF1p45
(R ₃₄₄)R ₃₄₅ GGHQNSYKPY	1334.686	34732.372	n.n.
(R ₃₄₅)GGHQNSYKPY	1150.528	n.n.	10362.970
(K)IDASKNEEDEGHSNSSPR ₈₅	1971.864	23797.241	11445.111
(K)NEEDEGHSNSSPR ₈₅	1457.589	12986.715	5512.590
(R ₈₅)HSEAATAQR ₉₄	970.470	3856.767	3051.263
(R ₈₅)HSEAATAQR ₉₄ EEWK	1542.730	10418.964	13140.332
(R ₁₃₈)GFGFVLFK	914.513	2362.795	5469.340

C

MSEEQFGGDGAAAAATAAVGGSAGEQEGAMVAATQGAAAAAGSGAGTGGGTASGGTEGGS
 AESEGAIDASKNEEDEGHSNSSPR₈₅HSEAATAQR₉₄EEWKFIGLSWDTTKDLKDYFSKFG
 VVDCTLKLDLPITGRSR₁₃₈GFGFVLFKESVVDKVMQKEHKLNGKVIDPKR_{AKAMKTKEPVKKIFV}
 GGLSPDTPEEKIR_{EYFGGFEVESIELPMDNKTNR}RGFCFITFKEEPPVKKIMEKKYHNVGLSKCE
 IKVAMSKEQYQQQQWGSRRGGFAGRRGRGGGPSQNWNQGYSNYWNQGYGNYGYN
 SQGYGGYGGYDYTYNNYYGYGDYSNQQSGYGKVSRR₃₄₅GGHQNSYKPY

D

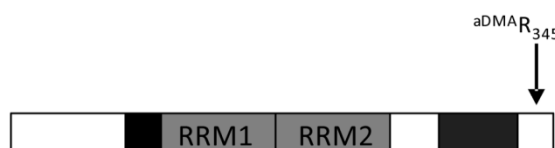


Abb. 25: Massenspektrometrische Analyse von AUF1p45 (A) Repräsentatives Massenspektrum von AUF1p45 zum Nachweis der Dimethylierung an Position R₃₄₅. FLAG-AUF1p45 aus Huh7-Zellen und rekombinantes AUF1p45 aus *E. coli* wurden über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und die entsprechenden Proteinbanden ausgeschnitten. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mittels MALDI-TOF-TOF (siehe 2.7.15.). Die Peaks, die dimethyliertes Arginin (FLAG-AUF1p45 aus Huh7-Zellen) bzw. nicht-methyliertes Arginin (rekombinantes AUF1p45 aus *E. coli*) an Position 345 nachweisen, sind mit einem Pfeil markiert. **(B)** Übersicht über die Arginine von AUF1p45, deren Methylierungsstatus nachgewiesen werden konnte. **(C)** Aminosäuresequenz von AUF1p45. Alle Arginine sind fettgedruckt. Die Arginine von AUF1p45, die als nicht-methyliert identifiziert wurden, sind unterstrichen und mit ihrer Position angegeben. Das Arginin an Position 345 mit einer nachgewiesenen Dimethylierung ist kursiv dargestellt. Der Methylierungsstatus aller anderen Arginine ist unklar. **(D)** Schematische Darstellung von AUF1p45 mit der nachgewiesenen Dimethylierung an Position 345.

3.12. PRMT1 methyliert AUF1p45 *in vitro*

3.12.1. Reinigung der PRMT1 Isoformen v1, v2, v3 und v5 rekombinant aus *E. coli*

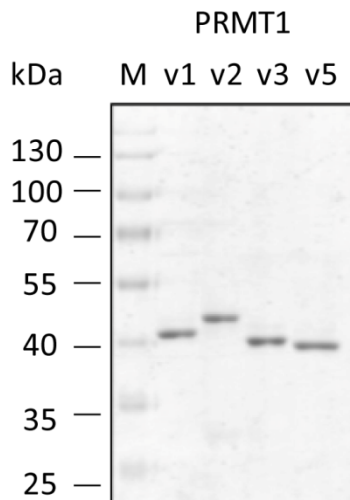
Mit Hilfe der folgenden Experimente sollte herausgefunden werden, ob PRMT1 in der Lage ist, AUF1p45 zu methylieren. Es existieren sieben verschiedene Isoformen von PRMT1, die durch alternatives Spleißen eines einzigen Transkripts generiert werden. In humanen Leberzellen werden die Isoformen v1, v2, v3 und v5 exprimiert (Goulet et al. 2007). Diese Isoformen sind deshalb von Interesse, da die WNV-Replikon-Experimente in humanen Hepatomzellen durchgeführt wurden. Die Expression bzw. Co-präzipitation weiterer Isoformen mit AUF1p45, zusätzlich zur Haupt-Isoform v1, konnte durch die Analyse mittels Western Blot bereits gezeigt werden. Dabei konnten neben PRMT1 v1 noch weitere Proteinbanden mit einem geringeren bzw. größeren Molekulargewicht detektiert werden (Abb. 24B). Die Isoformen unterscheiden sich in ihrer Sequenz am N-Terminus (Abb. 26A). Es konnte gezeigt werden, dass diese variablen N-Termini die verschiedenen PRMT1-Isoformen in ihrer katalytischen Aktivität bzw. ihrer Substratspezifität beeinflussen (Goulet et al. 2007). Dementsprechend wurden alle in Leberzellen exprimierten Isoformen als rekombinante Proteine aus *E. coli* gereinigt (siehe 2.7.1.3.), um ihre Aktivität hinsichtlich einer Methylierung von AUF1p45 zu charakterisieren.

Die so gewonnenen Isoformen v1, v2, v3 und v5 von PRMT1 wurden in einer 10%igen SDS-PAGE analysiert und zeigten keine Verunreinigungen mit anderen Proteinen (Abb. 26B). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration und des Verhältnisses der OD₂₈₀ zur OD₂₆₀ wurden Absorptionsspektren aufgenommen. Der Koeffizient OD₂₈₀/OD₂₆₀ lag für alle Isoformen im Bereich von ca. 1.6 und implizierte, dass die Proteinpräparationen weitestgehend frei von Nukleinsäuren waren (Abb. 26C, Daten nicht gezeigt).

A

Isoform v1	M — AAAEAANCIM —————	EVSCGQAESSEKPN AEDMTSKDY YFDSYAHF
Isoform v2	M — AAAEAANCIMENFVATLANGMSLQPPLE	EVSCGQAESSEKPN AEDMTSKDY YFDSYAHF
Isoform v3	MVGVA —————	EVSCGQAESSEKPN AEDMTSKDY YFDSYAHF
Isoform v5	M —————	EVSCGQAESSEKPN AEDMTSKDY YFDSYAHF

B



C

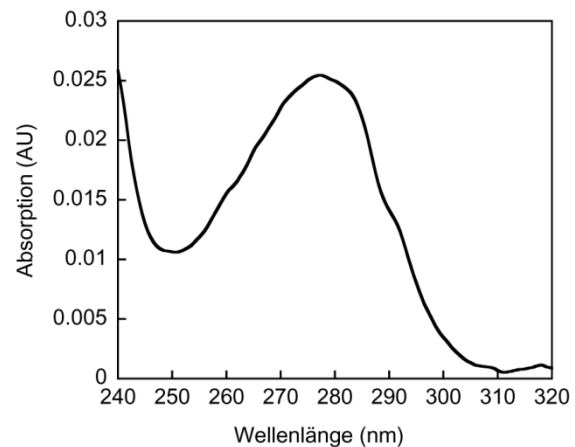


Abb. 26: Rekombinante Reinigung der PRMT1 Isoformen v1, v2, v3 und v5. (A) Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der N-termini der PRMT1 Isoformen v1, v2, v3 und v5. (B) Die PRMT1 Isoformen wurden als SUMO-Fusionsproteine in *E. coli* BL21(RP) exprimiert und, wie unter Material und Methoden beschrieben, gereinigt. 1 µg gereinigtes Protein wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Molekulargewichte des Markers sind indiziert. (C) UV-Absorptionsspektrum von rekombinant gereinigtem PRMT1 v1.

3.12.2. Die PRMT1-Isoformen v1, v2, v3 und v5 methylieren AUF1p45 *in vitro*

Um zu untersuchen, ob AUF1p45 ein Substrat von PRMT1 ist, wurde ein radioaktiver *in vitro* Methylierungsassay durchgeführt. Dazu wurde AUF1p45 mit PRMT1 v1 in Anwesenheit von ¹⁴C-S-Adenosylmethionin als Substrat in Abhängigkeit von der Zeit inkubiert. Zur Analyse der Reaktionen wurden die Proteine auf einer 10%igen SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie analysiert. Die Quantifizierung der in AUF1p45 eingebauten ¹⁴C-Methylgruppen ergab ein Plateau der Reaktion nach ca. 2 h (Abb. 27A). Um die Aktivität verschiedener Isoformen von PRMT1 mit AUF1p45 als Substrat zu vergleichen, wurde der gleiche Assay parallel mit den PRMT1 Isoformen v1, v2, v3 und v5 durchgeführt. Alle hier getesteten Isoformen von PRMT1 zeigten dabei die gleiche katalytische Aktivität. Die Quantifizierung der Reaktion ergab, dass ca. 4.5 Methylgruppen pro Molekül AUF1p45 eingebaut wurden (Abb. 27B). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass PRMT1 *in vitro* AUF1p45 methyliert und legen nahe, dass die Methyltransferase auch für die Methylierung von AUF1p45 in Huh7-Zellen verantwortlich ist.

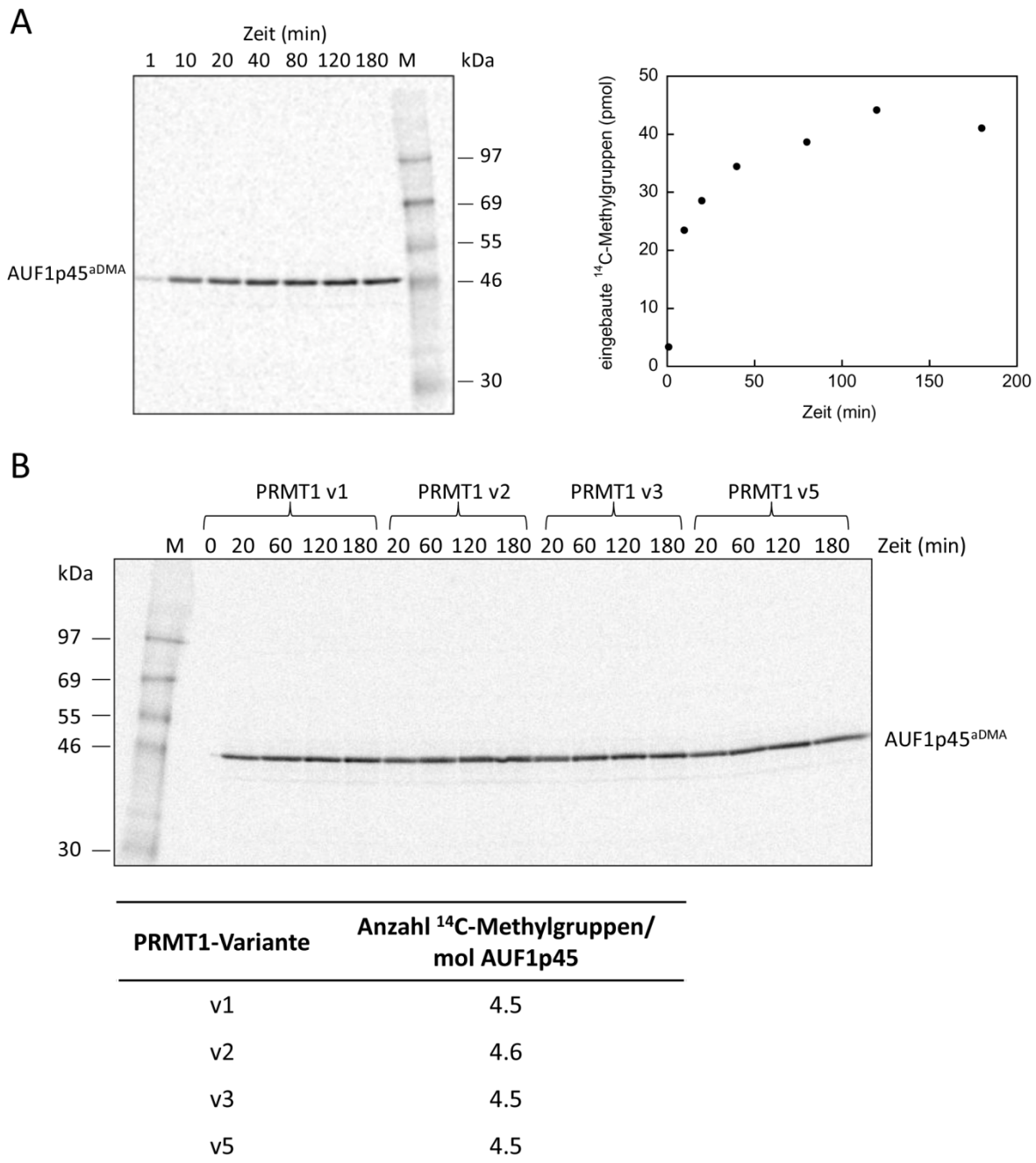


Abb. 27: PRMT1 methyliert AUF1p45 *in vitro* (A) Radioaktive *in vitro* Methylierung von AUF1p45 mit PRMT1 v1. 13 pmol AUF1p45 wurden von 5 pmol PRMT1 v1 in Anwesenheit von 40 μ M ¹⁴C-S-adenosylmethionin methyliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt und auf einer 10%igen SDS-PAGE analysiert. Die Detektion der radioaktiv markierten Proteine erfolgte mittels Autoradiographie. Die Markergrößen in kDa sind indiziert. Die eingebauten ¹⁴C-Methylgruppen wurden mittels *Image Quant* quantifiziert. (B) Radioaktive *in vitro* Methylierung von AUF1p45 mit verschiedenen PRMT1-Isoformen. Die Durchführung und Analyse erfolgte wie unter (A) beschrieben. Die eingebauten ¹⁴C-Methylgruppen pro mol AUF1p45 wurden mittels *Image Quant* quantifiziert und sind unterhalb des Gels aufgeführt.

3.12.3. Reinigung von rekombinantem, methyliertem AUF1p45 aus *E. coli*

Für die folgenden Experimente sollte AUF1p45 rekombinant und methyliert (im Folgenden als AUF1p45^{aDMA} bezeichnet) aus *E. coli* gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurde der ORF von *PRMT1v1*, inklusive einer Ribosomenbindestelle (RBS), *upstream* des *SUMO-AUF1p45*-ORFs im Expressionsvektor pETSUMOadapt kloniert. Die räumliche Nähe des Stoppcodons von *PRMT1v1* und der RBS *upstream* von *SUMO-AUF1p45* sollte eine bicistronische Expression beider Proteine in *E. coli* ermöglichen, mit dem Ziel der Methylierung von AUF1p45 durch PRMT1 während der Expression (Abb. 28A). Nach vierstündiger Induktion der Genexpression wurde zusätzlich der Translationsinhibitor Erythromycin hinzugefügt, um eine effiziente Methylierung von AUF1p45 durch PRMT1 v1 zu erreichen. Die Reinigung von AUF1p45^{aDMA} erfolgte analog zum nicht-methylierten Protein. Dabei wurden die unterschiedlichen Affinitäten des methylierten und nicht-methylierten AUF1p45 zu Heparin-

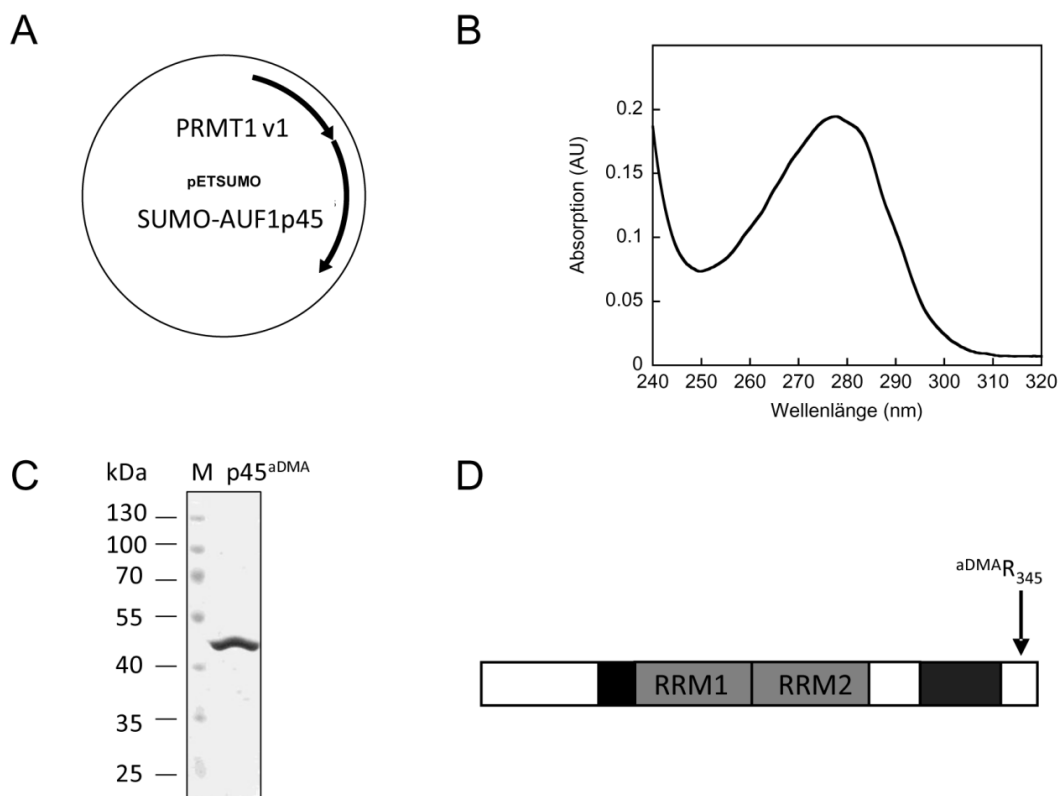


Abb. 28: Rekombinante Herstellung einer methylierten Variante von AUF1p45 (A) Schematische Darstellung des Plasmidkonstruktes zur bicistronischen Expression von PRMT1 v1 und SUMO-AUF1p45. Das Gen, welches für PRMT1 v1 kodiert, wurde inklusive einer Ribosomenbindestelle (RBS) *upstream* der RBS des ORFs kloniert, welcher für SUMO-AUF1p45 kodiert. (B) UV-Absorptionsspektrum von rekombinantem gereinigtem und methyliertem AUF1p45 (AUF1p45^{aDMA}). (C) Die Reinigung von AUF1p45^{aDMA} erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben. 3 µg gereinigtes Protein wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Molekulargewichte des Markers sind indiziert. (D) Schematische Darstellung von AUF1p45^{aDMA} mit dem durch Massenspektrometrie identifizierten dimethylierten Arginin an Position 345.

Sepharose ausgenutzt, um beide Varianten (nicht-methyliert und methyliert) voneinander zu trennen. Die so gewonnene methylierte Variante von AUF1p45 wurde in einer 10%igen SDS-PAGE analysiert und zeigte keine Verunreinigungen mit anderen Proteinen (Abb. 28C). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration und des Verhältnisses der OD₂₈₀ zur OD₂₆₀ wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Der Koeffizient OD₂₈₀/OD₂₆₀ betrug 1,8, sodass die Proteinpräparation als frei von Nukleinsäuren angesehen werden konnte (Abb. 28B). Die Methylierung von AUF1p45^{aDMA} wurde durch Massenspektrometrie überprüft und bestätigte die Dimethylierung des Arginins an Position 345 (Daten nicht gezeigt, schematisch dargestellt in Abb. 28D). Eine weitere Möglichkeit das Ausmaß der Methylierung eines Proteins zu untersuchen, ist eine radioaktive Methylierung von bereits methyliertem Protein, um die Aktivität von PRMT1 auf diesem Substrat mit der Aktivität auf nicht-methyliertem Protein zu vergleichen. Dieser Test ergab, dass PRMT1 v1 mit FLAG-AUF1p45 aus Huh7-Zellen bzw. mit rekombinant gereinigtem AUF1p45^{aDMA} als Substrat nur noch eine Restaktivität aufwies im Vergleich zu einem Methylierungsassay mit nicht-methyliertem AUF1p45 (Abb. 29). Dies zeigt zum einen, dass die mit einer Co-Expression von PRMT1 v1 gewonnene Variante von AUF1p45 aus *E. coli* nahezu vollständig methyliert ist. Zum anderen belegt es, dass in Huh7-Zellen exprimiertes FLAG-AUF1p45 ebenfalls vollständig methyliert vorliegt.

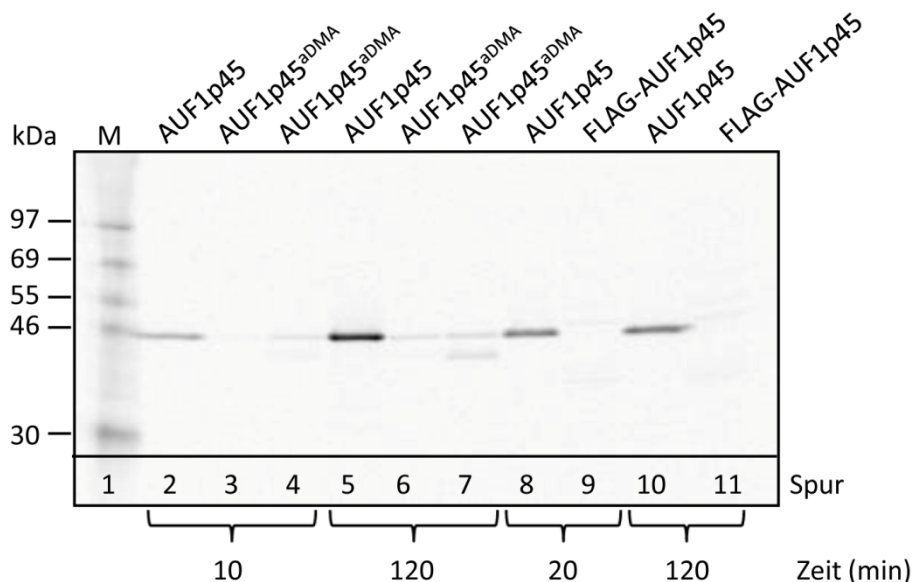


Abb. 29: FLAG-AUF1p45 aus Huh7-Zellen und AUF1p45^{aDMA} aus *E. coli* liegen nahezu vollständig methyliert vor. 13 pmol AUF1p45 (Spur 2 und 5) bzw. AUF1p45^{aDMA} aus zwei verschiedenen Proteinpräparationen (Spur 3, 4, 6 und 7) wurden von 5 pmol PRMT1 v1 in Anwesenheit von 40 μ M ¹⁴C-S-adenosylmethionin methyliert. Außerdem wurden 5 pmol AUF1p45 (Spur 8 und 10) bzw. FLAG-AUF1p45 aus Huh7-Zellen (Spur 9 und 11) unter gleichen Bedingungen methyliert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt und auf einer 10%igen SDS-PAGE analysiert. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte mittels Autoradiographie.

3.13. Reinigung einer pseudophosphorylierten Variante von AUF1p45 rekombinant aus *E. coli*

Die Phosphorylierung an Serin, Threonin und Tyrosin ist eine posttranslationale Modifikation, die Auswirkungen auf die Eigenschaften von Proteinen haben kann. Mehrere posttranslationale Phosphorylierungen von AUF1p45 sind in den letzten Jahren identifiziert worden (siehe Diskussion). Davon sind zwei Phosphorylierungsstellen an Position 190 (Serin) und 193 (Threonin) im RNA *recognition motif* 2 (RRM2) lokalisiert (Abb. 30A). Da diese Modifikation die Protein-RNA-Interaktion beeinflussen könnte, war es interessant, die Auswirkung einer pseudophosphorylierten Variante von AUF1p45 auf die Bindung zur viralen RNA näher zu untersuchen. Um eine pseudophosphorylierte Variante zu generieren, wurden Aminosäuren ausgetauscht, um die Größe und Ladung von Phosphatgruppen nachzuahmen. Dazu wurden Mutationen durch ortsgerichtete Mutagenese in das Expressionsplasmid von AUF1p45 eingeführt, welche zum Austausch der Aminosäuren an Position 190 (Serin zu Glutamat) und 193 (Threonin zu Aspartat) in AUF1p45 führten (Abb. 30A). Die Reinigung

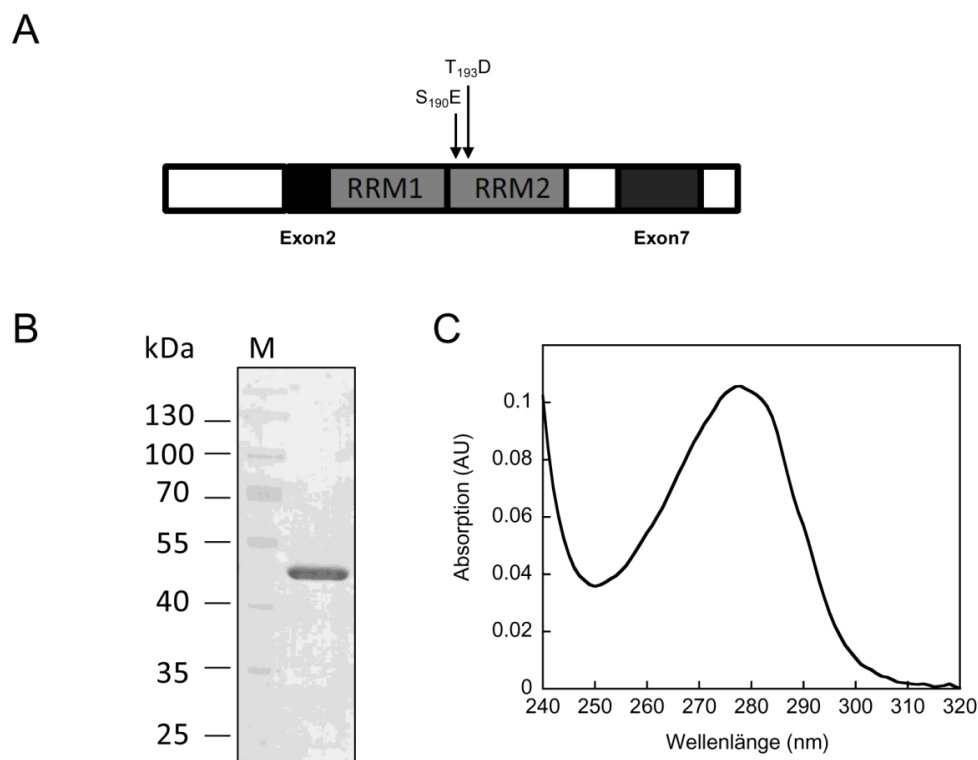


Abb. 30: Reinigung einer pseudophosphorylierten Variante von AUF1p45 rekombinant aus *E. coli*. (A) Schematische Darstellung von AUF1p45 mit dem Austausch von Aminosäuren an Position 190 (Serin zu Glutamat) und 193 (Threonin zu Aspartat). (B) AUF1p45 S₁₉₀E/T₁₉₃D wurde als SUMO-Fusionsprotein in *E. coli* BL21(RP) exprimiert und, wie unter Material und Methoden beschrieben, gereinigt. 2 µg gereinigtes Protein wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Molekulargewichte des Markers sind indiziert. (C) UV-Absorptionsspektrum von rekombinantem gereinigtem AUF1p45 S₁₉₀E/T₁₉₃D.

dieser pseudophosphorylierten Variante von AUF1p45 wurde analog zu der des WT-Proteins durchgeführt. Die so gewonnene Variante AUF1p45 S₁₉₀E/T₁₉₃D wurde in einer 10%igen SDS-PAGE analysiert und zeigte keine Verunreinigungen mit anderen Proteinen (Abb. 30B). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration und des Verhältnisses der OD₂₈₀ zur OD₂₆₀ wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Der Koeffizient OD₂₈₀/OD₂₆₀ betrug 1.9 und implizierte, dass die Proteinpräparation frei von Nukleinsäuren war (Abb. 30C).

3.14. Posttranslationale Modifikationen beeinflussen die RNA-Bindung von AUF1p45

Die Varianten AUF1p45^{adMA} und AUF1p45 S₁₉₀E/T₁₉₃D sollten zunächst in ihrer Fähigkeit RNA zu binden mit unmodifizierten AUF1p45 verglichen werden. Dazu wurden radioaktive Filter-Bindungs-Assays, wie unter 3.8. beschrieben, mit den AUF1p45-Varianten durchgeführt. Die methylierte Variante wies eine ähnliche Affinität zur sgRNA wie das nicht-methylierte Protein auf. Darüber hinaus hatten alle AUF1p45-Proteine eine vergleichbare Affinität zur AU-reichen Region der WNV 3'UTR mit einem K_D -Wert von ca. 20 nM. Dagegen war die Affinität der Varianten zu den 3'-terminalen 111 Nt der WNV-RNA (3'Cyc) im Vergleich zum unmodifizierten Protein verändert. AUF1p45^{adMA} interagiert mit einem K_D von 25 nM sechsfach besser mit der 3'Cyc-RNA, während die RNA-Bindung von AUF1p45 S₁₉₀E/T₁₉₃D ca. drei- bis vierfach stärker war. Des Weiteren konnte für die Variante AUF1p45^{adMA} eine verstärkte Bindung an die 5'UTR gezeigt werden. Im Vergleich zum unmodifizierten AUF1p45 ($K_D = 290$ nM) war der K_D -Wert von AUF1p45^{adMA} zur 5'UTR um Faktor 16 besser ($K_D = 18$ nM) (Tabelle 7). Diese Daten verdeutlichen eine erhöhte RNA-Bindung der methylierten Variante von AUF1p45 zu den viralen 5'- und 3'-Enden der viralen RNA, welche im Bereich der Affinität für AU-reiche Sequenzen lag. Da die MS-Analyse des immunpräzipitierten FLAG-AUF1p45 aus Huh7-Zellen keine Phosphorylierung des Proteins identifizieren konnte, wurde der Fokus im Folgenden auf eine vergleichende Analyse der methylierten mit der nicht-methylierten Variante gelegt.

Tabelle 7. Bindungsaffinitäten verschiedener AUF1p45-Varianten zu WNV-RNAs

RNA	K_D in nM		
	AUF1p45 ^a	AUF1p45 ^{aDMA}	AUF1p45 S ₁₉₀ E/T ₁₉₃ D
sgRNA	34 ± 14	22 ± 10	n. d.
sgRNAΔAU	328 ± 132	n. d.	n. d.
3'UTR	11 ± 3	n. d.	n. d.
5'UTR	290 ± 91	18 ± 5	n. d.
3'Cyc	151 ± 31	25 ± 15	42 ± 6
3' AU-reich	16 ± 5	21 ± 10	17 ± 4

^a Die K_D -Werte sind zum Vergleich aus Abb. 21D übernommen. Die Mittelwerte inklusive der Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten sind aufgeführt. n.d. = nicht durchgeführt.

3.15. Methyliertes AUF1p45 stimuliert die RNA-Synthese effizienter im Vergleich zu nicht-methyliertem AUF1p45

Nachdem deutlich war, dass AUF1p45^{aDMA} eine verstärkte RNA-Bindung zur 5'UTR und zur 3'Cyc-RNA des WNV aufweist, sollte überprüft werden, ob dies Auswirkungen auf die stimulatorische Aktivität der (-)-Strang-RNA-Synthese im *in vitro* RdRp-Assay hat. Der *in vitro* RdRp-Assay wurde unter den gleichen Bedingungen wie unter 3.7. (Abb. 19) beschrieben durchgeführt. Jedoch war die Fähigkeit der methylierten Variante von AUF1p45 die RNA-Synthese von NS5 zu aktivieren zunächst nicht verändert im Vergleich zum nicht-methylierten Protein (Abb. 31A). Die Salzkonzentration bei der Prä-Inkubation der sgRNA mit AUF1p45 bzw. AUF1p45^{aDMA} betrug 25 mM KCl. Die im Filter-Bindungs-Assay detektierten Unterschiede der RNA-Bindung beider Proteine wurden jedoch bei einer erhöhten Salzkonzentration ermittelt. Da bekannt ist, dass die Ionenstärke einen Einfluss auf die Protein-RNA-Interaktion haben kann, wurden die Bedingungen im *in vitro* RdRp-Assay denen des Filter-Bindungs-Assays angepasst, d.h., die Konzentration an KCl wurde auf 120 mM erhöht. Unter diesen getesteten Bedingungen stimulierte die methylierte Variante von AUF1p45^{aDMA} die RNA-Synthese von NS5 in einem deutlich größeren Ausmaß im Vergleich zum nicht-methylierten AUF1p45 (Abb. 31B). Dieser Unterschied beruht vor allem auf einer verminderten Fähigkeit des nicht-methylierten AUF1p45 die RNA-Replikation bei der höheren Ionenstärke zu stimulieren.

Einem weiteren Ansatz, um einen funktionellen Unterschied zwischen AUF1p45 und AUF1p45^{aDMA} festzustellen, lag die Idee zugrunde, dass AUF1p45 mit der AU-reichen Region der 3'UTR konkurrieren muss, um die stimulatorische Aktivität zu vermitteln. Aufgrund der Klonierungsstrategie des für die sgRNA kodierenden Plasmids, ist jedoch nicht die gesamte

AU-reiche Region in diesem Template vorhanden (siehe 3.1.2.). Um herauszufinden, inwiefern sich die stimulatorische Aktivität verändert, wenn die gesamte AU-reiche Region in der sgRNA enthalten ist, wurden die 20 fehlenden Nt der AU-reichen Region in das Plasmid eingeführt, welches für die sgRNA kodiert (Abb. 31C). Anschließend wurde ein *in vitro* RdRp-Assay mit dieser sgRNA^{mod} als Template mit 200 nM AUF1p45 bzw. AUF1p45^{aDMA} komplementiert und wiederum unter Standardbedingungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die methylierte Variante AUF1p45^{aDMA} im Vergleich zum nicht-methylierten AUF1p45 die *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese durch NS5 deutlich effizienter stimulieren kann (Abb. 31D). Die Ursache dafür ist wahrscheinlich in der höheren Affinität von AUF1p45^{aDMA} zu den viralen 5'- und 3'-Termini, im Vergleich zum nicht-methylierten AUF1p45, zu finden.

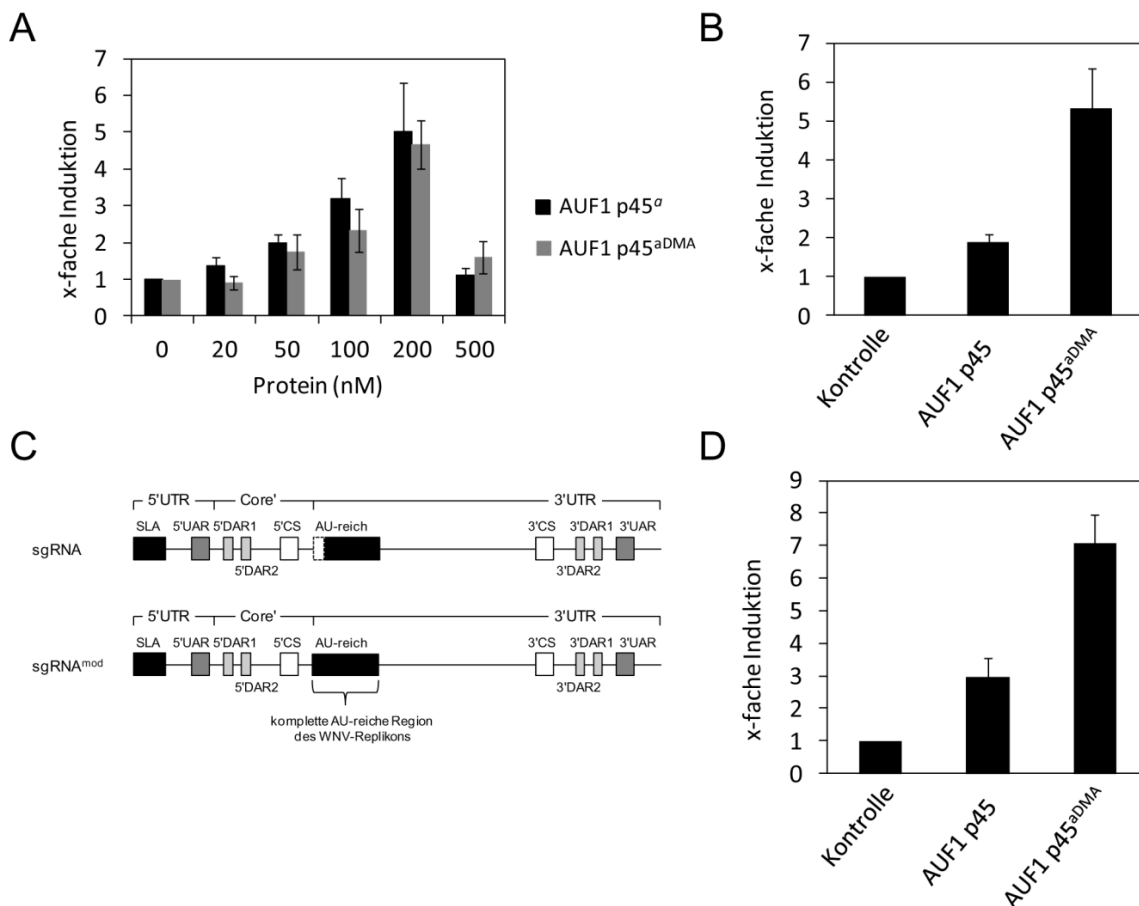


Abb. 31: AUF1p45^{aDMA} stimuliert im Vergleich zum nicht-methylierten AUF1p45 die (-)-Strang-RNA-Synthese durch NS5 effizienter. (A) Rekombinant gereinigtes AUF1p45^{aDMA} aus *E. coli* wurde im *in vitro* RdRp-Assay getestet. Dazu wurden ansteigende Konzentrationen von AUF1p45^{aDMA} mit 10 nM der sgRNA präinkubiert und die *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese durch Zugabe von 100 nM NS5 gestartet. Die radioaktiv-markierten RdRp-Produkte wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die *de novo*-synthetisierten RNA-Produkte wurden mit *Image Quant* quantifiziert, wobei die Reaktion ohne AUF1p45^{aDMA} auf 1 gesetzt wurde. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse aus drei verschiedenen Experimenten. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. ^aDie Daten für AUF1p45 wurden zum Vergleich aus Abb. 19 übernommen. (B) Der *in vitro* RdRp-Assay wurde mit 200 nM AUF1p45 bzw. AUF1p45^{aDMA} wie unter (A) komplementiert und durchgeführt. Jedoch wurde die Salzkonzentration der des Filter-Bindungs-Assays angepasst (120 mM KCl). (C) Schematische Darstellung der sgRNA bzw. der sgRNA^{mod}, die die vollständige AU-reiche Region des WNV-Replikons enthält. (D) Der *in vitro* RdRp-Assay wurde mit 200 nM rekombinant gereinigtem AUF1p45 bzw. AUF1p45^{aDMA} wie unter (A) komplementiert und durchgeführt. Jedoch wurde anstelle der sgRNA die sgRNA^{mod} als Template verwendet.

3.16. AUF1p45 unterstützt die Interaktion der 5'-3'-UAR-Zyklisierungssequenzen in einem Fluoreszenz-basierten RNA-*annealing*-Assay

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass AUF1p45, höchstwahrscheinlich durch Bindung an die virale RNA, die *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese durch NS5 auf einer sgRNA des WNV stimuliert. Die nächsten Experimente waren darauf ausgerichtet, den molekularen Mechanismus, der dieser von AUF1p45 vermittelten Stimulierung zugrunde liegt, näher zu charakterisieren. Der Ausgangspunkt für die folgenden Experimente waren experimentelle Daten, die indizierten, dass AUF1p45 in der Lage ist *stem-loop*-Strukturen zu destabilisieren (persönliche Mitteilung Dipl.-Biochemiker Tobias Schmidt). Ausgehend von dieser Beobachtung wurde versucht, diese Aktivität von AUF1p45 in das etablierte Zyklisierungsmodell flaviviraler RNA einzuordnen. Bei der Zyklisierung der viralen RNA sind strukturelle Veränderungen in der RNA Voraussetzung, damit komplementäre Zyklisierungssequenzen eine RNA-RNA-Interaktion eingehen können (siehe Einleitung, schematisch dargestellt in Abb. 32A). Die 5'- und 3'UAR-Zyklisierungssequenzen sind beide in *stem-loop*-Strukturen angeordnet. Damit es zu einer 5'-3'UAR-Basenpaarung kommt, müssen diese *stem-loop*-Strukturen (SLB bzw. 3'SL) zum Teil aufgelöst werden. Um zu testen, ob AUF1p45 diese Zyklisierungsreaktion beeinflussen kann, wurde ein Fluoreszenz-basierter RNA-*annealing*-Assay mit künstlichen RNA-Molekülen etabliert, der insbesondere die 5'-3'-UAR-Interaktion (5'-3'-*annealing*) nachstellen sollte (Abb. 32A). Die Cy5-markierte 3'SL^{trunc}-RNA entspricht dem unteren Teil des 3'SL und enthält die 3'UAR-Sequenz. Zusätzlich zum Cy5-Marker ist die RNA mit einem *black-hole*-Quencher (BHQ) am 3'-Ende markiert. Bildet die RNA die native *stem-loop*-Struktur aus, so löscht der BHQ das Fluoreszenz-Signal von Cy5 und es kann nur eine schwache Fluoreszenz detektiert werden (statisches *quenching*). Die zweite RNA ist unmarkiert und entspricht im wesentlichen der 5'UAR-Sequenz. Interagieren beide RNAs miteinander, so wird ein räumlicher Abstand zwischen dem Cy5-Fluorophor und dem BHQ induziert, wodurch das Fluoreszenzsignal ansteigt (*dequenching*, Abb. 32B).

Zur Durchführung des Assays wurden 10 nM 3'SL^{trunc} in Reaktionspuffer equilibriert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 nM 5'UAR-RNA und die Fluoreszenz wurde für 400 s verfolgt. Die Fluoreszenzintensität stieg dabei in Abhängigkeit von der Zeit an, woraus sich schließen lässt, dass beide RNAs miteinander interagieren (Abb. 33A). Zum Nachweis der Spezifität des Assays wurde außerdem eine Kontrollreaktion durchgeführt, in der die 5'UAR-RNA durch eine unspezifische RNA vergleichbarer Länge (miR592) ersetzt wurde. In dieser Reaktion blieb das Fluoreszenzsignal über die Zeit konstant, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Zunahme der Fluoreszenz bei Zugabe der 5'UAR durch eine spezifische Interaktion mit der 3'SL^{trunc}-RNA hervorgerufen wurde (Abb. 33A). Die Entfaltung des *stem-*

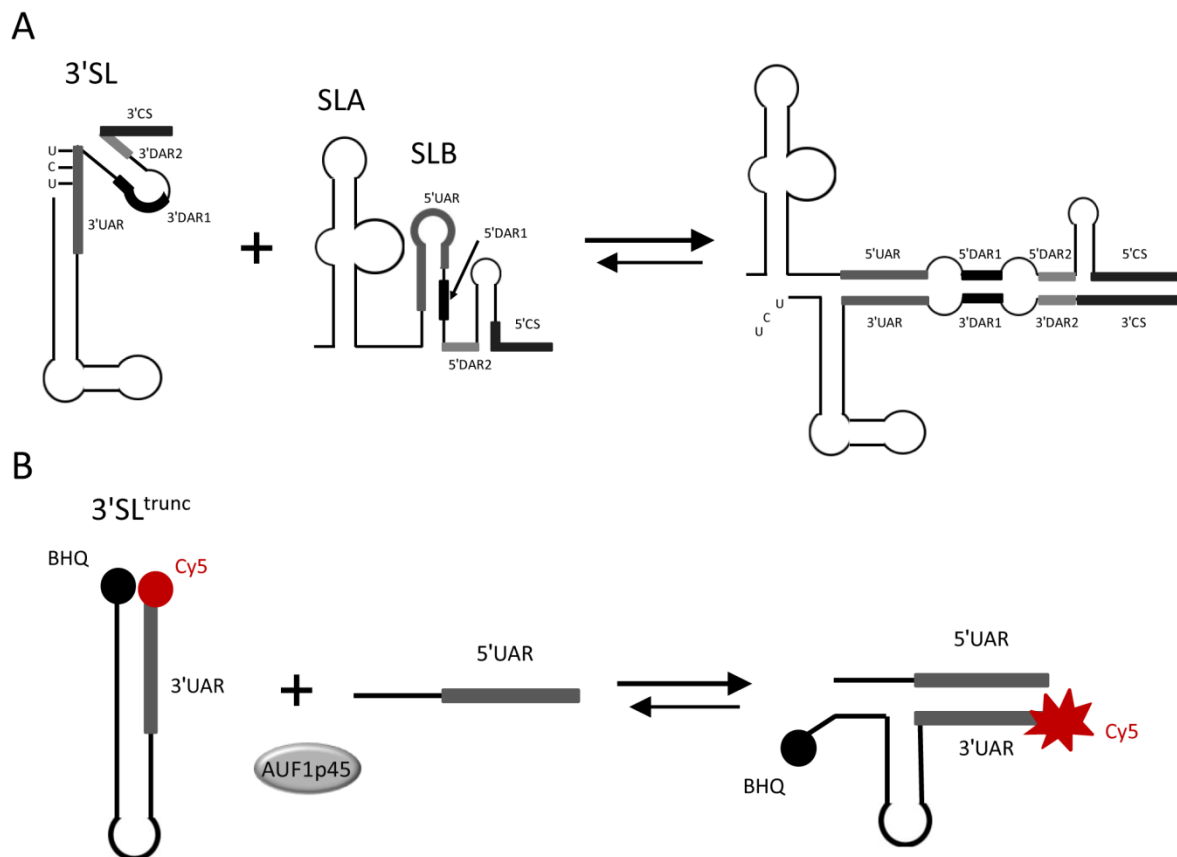


Abb. 32: Schematische Darstellung der Zyklisierung der WNV-RNA und des darauf basierten RNA-annealing-Assays. (A) Dargestellt sind der terminale 3'-SL sowie die 5'UTR der WNV-RNA, inklusive der Zyklisierungssequenzen CS, UAR, DAR1 und DAR2. Damit die komplementären RNA-Bereiche der UAR, DAR1 und DAR2-Sequenzen interagieren können, muss eine strukturelle Umlagerung der *stem-loops* 3'SL und SLB induziert werden. (B) Die Cy5-markierte 3'SL^{trunc}-RNA ist vom terminalen 3'SL abgeleitet und enthält die 3'UAR-Sequenz. Zusätzlich enthält sie am 3'-Ende einen *black-hole*-Quencher (BHQ). Die nicht markierte zweite RNA enthält die 5'UAR-Sequenz. Interagieren beide RNAs miteinander, so wird der räumliche Abstand des Cy5-Fluorophors zum BHQ erhöht und das Fluoreszenzsignal nimmt zu (*dequenching*).

loops war der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, da die apparente Geschwindigkeitskonstante unabhängig von der Konzentration der 3'SL^{trunc}-RNA war (Daten nicht gezeigt). Somit wurde die Interaktion beider RNAs in Abhängigkeit von der Zeit nach einer Reaktion 1. Ordnung mit Gleichung 2 analysiert. Dabei ergab sich eine Geschwindigkeitskonstante k_{obs} von 0.0062 s^{-1} (Abb. 33B und C).

Um den Einfluss von AUF1p45 auf die RNA-annealing-Reaktion, d.h. auf die Interaktion der 5'-3'UAR-Zyklisierungssequenzen, zu untersuchen, wurden steigende Konzentrationen von AUF1p45 (20 – 480 nM) mit der 3'SL^{trunc}-RNA für 100 s präinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der 5'UAR-RNA und die Reaktion wurde wiederum für 400 s verfolgt. Mit zunehmender Konzentration an AUF1p45 war dabei ein Anstieg der Geschwindigkeitskonstante zu beobachten, d.h., die Entfaltung des *stem-loops* war nicht mehr der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Dementsprechend wurden die Daten nach einer Reaktion 2. Ordnung mit Gleichung 3 ausgewertet. Bei einer Konzentration von 100 und

240 nM AUF1p45 lief die Reaktion vier- bzw. zehnmals so schnell ab wie die Reaktion ohne Protein (Abb. 33B und C). Bei sehr hohen Konzentrationen von AUF1p45 (480 nM) war, nachdem ein Maximum der Fluoreszenz erreicht wurde, ein Abfall der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit zu verzeichnen (Abb. 33B). Aufgrund fehlender Datenpunkte am Anfang der Reaktion wurde auf die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante verzichtet. Mit diesem Assay konnte gezeigt werden, dass AUF1p45 in der Lage ist den *stem-loop* der 3'SL^{trunc}-RNA zu destabilisieren. Aufgrund dieser RNA-Chaperone-Aktivität von AUF1p45 wird die Interaktion der 5'- und 3'UAR-Sequenzen beschleunigt.

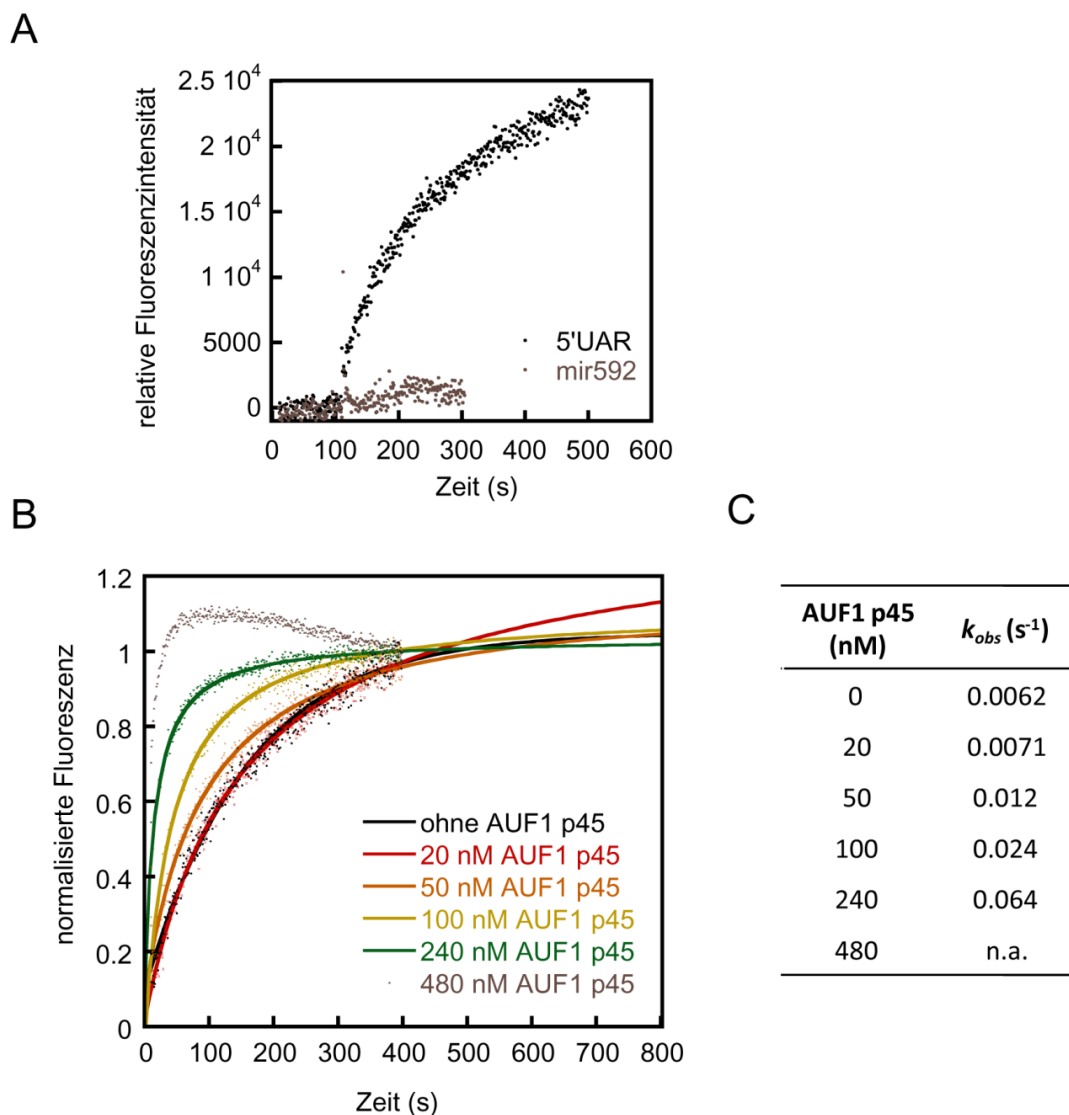


Abb. 33: AUF1p45 stimuliert die virale 5'-3'UAR-Interaktion in einem Fluoreszenz-basierten RNA-annealing-Assay. (A) 10 nM der Cy5-markierten 3'SL^{trunc}-RNA wurden für 100 s in Reaktionspuffer bei 22°C äquilibriert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 nM nicht markierter 5'UAR bzw. einer unspezifischen RNA (mir592). Die Reaktion wurde für 400 s verfolgt. (B) 10 nM der Cy5-markierten 3'SL^{trunc}-RNA wurden mit steigenden Konzentrationen an AUF1p45 für 100 s präinkubiert. Anschließend wurden 100 nM nicht markierte 5'UAR hinzugefügt und die Reaktion über 400 s verfolgt. Die Fluoreszenzsignale wurden normalisiert, gegen die Zeit aufgetragen und nach einer Reaktion 1. Ordnung (ohne Protein) bzw. 2. Ordnung (mit AUF1p45) mit dem Programm KaleidaGraph analysiert. (C) Zusammenfassung der Geschwindigkeitskonstanten aus (B). Die Reaktionsgeschwindigkeit für die Reaktion mit 480 nM AUF1p45 wurde aufgrund von fehlenden Datenpunkten am Anfang der Reaktion nicht analysiert. n.a. = nicht analysiert.

3.16.1. Die 5'-3'-UAR-Interaktion wird durch die methylierte Variante von AUF1p45 im Vergleich zu nicht-methyliertem AUF1p45 effizienter beschleunigt

Im folgenden Experiment sollten die methylierte und die pseudophosphorylierte Variante von AUF1p45 in ihrer Fähigkeit die RNA-RNA-Interaktion zu beschleunigen untersucht und mit dem unmodifizierten AUF1p45 verglichen werden. Die Versuchsdurchführung war identisch mit der für das unmodifizierte AUF1p45. Die methylierte Variante verstärkte dabei im Vergleich zum unmodifizierten AUF1p45 die RNA-RNA-Interaktion noch effizienter. Während das nicht-methylierte AUF1p45 bei einer Konzentration von 50 nM die RNA-RNA-Interaktion zweifach zu beschleunigen vermochte ($k_{obs} = 0.012 \text{ s}^{-1}$), betrug die Geschwindigkeitskonstante von AUF1p45^{aDMA} bei der gleichen Konzentration ein 14-faches ($k_{obs} = 0.087 \text{ s}^{-1}$) der Geschwindigkeitskonstante ohne Protein ($k_{obs} = 0.0062 \text{ s}^{-1}$) (Abb. 34A und C). Dagegen bewegten sich die Geschwindigkeitskonstanten der pseudophosphorylierten Variante AUF1p45 S₁₉₀E/T₁₉₃D im Bereich des unmodifizierten Proteins (Abb. 34B und C).

Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten wurden im Folgenden gegen die Proteinkonzentration von AUF1p45 sowie der beiden Varianten AUF1p45^{aDMA} und AUF1p45 S₁₉₀E/T₁₉₃D aufgetragen (Abb. 35A). Die Auftragung macht deutlich, dass die Reaktion in Anwesenheit von AUF1p45 nicht einem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung gehorcht, d.h. das Entfalten des *stem-loops* ist nicht mehr der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Der Anstieg der resultierenden Geraden entsprach der Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung (k'), welche die Interaktion zwischen der 3'SL^{trunc}-RNA und der 5'UAR-RNA oder die Interaktion der 3'SL^{trunc}-RNA und AUF1p45 widerspiegeln könnte. Die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung unterschied sich nicht wesentlich, wenn die Reaktion mit unmodifiziertem AUF1p45 bzw. mit AUF1p45 S₁₉₀E/T₁₉₃D komplementiert wurde. Dagegen war die Geschwindigkeitskonstante der viralen RNA-RNA-Interaktion, die die Zyklisierung des WNV-Genoms nachstellte, in Anwesenheit der methylierten Variante AUF1p45^{aDMA} um eine Größenordnung erhöht (Abb. 35B).

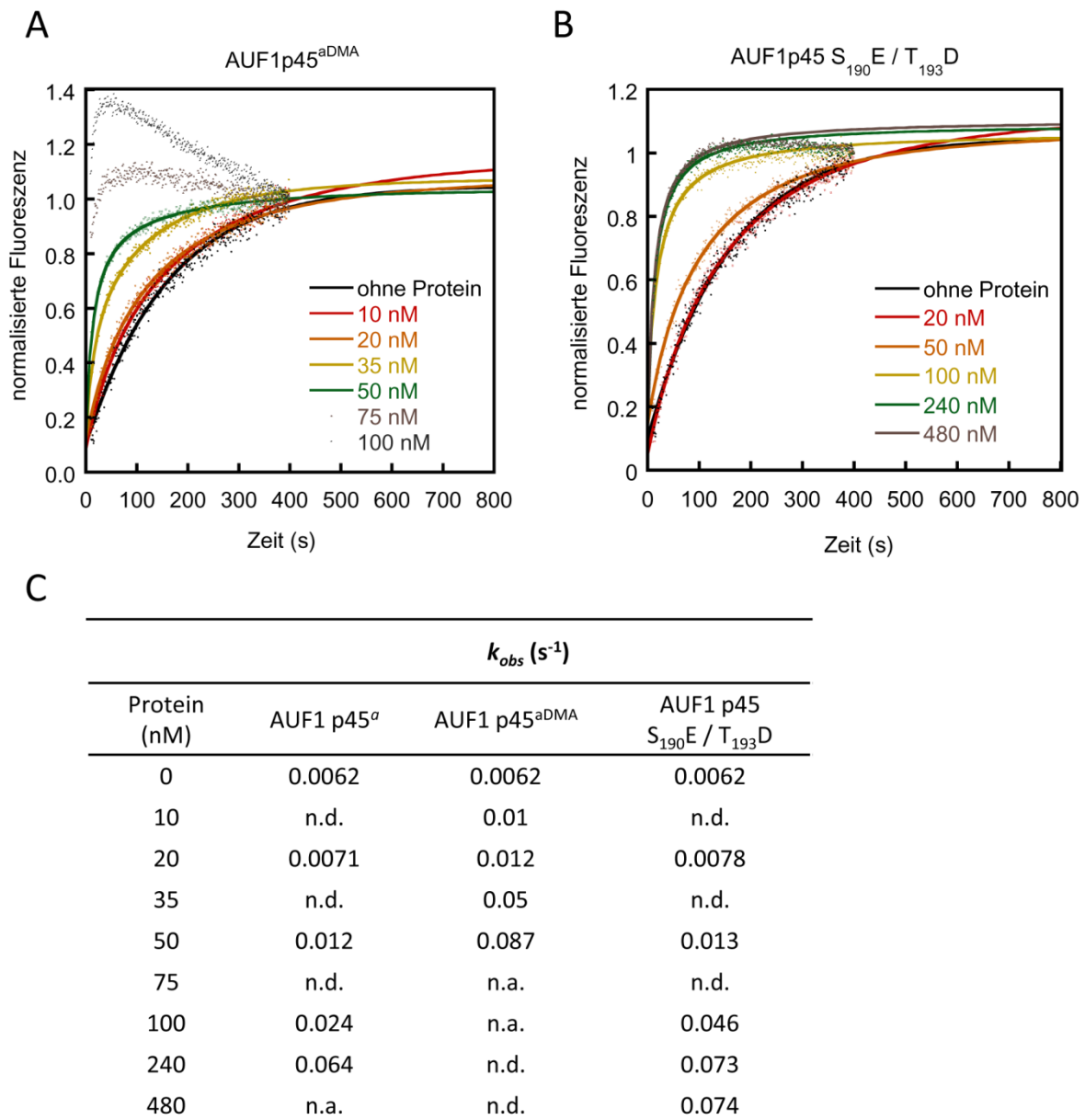


Abb. 34: Einfluss posttranslationaler Modifikationen von AUF1p45 auf die Stimulierung der viralen 5'-3'UAR-Interaktion in einem Fluoreszenz-basierten RNA-annealing-Assay. 10 nM der Cy5-markierten 3'SL^{trunc}-RNA wurden mit steigenden Konzentrationen an **(A)** AUF1p45^{adDMA} bzw. **(B)** AUF1p45 S₁₉₀E/T₁₉₃D für 100 s präinkubiert. Anschließend wurden 100 nM nicht markierte 5'UAR hinzugefügt und die Reaktion über 400 s verfolgt. Die Fluoreszenzsignale wurden normalisiert, gegen die Zeit aufgetragen und nach einer Reaktion 1. Ordnung (ohne Protein) bzw. einer Reaktion 2. Ordnung mit dem Programm KaleidaGraph ausgewertet. **(C)** Zusammenfassung der Geschwindigkeitskonstanten aus (A) und (B). Die Reaktionsgeschwindigkeiten für die Reaktionen mit 75 und 100 nM AUF1p45^{adDMA} wurden aufgrund von fehlenden Datenpunkten am Anfang der Reaktion nicht analysiert. n.a. = nicht analysiert. n.d. = nicht durchgeführt. ^aDie Daten wurden zum Vergleich aus Abb. 33C übernommen.

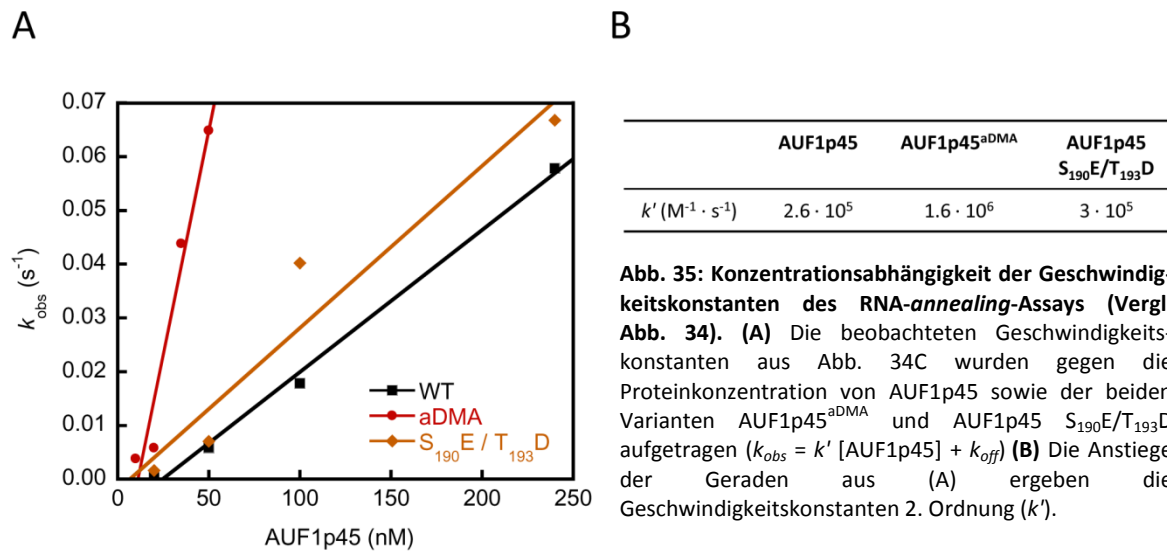


Abb. 35: Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des RNA-annealing-Assays (Vergl. Abb. 34). (A) Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten aus Abb. 34C wurden gegen die Proteinkonzentration von AUF1p45 sowie der beiden Varianten AUF1p45^{aDMA} und AUF1p45^{S₁₉₀E/T₁₉₃D} aufgetragen ($k_{obs} = k' [AUF1p45] + k_{off}$) (B) Die Anstiege der Geraden aus (A) ergeben die Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung (k').

3.17. AUF1p45 verstärkt die Interaktion der WNV 5'UTR mit der 3'Cyc-RNA in einem RNA-bandshift-Assay

Der unter 3.14. beschriebene Fluoreszenz-basierte RNA-annealing-Assay hat den Vorteil, dass mit diesem kontinuierlich die RNA-RNA-Interaktion verfolgt werden kann. Allerdings wurden hierbei RNA-Moleküle verwendet, die von der flaviviralen RNA abgeleitet wurden und dementsprechend nicht die gesamte 5'UTR bzw. den vollständigen terminalen 3'SL umfassten. Deswegen wurde ein weiterer RNA-RNA-Interaktions-Assay angewendet, der es ermöglichte, den Einfluss von AUF1p45 zu untersuchen. Die Interaktion der flaviviralen 5'- und 3'-Termini mit einem RNA-bandshift-Assay konnte schon mehrfach demonstriert werden (Alvarez et al. 2005b; Zhang et al. 2008; Ivanyi-Nagy und Darlix 2012). In dem hier durchgeführten RNA-bandshift-Assay wurde die Interaktion der 5'-terminalen 162 Nt (5'UTR) mit den 3'-terminalen 111 Nt (3'Cyc) untersucht (schematisch dargestellt in Abb. 36). Dazu wurden 2 nM der 3'Cyc-RNA mit ansteigenden Konzentrationen an AUF1p45 kurz präinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 nM radioaktiv-markierter ³²P-5'UTR und die Reaktion wurde für 30 min bei RT durchgeführt. Das AUF1p45 wurde dann aus der Reaktion durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt und die RNAs auf einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Eine Interaktion beider RNAs ist durch einen *bandshift* im Vergleich zur freien ³²P-markierten 5'UTR erkennbar aufgrund des langsameren Migrationsverhalten des 5'-3'-Komplexes. Die Inkubation äquimolarer Mengen beider RNAs im niedrigen nanomolaren Bereich zeigte, dass sich nur ein geringer Anteil an 5'-3'-Komplex ausbildete (Abb. 36, Spur 2). Mit Zugabe und bei ansteigender Konzentration an AUF1p45 hingegen konnte eine signifikante Zunahme des 5'-3'-Komplexes detektiert werden (Abb. 36,

Spur 3-5). Diese Beobachtung liegt im Einklang mit den Ergebnissen des Fluoreszenz-basierten RNA-*annealing*-Assays, d.h., AUF1p45 ist in der Lage, die Interaktion der 5'-3'-Termini der WNV-RNA zu fördern.

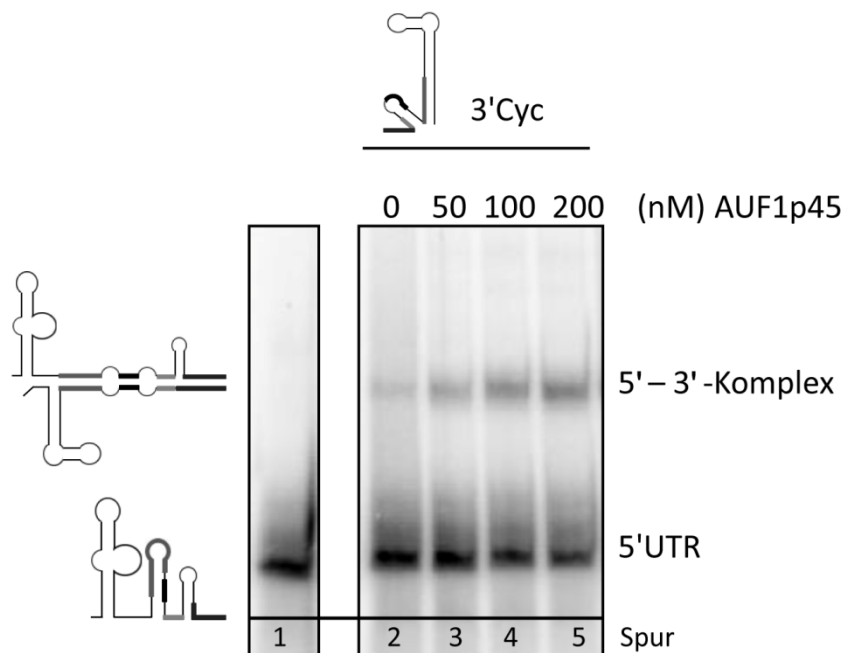


Abb. 36: AUF1p45 verstärkt die Interaktion der 5'- und 3'-Termini der WNV-RNA. 2 nM 3'Cyc-RNA wurden mit verschiedenen Konzentrationen von AUF1p45 kurz präinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 2 nM ³²P-markierter 5'UTR. Die Reaktionsansätze wurden für 30 min bei RT inkubiert und anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die 5'UTR (Spur 1) bzw. die 5'-3'-Komplexe (Spur 2-5) wurden auf einem 5%igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die schematischen Abbildungen der 3'Cyc, der 5'UTR und des 5'-3'-Komplexes sind oberhalb bzw. links vom Gel dargestellt.

3.17.1. Die methylierte Variante von AUF1p45 verstärkt die 5'-3'-Interaktion der WNV-RNA effizienter im Vergleich zur nicht-methylierten Variante

Im Folgenden wurde wiederum der Einfluss der methylierten Variante von AUF1p45 hinsichtlich ihrer Fähigkeit die 5'-3'-Interaktion zu beeinflussen untersucht. Dazu wurde der gleiche *bandshift*-Assay wie oben beschrieben durchgeführt und die Aktivität von AUF1p45^{aDMA} mit der des nicht-methylierten Proteins verglichen. Während beide Proteine in der Lage waren, den Anteil an 5'-3'-RNA-Duplex zu erhöhen, war dieser Effekt bei der methylierten Variante erheblich deutlicher ausgeprägt. Bei einer Konzentration von 200 nM Protein war die Ausbildung des 5'-3'-Komplexes im Falle des nicht-methylierten AUF1p45 bezogen auf die Reaktion ohne Protein dreifach verstärkt, währenddessen AUF1p45^{aDMA} die Interaktion der viralen RNAs um den Faktor 5 verbessern konnte (Abb. 37). Beide Varianten

können unter den hier untersuchten Bedingungen keine vollständige 5'-3'-Komplexbildung induzieren. Jedoch korreliert das Ausmaß der 5'-3'-Komplexbildung mit den beobachteten Stimulierungsfaktoren beider Proteine auf die (-)-Strang-RNA-Synthese im *in vitro* RdRp-Assay (siehe Abb. 31B, zweifach für das nicht-methylierte AUF1p45 und fünffach für das methylierte AUF1p45^{aDMA}).

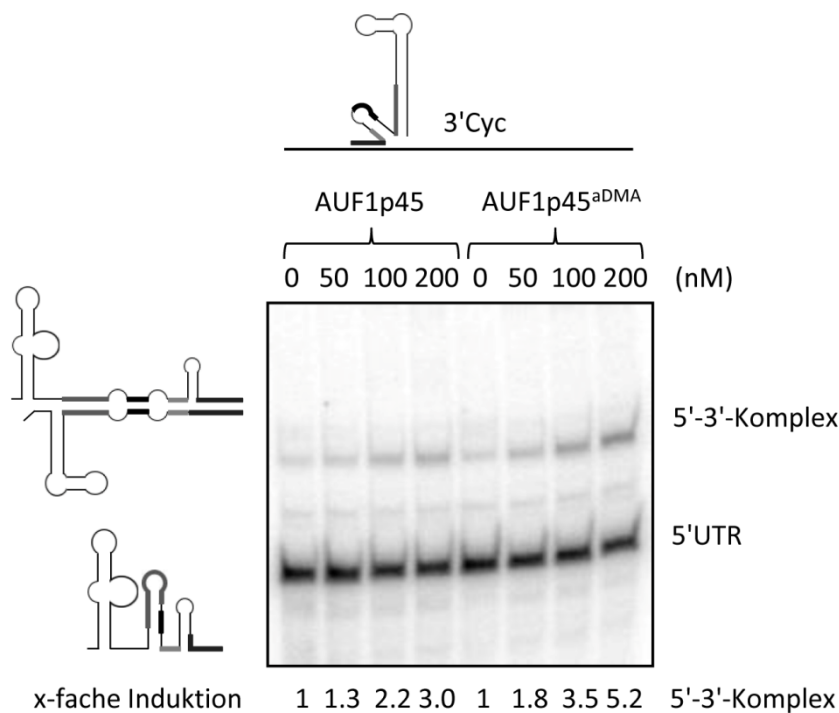


Abb. 37: Die Methylierung von AUF1p45 verstärkt die Interaktion der 5'- und 3'-Termini der WNV-RNA. 2 nM 3'Cyc-RNA wurden mit verschiedenen Konzentrationen von AUF1p45 bzw. AUF1p45^{aDMA} kurz präinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 2 nM ³²P-markierter 5'UTR. Die Reaktionsansätze wurden für 30 min bei RT inkubiert und anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die 5'-3'-Komplexe wurden auf einem 5%igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die schematischen Abbildungen der 3'Cyc, der 5'UTR und des 5'-3'-Komplexes sind oberhalb bzw. links vom Gel dargestellt. Die 5'-3'-Komplexbildung wurde mit *Image Quant* quantifiziert und die Werte für eine x-fache Induktion, bezogen auf die Reaktion ohne Protein, sind unter dem Gel angezeigt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Methylierung von AUF1p45 die Fähigkeit des Proteins hinsichtlich der RNA-Bindung, der stimulatorischen Aktivität auf die (-)-Strang-RNA-Synthese im *in vitro* RdRp-Assay sowie der Vermittlung der RNA-RNA-Interaktion der viralen 5'-3'-Termini durch eine RNA-Chaperone-Aktivität positiv fördert.

3.18. AUF1p45 weist einen hohen Anteil an ungeordneten Proteinstrukturen auf

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass sich die Varianten von AUF1p45, insbesondere die methylierte Variante, in ihrer RNA-Bindung und ihrer Fähigkeit die virale RNA-RNA-Interaktion zu unterstützen vom unmodifizierten AUF1p45 unterscheiden. Ob eine Ursache dafür in der Sekundärstruktur zu finden ist, sollte mit CD-Spektroskopie analysiert werden. Bei der Aufnahme des Nah-UV-CD-Spektrums von AUF1p45 wurde kein messbares Signal erhalten. Somit weist AUF1p45 keinen Circular dichroismus der aromatischen Aminosäuren auf (Daten nicht gezeigt). Das Fern-UV-CD-Spektrum zeigt den Bereich zwischen 200 nm und 260 nm und konnte zur Auswertung der Sekundärstruktur von AUF1p45 genutzt werden. Die am Spektropolarimeter gemessene Elliptizität (θ) wurde auf die mittlere Molmasse einer Aminosäure von AUF1p45 bezogen und ergab die *mean residue weight ellipticity* $[\theta]_{MRW}$. Das Fern-UV-CD-Spektrum von AUF1p45 weist ein relativ schwaches Minimum bei ca. 208 nm auf, welches auf einen Anteil von α -Helix-Strukturen hindeutet. Des Weiteren ist ein Minimum bei ca. 215 nm erkennbar, welches auf geringe Anteile an β -Faltblättern und ebenso an α -Helices schließen lässt (Abb. 38). Das AUF1p45 besitzt dementsprechend eine strukturelle Integrität, obwohl die relativ geringe Elliptizität einen hohen Anteil an *random coil*-Strukturen vermuten lässt. Die Auswertung mit dem Strukturvorhersageprogramm K2D2 (Perez-Iratxeta und Andrade-Navarro 2008) ergab einen Anteil von 25 % α -Helices und 19 % β -Faltblätter. Der Anteil an ungeordneten Proteinstrukturen von AUF1p45 beträgt demnach 56 % und deutet auf eine hohe strukturelle Flexibilität des Proteins hin.

Die CD-Spektren der modifizierten Varianten AUF1p45^{aDMA} und AUF1p45 S₁₉₀E/T₁₉₃D wurden unter den gleichen Bedingungen wie für das unmodifizierte Protein aufgezeichnet. Das Fern-UV-CD-Spektrum zeigte dabei im Fall von AUF1p45^{aDMA} einen stärkeren Circular dichroismus im Bereich des Minimums von 208 nm. Dies deutet auf einen höheren Anteil α -helikaler Strukturen hin, wenn AUF1p45 methyliert ist. Im Gegensatz dazu nimmt die Chiralität bei der pseudophosphorylierten Variante von AUF1p45 ab. Dies ist durch ein schwächeres Minimum bei 208 nm erkennbar und weist auf eine Abnahme α -helikaler Strukturen hin (Abb. 38). Die Einführung von Methylierungen bzw. Pseudophosphorylierungen in AUF1p45 hat somit einen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Proteins. Die veränderte Sekundärstruktur könnte höchstwahrscheinlich eine Erklärung für die veränderten Eigenschaften dieser modifizierten Varianten hinsichtlich ihrer RNA-Bindungseigenschaft und RNA-Chaperone-Aktivität sein.

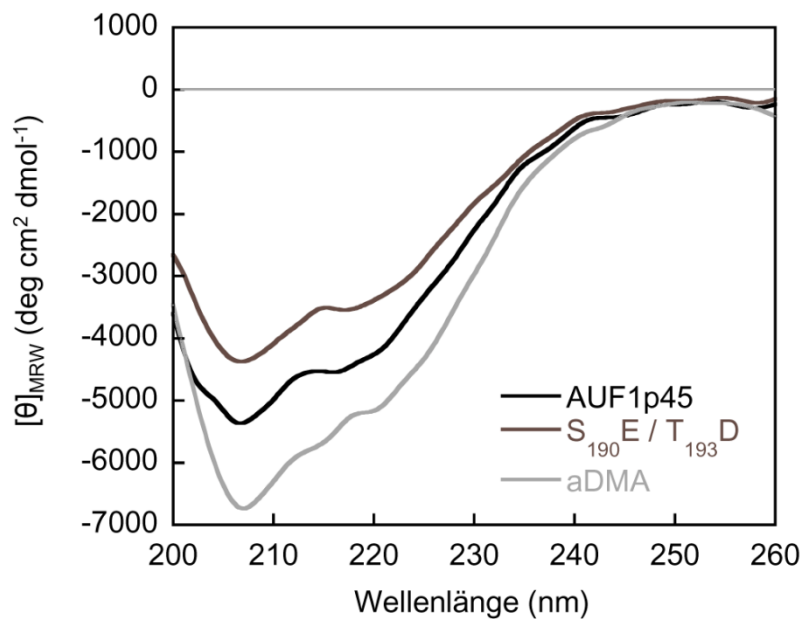


Abb. 38: Vergleich der Fern-UV-CD-Spektren von AUF1p45 und der Varianten AUF1p45^{aDMA} und AUF1p45 S₁₉₀E/T₁₉₃D. Die CD-Spektren von je 2 μ M Protein in 20 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 1 mM TCEP, pH 7.6 wurden im Bereich von 200 bis 260 nm aufgenommen. 60 Spektren wurden akkumuliert und das CD-Spektrum wurde geglättet. Die gemessene Elliptizität in Abhängigkeit von der Wellenlänge wurde auf das mittlere Molekulargewicht (*mean residue weight*, MRW) der Aminosäuren von AUF1p45 bezogen.

3.19. Die Depletion von AUF1 in Huh7-Zellen beeinträchtigt die Translation und RNA-Replikation eines Dengue-Virus-RNA-Replikons

Das Dengue-Virus (DENV) gehört ebenfalls zur Gattung der Flaviviren. Um erste Hinweise zu erlangen, ob AUF1 ein generelles Wirtsprotein für die Replikation von *mosquito-borne*-Flaviviren ist, wurde die Auswirkung einer RNAi-vermittelten Depletion von AUF1 in Huh7-Zellen auf die Replikation eines Dengue-Virus-RNA-Replikons untersucht. Dieses Replikon kodiert ebenfalls für die Expression einer Renilla-Luziferase, wodurch zwischen der Translation und der Replikation der Dengue-RNA unterschieden werden konnte (Abb. 39A). Huh7-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA und einer siRNA gegen AUF1 transfiziert. Nach 48 h wurde die Replikon-RNA transfiziert und die zelluläre Depletion von AUF1 nach verschiedenen Zeitpunkten mittels Western Blot verifiziert (Abb. 39B). Die Quantifizierung der viralen RNA durch qRT-PCR zeigte eine deutliche Reduktion auf ca. 30 % nach 48 h und 72 h in AUF1-depletierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 39C). Die Rluc-Aktivität in AUF1-*knockdown*-Zellen 4 h nach Transfektion der viralen RNA war im Vergleich zur Kontrolle auf 70 % gesunken, d.h. die Translation war negativ beeinflusst. Nach 48 bzw. 72 h war der Abfall der Rluc-Aktivität noch deutlicher ausgeprägt, was eine Beteiligung von AUF1 an der Replikation vermuten lässt (Abb. 39C). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass AUF1

zusätzlich zu seiner Funktion als Wirtsfaktor des WNV auch eine wichtige Rolle im Lebenszyklus des Dengue-Virus übernimmt. Während jedoch beim WNV die Translation der viralen RNA nach AUF1-Depletion unbeeinflusst blieb (siehe Abb. 15D), konnte ein Einfluss von AUF1 auch auf die Translation der DENV-RNA indiziert werden (Abb. 39C).

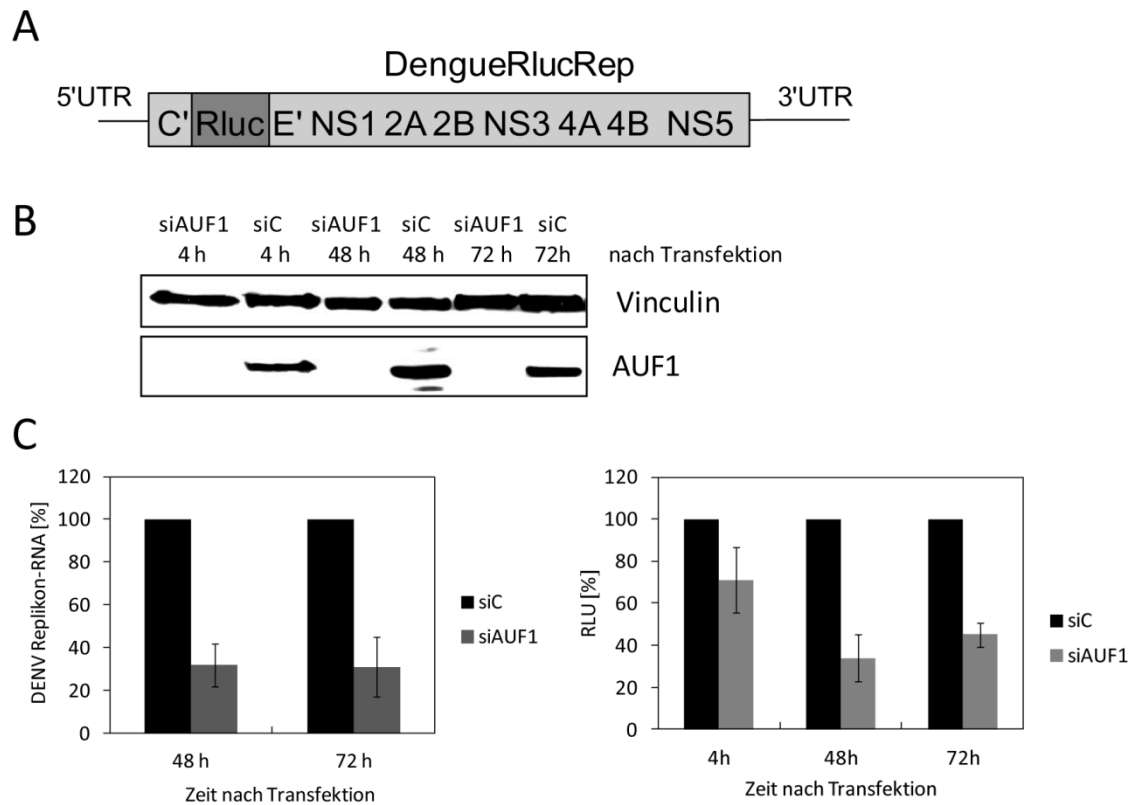


Abb. 39: Die Depletion von AUF1 beeinträchtigt die Translation und Replikation eines Dengue-Virus-RNA-Replikons
(A) Schematische Darstellung des DENV-Rluc-Reporter-Replikons. **(B)** Huh7-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA bzw. mit einer siRNA gegen AUF1 transfiziert. Nach 48 h wurde die Replikon-RNA transfiziert. Die Proteinmengen von AUF1 und Vinculin wurden nach verschiedenen Zeitpunkten analysiert. **(C)** Die Quantität der viralen RNA wurde mit qRT-PCR quantifiziert. Die Rluc-Aktivität wurde nach 4, 48 und 72 h bestimmt. Die Ergebnisse aus drei verschiedenen Experimenten sind gezeigt. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. RLU = *relative light units*.

IV. DISKUSSION

4.1. Posttranskriptionelle Kontrolle der Genexpression durch AUF1

Die Fähigkeit zelluläre Funktionen auf Ebene der Genexpression zu regulieren ist essentiell für Organismen, um schnell und effizient auf Veränderungen (z.B. Stress oder Immunmodulation) zu reagieren bzw. die richtige Entwicklung zu gewährleisten. Die posttranskriptionelle Regulation der mRNA-Stabilität bzw. der Translation sind dabei wichtige Aspekte, um die korrekte Transkriptmenge und den Zeitpunkt der Expression vieler Gene sicherzustellen (von Roretz et al. 2011). Um auf veränderte Bedingungen schnell zu reagieren, weisen viele mRNAs eine sehr kurze Halbwertszeit auf. Diese instabilen mRNAs, die unter anderem für Entzündungsmediatoren, Cytokine, Onkoproteine und G-Proteingekoppelte Rezeptoren kodieren, enthalten in ihrer 3'UTR AU-reiche-Elemente (*AU-rich elements*, AREs). Diese *cis*-agierenden Elemente fördern den schnellen Abbau der mRNAs durch die Interaktion mit *trans*-agierenden Faktoren (Ross 1995). Zu den destabilisierenden *trans*-agierenden Faktoren, die als ARE-Bindeproteine bezeichnet werden, gehören u.a. *ARE-binding factor 1* (AUF1), *Tristetraprolin* (TTP) und *K homology splicing regulatory protein* (KHSRP). Zusätzlich zu ihrer destabilisierenden Funktion können ARE-Bindeproteine auch einen stabilisierenden Einfluss auf mRNAs haben wie z.B. das *human antigen R* (HuR) (Wilusz et al. 2001). Weiterhin beeinflussen ARE-Bindeproteine die Translation zellulärer mRNAs. Die *stress granules*-assoziierten Proteine *TIA-1* (*T-cell restricted intracellular antigen-1*) und *TIAR* (*TIA-1 related*) agieren dabei als Translationsrepressoren (Mazan-Mamczarz et al. 2006).

Die Kontrolle der Expression von proinflammatorischen Cytokinen wird durch den schnellen Abbau der Cytokin-mRNAs reguliert. Dies ist wichtig, um chronische Entzündungen nach einer Immunantwort zu verhindern. Die Rolle von AUF1 als posttranskriptioneller Regulator dieser Cytokine konnte durch *AUF1-knockout*-Mäuse bestätigt werden. Nach Behandlung mit Endotoxin wurden die Cytokine TNF- α und IL-1 β überproduziert und die Mäuse wiesen Symptome eines Endotoxinschocks auf (Lu et al. 2006). AUF1 fördert den ARE-vermittelten mRNA-Abbau durch Interaktion mit anderen Proteinen wie den Hitzeschockproteinen Hsc70/Hsp70, dem Translationsinitiationsfaktor eIF4G und dem *poly(A)-binding protein* (PABP). Notwendig für den Abbau der mRNAs ist die Dissoziation zwischen AUF1 und eIF4G und die Ubiquitin-abhängige Spaltung von AUF1 durch das Proteasom (Laroia et al. 1999; Laroia et al. 2002; Laroia und Schneider 2002).

Obwohl AUF1 zunächst als negativer Regulator der Stabilität der *c-myc*-mRNA beschrieben wurde (Brewer 1991), konnte AUF1 inzwischen eine Beteiligung an vielen zellulären Prozessen nachgewiesen werden. Zum einen konnte für AUF1 auch eine Funktion in der Stabilisierung von mRNAs gezeigt werden und zum anderen wurde es als aktivierender

Faktor in der Transkription, Translation und Telomer-Biogenese beschrieben (zusammengefasst in Tabelle 8).

Tabelle 8. Zelluläre Funktionen von AUF1

Prozess	Funktion	AUF1-Isoform	Interaktion mit	Referenz
mRNA-Stabilität	Destabilisierung	-	c-myc-mRNA	(Brewer 1991)
		-	TNF- α -mRNA	(Lu et al. 2006)
	Stabilisierung	p37	GM-CSF-mRNA	(Gouble et al. 2002)
		-	PTH-mRNA	(Sela-Brown et al. 2000)
		p37	c-myc-mRNA	(Gouble et al. 2002)
Transkription	Aktivator	p40, p45	CR-2 Promoter	(Tolnay et al. 1997; Tolnay et al. 1999; Tolnay et al. 2000)
Translation	Aktivator	alle	c-myc-mRNA	(Liao et al. 2007)
Telomer-Biogenese	Aktivator	alle	d(TTAGGG) _n Telomerase	(Eversole und Maizels 2000; Enokizono et al. 2005)

TNF = Tumornekrosefaktor; GM-CSF = *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; PTH = *parathyroid hormone*; CR-2 = *complement receptor 2*

4.2. AUF1 wurde als neuer Wirtsfaktor des West-Nil-Virus identifiziert

Zusätzlich zur Funktion im zellulären RNA-Metabolismus, konnte AUF1 eine Beteiligung im Lebenszyklus verschiedener Viren nachgewiesen werden. So aktiviert das Protein die Transkription des dsDNA-Virus Epstein-Barr (EBV), dem Verursacher des Pfeifferschen Drüsenfiebers, durch Bindung an den viralen Promoter Cp (Fuentes-Panana et al. 2000). Darüber hinaus interagiert es mit der EBV-kodierenden RNA 1 (EBER1). Die genaue Funktion dieser Interaktion ist noch nicht geklärt, jedoch wird vermutet, dass die Interaktion mit der im Überfluss exprimierten RNA EBER1 die zelluläre Homöostase zwischen AUF1 und ARE-mRNAs beeinträchtigen könnte (Lee et al. 2012). Des Weiteren konnte AUF1 als Wirtsfaktor des Hepatitis-C-Virus, einem Vertreter der Virusfamilie *Flaviviridae* und dementsprechend nah verwandt mit WNV, identifiziert werden. AUF1 bindet spezifisch an den *stem-loop* II (SL II) der internen Ribosomenbindestelle innerhalb der 5'UTR und fungiert als positiver Regulator der HCV-Translation (Paek et al. 2008). Weiterhin wurde AUF1 als Wirtsfaktor der Lebenszyklen von Poliovirus, Rhinovirus, HIV-1 und von Coxsackie-Virus beschrieben, wobei AUF1 im Fall des Coxsackie-Virus eine anti-virale Funktion übernimmt (zusammengefasst in Tabelle 9).

Tabelle 9. Beschriebene Funktionen von AUF1 als Wirtsfaktor verschiedener Viren

Virus	Genom	Funktion im viralen Lebenszyklus	viralen Interaktionspartner	Referenz
Epstein-Barr-Virus	dsDNA	Aktivierung der Transkription	Promoter Cp, nicht-kodierende RNA EBER1	(Fuentes-Panana et al. 2000; Lee et al. 2012)
HCV	ss(+)RNA	Stimulierung der viralen Translation (AUF1p45)	SL II der IRES	(Paek et al. 2008)
Poliovirus und humanes Rhinovirus	ss(+)RNA	unklar	5'UTR, Proteinase 3CD	(Rozovics et al. 2012)
Coxsackie-Virus	ss(+)RNA	anti-viral	3'UTR	(Wong et al. 2013)
HIV-1	ss(+)RNA-RT	Inhibierung (AUF1p37 und p40) bzw. Stimulierung (AUF1p42 und p45) der Synthese von Gag	Strukturprotein Gag	(Lund et al. 2012)

EBER1 = Epstein-Barr-Virus *encoded RNA 1*, IRES = *internal ribosomal entry site*, HIV-1= *human immune deficiency virus 1*, RT = Reverse Transkriptase

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe eines *in vitro* RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Assay nach RNA-Bindeproteinen gesucht, die eine stimulatorische Aktivität auf die (-)-Strang-RNA-Synthese des WNV haben. Die Analyse durch Massenspektrometrie bzw. durch Western Blot zeigte die Anwesenheit von AUF1 in spezifischen Proteinfractionen mit der höchsten stimulatorischen Aktivität. Interessanterweise führte die RNAi-vermittelte Depletion von zellulärem AUF1 zu einer signifikanten Reduktion der RNA-Replikation eines WNV-Replikons in Huh7-Zellen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass AUF1 für eine effiziente Vermehrung eines infektiösen WNV notwendig ist. Folglich nimmt AUF1 eine wichtige Rolle im Lebenszyklus des WNV ein und konnte als neuer Wirtsfaktor des WNV identifiziert werden.

4.3. Isoform-spezifische Funktionen von AUF1

Es existieren vier Isoformen von AUF1, die durch alternatives Spleißen der Exons 2 und 7 des mRNA-Transkripts generiert werden (Abb. 17A; Wagner et al. 1998). Die vier Isoformen von AUF1, die nach ihrem Migrationsverhalten in der SDS-PAGE als p37, p40, p42 und p45 bezeichnet wurden, zeigen Isoform-spezifische Funktionen. Zum Beispiel führte die transiente Expression von AUF1p37 und AUF1p40 zu einer Destabilisierung einer ARE-Reporter-mRNA, während die Expression der Isoformen p42 und p45 keinen Einfluss auf die Stabilität hatte (Sarkar et al. 2003b). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die RNAi-

vermittelte Depletion von AUF1 Isoform p40 und p45 zu einer erhöhten Sekretion des Cytokins GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) führte, während die selektive Depletion von p42 und p45 zu keiner Veränderung der GM-CSF-Sekretion beitrug (Raineri et al. 2004). Diese Isoform-spezifischen Effekte von AUF1 könnten eine Erklärung für die vielen widersprüchlichen Daten in der Literatur sein bezüglich der stabilisierenden bzw. destabilisierenden Rolle von AUF1 im RNA-Metabolismus.

Darüber hinaus konnten zelltypspezifische Effekte von AUF1 gezeigt werden. Transfektionsstudien offenbarten, dass vor allem die Isoformen p37 und p42 von AUF1 als ARE-Destabilisierungs-Faktoren in der Leukämie-Zelllinie K562 agieren (Loflin et al. 1999). In embryonalen Mauszellen (NIH 3T3) hingegen inhibieren die gleichen AUF1-Isoformen den ARE-vermittelten mRNA-Abbau (Xu et al. 2001).

Isoform-spezifische Funktionen konnten auch bei der Beteiligung von AUF1 im viralen Lebenszyklus beschrieben werden. So stimuliert nur die Isoform p45 die Translation der viralen RNA von HCV (Paek et al. 2008). Entgegengesetzte Funktionen weisen die Isoformen von AUF1 bei der viralen Proteinexpression von HIV-1 auf. Die Synthese des Strukturproteins Gag wird durch p37 und p40 inhibiert, während die Isoformen p42 und p45 einen stimulierenden Effekt ausüben (Lund et al. 2012).

Eine Isoform-spezifische Funktion von AUF1 konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Alle AUF1-Isoformen wurden in Huh7-Zellen als FLAG-Fusionsproteine exprimiert, immunpräzipitiert und auf Aktivität im *in vitro* RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Assay (RdRp-Assay) untersucht. Dabei konnte die (-)-Strang-RNA-Synthese einer subgenomischen WNV-RNA nur durch die Komplementation mit der größten Isoform p45 stimuliert werden. Da eine Konzentrationsabhängigkeit der FLAG-AUF1-Isoformen aus Huh7-Zellen nicht weiter verfolgt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die anderen Isoformen die stimulatorische Aktivität ebenfalls, vielleicht mit einer geringeren Effizienz, aufweisen. Die rekombinante Reinigung der anderen AUF1-Isoformen und eine systematische Untersuchung dergleichen im *in vitro* RdRp-Assay könnte darüber Aufschluss geben, ob AUF1p45 exklusiv über diese Funktion verfügt.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass AUF1 mit der Methyltransferase PRMT1 und dem *heterogeneous ribonucleoprotein* H1 (hnRNPH1) interagiert. Diese Interaktion wurde nur mit den AUF1-Isoformen p42 und p45 detektiert. Beiden Isoformen gemein ist ein 49 Aminosäuren langer Bereich im C-Terminus des Proteins, welcher durch das Exon 7 kodiert wird. Denkbar wäre, dass dieser 49 Aminosäuren langer Bereich von AUF1 die Interaktion mit PRMT1 und hnRNPH1 und somit eine isoform-spezifische Funktion vermittelt.

4.4. Die Funktion von AUF1 wird durch posttranslationale Modifikationen reguliert

Die Funktion bzw. Eigenschaft eines Proteins kann durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden. Für AUF1 konnten schon eine Vielzahl von Modifikationen beschrieben werden. Dazu gehören vor allem Phosphorylierungen des 19 Aminosäuren langen Bereichs im N-Terminus des Proteins, welcher durch das Exon 2 kodiert wird und nur den Isoformen p40 und p45 eigen ist (Abb. 40). Die Phosphorylierung der Serine an Position 71, 80, 82, 83 und 190 sowie der Threonine an Position 91 und 193 wurden durch großangelegte massenspektrometrische Analysen von Zellextrakten (*in vivo* Phosphoproteom) nachgewiesen (Dephoure et al. 2008; Olsen et al. 2010). Die Serine an Position 83 und 87 konnten im Zusammenhang mit der transkriptionsaktivierenden Funktion von AUF1 als Substrate der Glykogensynthase-Kinase 3 β bzw. der Proteinkinase A identifiziert werden (Tolnay et al. 2002). Zudem wird der ARE-vermittelte mRNA-Abbau von AUF1 durch Phosphorylierung reguliert. Wilson et al. (2003b) konnten zeigen, dass die Dephosphorylierung an Position S₈₃ und S₈₇ die Destabilisierung von ARE-mRNAs durch AUF1p40 inhibiert.

Mit Hilfe von *in vitro* Kinase-Assays wurden weiterhin die Proteinkinase C sowie die Casein-Kinase II identifiziert, die AUF1 phosphorylieren (Tolnay et al. 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die Proteinkinase R AUF1p45 *in vitro* phosphorylieren kann (Daten nicht gezeigt). Die physiologische Relevanz dieser Phosphorylierungen ist jedoch noch nicht geklärt.

Eine weitere posttranslationale Modifikation von AUF1 ist die Ubiquitinierung. Die Ubiquitinierung wird durch den 49 Aminosäuren langen Bereich im C-Terminus, der durch das Exon 7 kodiert wird, unterdrückt. Dementsprechend sind nur die Isoformen p37 und p40 ubiquitiniert. Es konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitinierung von AUF1 sowie die Degradation von AUF1 durch das Proteasom notwendig für den mRNA-Abbau ist und liefert so eine Erklärung dafür, dass häufig die AUF1 Isoform p37 im Zusammenhang mit der Destabilisierung von mRNAs beschrieben wird (Laroia et al. 1999; Laroia et al. 2002; Laroia und Schneider 2002).

AUF1 gehört zur Familie der hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*), die vielfältige Funktionen im Nukleinsäure-Metabolismus haben wie z.B. beim Spleißen, mRNA-Transport, mRNA-Stabilität, Telomer-Biogenese und Transkription (Pinol-Roma et al. 1988; Han et al. 2010). 65 % der im Zellkern vorhandenen dimethylierten Arginine sind in hnRNP-Proteinen zu finden (Boffa et al. 1977). Auch für AUF1 konnte gezeigt werden, dass es methyliert vorliegt (Liu und Dreyfuss 1995). Mit Hilfe der SILAC-Technologie (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) konnte das Arginin an Position 345 innerhalb eines

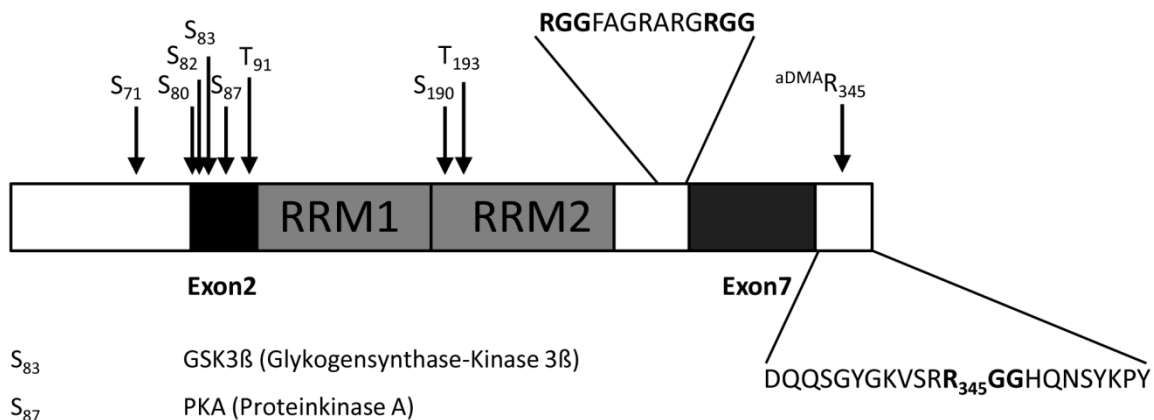


Abb. 40. Posttranslationale Modifikationen von AUF1. Dargestellt ist die Domänenstruktur von AUF1 Isoform p45. Die experimentell verifizierten Phosphorylierungen sowie die Methylierung sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Positionen der Modifikationen im Protein sind durch Zahlen an den jeweiligen Aminosäuren (Phosphorylierung an Serin (S) und Threonin (T) bzw. Methylierung an Arginin (R)) angezeigt. Die Phosphorylierungen S₈₀, S₈₂, S₈₃, S₈₇ und T₉₁ befinden sich in der Domäne, die vom Exon 2 kodiert wird, d.h. sie sind exklusiv für die AUF1 Isoformen p40 und p45. Die verantwortlichen Proteinkinasen für die Phosphorylierungen an S₈₃ und S₈₇ sind unterhalb der Abb. dargelegt. Ein Teil der Aminosäuresequenz von AUF1 mit den drei RGG-Motiven (fett markiert) ist dargestellt. Nähere Informationen zum experimentellen Beleg der Modifikationen siehe Text.

RGG-Motivs als dimethyliert identifiziert werden (Abb. 40; Ong et al. 2004). In dieser Arbeit konnte ebenfalls durch Massenspektrometrie gezeigt werden, dass aus Huh7-Zellen präzipitiertes FLAG-AUF1p45 an der Position 345 eine Dimethylierung aufweist. Des Weiteren konnte erstmals gezeigt werden, dass die Methyltransferase PRMT1 AUF1p45 *in vitro* methyliert. PRMT1 ist für den Großteil der asymmetrischen Dimethylierung von Argininen in Zellen verantwortlich (Tang et al. 2000). Die Argininmethylierung von Proteinen beeinflusst deren subzelluläre Lokalisation, Protein-Protein-Interaktion sowie Protein-RNA-Interaktion (Ostareck-Lederer et al. 2006; Bedford und Clarke 2009; Hung et al. 2010; Fronz et al. 2011). Die sieben verschiedenen Isoformen von PRMT1 weisen hinsichtlich ihrer Substratspezifität und ihrer Aktivität Unterschiede auf (Pawlak et al. 2002; Goulet et al. 2007). Die in dieser Arbeit untersuchten Isoformen von PRMT1 (v1, v2, v3 und v5) wiesen jedoch die gleiche Aktivität bezüglich des Einbaus von Methylgruppen in AUF1p45 auf. Des Weiteren konnte kein verändertes Methylierungsmuster in Abhängigkeit der PRMT1-Isoformen festgestellt werden, d.h. es wurde ausschließlich die Dimethylierung des Arginins an Position 345 nachgewiesen (Masterarbeit Christoph Pille). Ob PRMT1 *in vivo* allein für die Methylierung von AUF1 verantwortlich ist oder ob andere Methyltransferasen ebenfalls zur Methylierung von AUF1 beitragen, ist jedoch noch unklar. Dies könnte durch RNAi-vermittelte Depletion von PRMT1 und anschließender Immunpräzipitation von AUF1 und dessen massenspektrometrischer Analyse ermittelt werden. Interessant wäre außerdem zu untersuchen, ob PRMT1 alle Isoformen von AUF1 *in vitro* methylieren kann. Da die Co-präzipitation von PRMT1 nur mit den beiden Isoformen p42 und p45 detektiert wurde,

könnte man vermuten, dass der 49 Aminosäuren lange Bereich im C-Terminus von AUF1 notwendig für die Interaktion mit PRMT1 und dementsprechend auch für die Methylierung des Arginins an Position 345 ist. Diese Vermutung wird durch eine aktuelle Veröffentlichung zur Methylierung der Isoform p37 von AUF1 unterstützt. Dabei konnte gezeigt werden, dass AUF1p37 keine Methylierung des Arginins 345 aufweist. Jedoch konnten drei andere Arginine identifiziert werden, die mono- bzw. dimethyliert vorlagen (Fellows et al. 2013).

Durch eine Co-Expression mit PRMT1 in *E. coli* konnte eine methylierte Variante von AUF1p45 in dieser Arbeit gereinigt werden. Der Vergleich der methylierten Variante von AUF1p45 mit dem nicht-methylierten AUF1p45 im *in vitro* RdRp-Assay ergab, dass die Methylierung von AUF1p45 die Fähigkeit, die (-)-Strang-RNA-Synthese von NS5 zu stimulieren, erhöhte. Die Ursache dafür liegt höchstwahrscheinlich in der erhöhten RNA-Bindungs-Affinität der methylierten Variante zu den terminalen 5'- und 3'-Enden der viralen RNA.

Die Argininmethylierung kann inhibitorisch wirken, wenn sie sich in der Nähe von Akt-Phosphorylierungsstellen befindet. Die Argininmethylierung von FOXO1 durch PRMT1 verhindert dessen Phosphorylierung durch Akt und fördert die Kernlokalisierung dieses Transkriptionsfaktors (Yamagata et al. 2008). Da AUF1 phosphoryliert sowie methyliert wird, wäre es interessant, die gegenseitige Beeinflussung dieser posttranslationalen Modifikationen näher zu untersuchen.

4.5. Die Zyklisierung des viralen RNA-Genoms ist essentiell für die Vermehrung von Flaviviren

Das (+)-Strang-Genom von RNA-Viren dient zum einen als Template für die Translation des viralen Polyproteins und zum anderen als Template für die Synthese der (-)-Strang-RNA. Da die Ribosomen in 5'-3'-Richtung das Polyprotein translatieren und die Polymerase am 3'-Ende die Replikation in die entgegengesetzte Richtung initiiert, müssen die beiden Prozesse miteinander koordiniert werden, um sich nicht gegenseitig zu behindern. In diesem Zusammenhang konnten *cis*-aktive RNA-Elemente in der 5'- und 3'UTR von BVDV und HCV identifiziert werden, die bei der Regulierung von Translation und Replikation involviert sind (Yu et al. 2000; Isken et al. 2004; Grassmann et al. 2005). Dieser Wechsel zwischen Translation und Replikation ist außerdem sehr gut bei Poliovirus, dem Erreger der Kinderlähmung, untersucht. Gamarnik und Andino (1997) konnten zeigen, dass die zellulären Proteine PCBP1 und PCBP2 (*poly(rC)-binding proteins*) an eine Sekundärstruktur in der 5'UTR, die als Kleeblattstruktur (*cloverleaf structure*) bezeichnet wird, binden und damit die Translation erleichtern. Die Kleeblattstruktur agiert dabei als bifunktionales Element, indem es darüber hinaus das virale Protein 3CD, dem Vorläufer der viralen Polymerase, bindet. Die

Bindung von 3CD inhibiert die Translation und fördert die Replikation der (-)-RNA. Somit dienen diese überlappenden Translations- und Replikationssignale innerhalb der Kleeblattstruktur dazu, die beiden Prozesse der Translation und Replikation miteinander zu koordinieren (Gamarnik und Andino 1998; Barton et al. 1999).

Herold und Andino konnten 2001 zeigen, dass die Zyklisierung der genomischen RNA essentiell für die Replikation von Polioviren ist. Die Zyklisierung der viralen RNA wird dabei durch eine Protein-Protein-Brücke ermöglicht. So konnte nachgewiesen werden, dass der ternäre Komplex an der 5'UTR, bestehend aus PCBP, 3CD und der Kleeblattstruktur, mit dem *poly(A) binding protein* (PABP) interagiert, welches an den Poly(A)-Schwanz der 3'UTR gebunden ist (Abb. 41A). Es wird vermutet, dass die Zyklisierung der RNA die virale Polymerase 3C^{pol} in Nähe des entsprechenden Startpunkts der Replikation am 3'-Ende positioniert (Barton et al. 2001; Herold und Andino 2001).

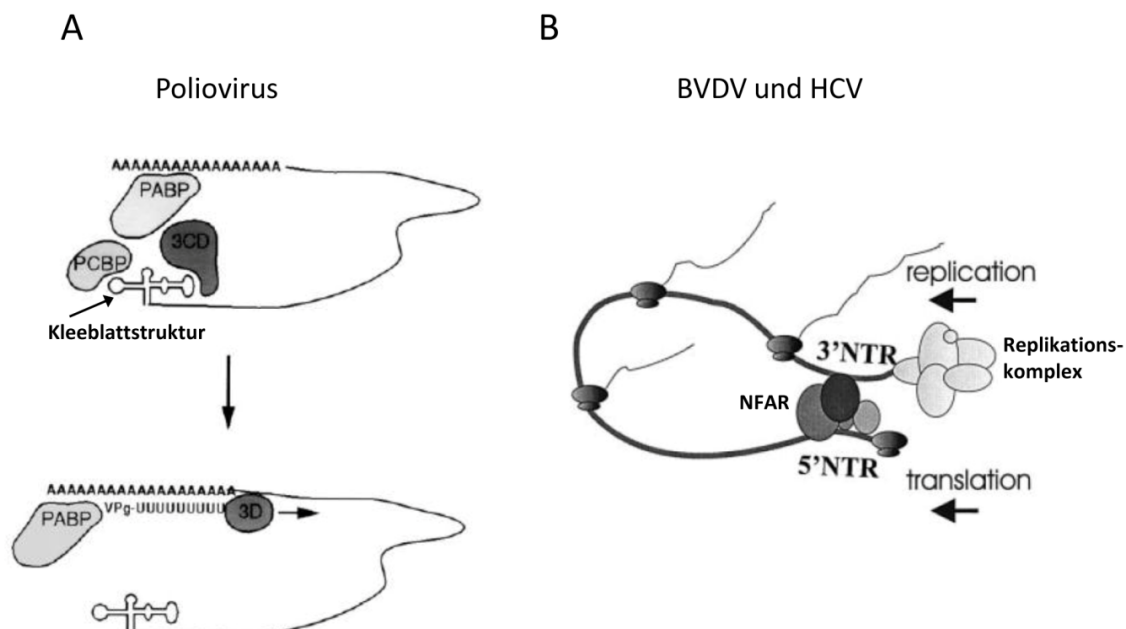


Abb. 41. Vergleich der Protein-vermittelten Genomzyklisierung von Poliovirus und BVDV bzw. HCV. (A) Modell zur Initiation der (-)-Strang-RNA-Synthese bei Poliovirus. Die zellulären Proteine PCBP1 und 2 sowie das virale Protein 3CD binden an die Kleeblattstruktur in der 5'UTR und inhibieren die Translation. Die Zyklisierung des viralen Genoms wird durch die Interaktion mit dem PABP, welches an den Poly(A)-Schwanz am 3'Ende assoziiert ist, erreicht. Dies bringt die virale Polymerase 3D in räumliche Nähe des 3'-Endes und erlaubt die Initiation der (-)-Strang-RNA-Synthese (modifiziert nach Herold und Andino 2001). **(B)** Modell zur Genomzyklisierung von BVDV und HCV. Die NFAR-Proteine binden an die 5'- und 3'UTR und zyklisieren die virale RNA. Es wird vermutet, dass die Zyklisierung die Koordination zwischen Translation und Replikation vermittelt (modifiziert nach Isken et al. 2003).

Für zwei Vertreter der Familie der *Flaviviridae* (BVDV und HCV) konnten die NFAR (*nuclear factor associated with RNA*)-Proteine als Mediatoren einer zirkulären RNA-Konformation identifiziert werden. Die NFAR-Proteine, zu denen NF90, NF45 und die RNA-Helikase A gehören, binden spezifisch an die virale 5'- und 3'UTR und vermitteln somit die Zyklisierung

der viralen RNA (Abb. 41B). Dies könnte einerseits der Koordination der Translation und der Replikation dienen. Da die NFAR-Proteine eine antivirale Aktivität aufweisen, wird andererseits vermutet, dass die Rekrutierung der NFAR-Proteine die antivirale Immunantwort unterbindet (Isken et al. 2003; Isken et al. 2007).

Der Protein-vermittelten Genomzyklisierung bei Polioviren, BVDV und HCV steht die Zyklisierung des RNA-Genoms durch komplementäre RNA-Sequenzen in der 5'- bzw. 3'UTR bei Flaviviren gegenüber. In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Zyklisierungssequenzen experimentell nachgewiesen, die eine Interaktion zwischen dem 5'- und 3'-Ende der flaviviralen RNA vermitteln und essentiell für die RNA-Replikation sind (siehe Einleitung, Abb. 3). Die Bedeutung der Zyklisierungssequenzen konnte in dieser Arbeit durch *in vitro*- und *in vivo*-Mutagenese-Studien bestätigt werden. Die in der Literatur schon verifizierten Zyklisierungssequenzen CS, UAR und DAR2 wurden in der subgenomischen RNA mutiert, die als Template für den *in vitro* RdRp-Assay diente. Dabei zeigte sich, dass Mutationen in der CS- und der DAR2-Sequenz einen deutlichen Effekt auf die *in vitro*-RNA-Replikation haben, wobei der Effekt der UAR-Mutation moderater ausgeprägt war. *In vivo* zeigte sich, dass die bisher als wichtig in der Replikation für DENV und WNV beschriebene DAR2-Sequenz (Friebe und Harris 2010; Friebe et al. 2011) offensichtlich auch eine wichtige Rolle in der Translation übernimmt, da die Mutagenese von DAR2 zu einer deutlichen Reduktion der Translationsaktivität geführt hat. Darüber hinaus konnte eine weitere, bisher noch nicht untersuchte, komplementäre Nukleotidsequenz zwischen der 5'- und 3'UTR namens DAR1 in dieser Arbeit als wichtig für die Translation bzw. Replikation des WNV identifiziert werden. Die Mutagenese dieser Sequenz ergab eine Reduktion der *in vitro* (-)Strang-RNA-Synthese auf ca. 50 % des WT-Levels. Die Analyse des WNV-Replikons *in vivo* ergab eine leichte Reduktion der Translationsaktivität der viralen Reporter-RNA. Nach 24 h war keine Replikation detektierbar. Nach 48 h jedoch replizierte das DAR1Mut-Replikon im gleichen Ausmaß wie das WT-Replikon. Dies deutet daraufhin, dass die verminderte Translationsaktivität zu einer verzögerten RNA-Replikation führt. Diese „widersprüchlichen“ Ergebnisse bezüglich der Beteiligung der DAR1- bzw. der DAR2-Sequenz an der Translation (*in vivo*) bzw. der Replikation (*in vitro*) stehen den Ergebnissen mit der CS bzw. UAR-Sequenz gegenüber. Für diese beiden Zyklisierungssequenzen konnte gezeigt werden, dass sie ausschließlich an der Replikation, nicht aber an der Translation der viralen RNA beteiligt sind (Lo et al. 2003; Alvarez et al. 2005a; Alvarez et al. 2008; Zhang et al. 2008).

In dieser Arbeit wurden die RNA-Konstrukte mit den Zyklisierungsmutationen zusätzlich durch die Einführung von Komplementationsmutationen in den entsprechenden 5'- bzw. 3'UTRs modifiziert. Dadurch wurde eine Basenpaarung zwischen den Zyklisierungssequenzen wiederhergestellt. Diese RNA-Konstrukte wurden im *in vitro* RdRp-Assay analysiert und es stellte sich heraus, dass, abgesehen von der CS-Komplementationsmutante, die Effizienz der

(-)-Strang-RNA-Synthese fast wieder der der WT-sgRNA entsprach. Daraus lässt sich schließen, dass nicht die Sequenz, sondern die Basenpaarung *per se*, d.h. die Ausbildung der RNA-Struktur, wichtig für eine effiziente RNA-Replikation ist. Somit konnte die Notwendigkeit der Sequenzkomplementarität der Zyklisierungssequenzen mit dem hier etablierten *in vitro* RdRp-Assay sowie mit dem WNV RNA-Replikon *in vivo* rekapituliert werden. Darüber hinaus wurde mit DAR1 eine weitere Zyklisierungssequenz bei WNV identifiziert, die vermutlich wichtig für die Translation bzw. Replikation der viralen RNA ist.

4.5.1. Die Funktion des *stem-loop A* in der flaviviralen Replikation

Die Arbeitsgruppe um Andrea Gamarnik konnte 2006 den Replikationsmechanismus von Dengue-Virus in Abhängigkeit von der Genomzyklisierung aufklären. So konnte gezeigt werden, dass die Polymerase-Domäne von NS5 (RdRp) spezifisch die 5'UTR erkennt und dabei an den 5'-terminalen *stem-loop* SLA bindet. Durch die 5'-3'-RNA-Interaktion befindet sich der 5'-SLA-RdRp-Komplex in räumlicher Nähe zum 3'-Ende, um die (-)-Strang-RNA-Synthese zu initiieren (Abb. 42; Filomatori et al. 2006). Dieses DENV-Modell ähnelt dem zuvor beschriebenen Poliovirus-Modell, da in beiden Fällen vor der Initiation der (-)-Strang-Replikation am 3'-Ende die virale Polymerase spezifisch an das 5'-Ende der viralen RNA bindet. Da die Sekundärstruktur der flaviviralen 5'UTR konserviert ist, wird dieser Replikationsmechanismus wahrscheinlich von allen Flaviviren verwendet. Für WNV konnte ebenfalls eine spezifische Bindung von NS5 an den SLA gezeigt werden (Dong et al. 2008b). Darüber hinaus wurden *cis*-aktive Elemente im SLA, die essentiell für die Replikation sind, für DENV und für WNV identifiziert (Lo et al. 2003; Filomatori et al. 2006; Li et al. 2010). Ein Nukleotidaustausch im *top-loop* der SLA, der die RNA-Replikation eines WNV-Replikons *in vivo* inhibierte (Lo et al. 2003), wurde in dieser Arbeit in die subgenomische RNA (SLAMut) eingeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese von NS5 mit dieser RNA als Template auf 20 % gesunken war im Vergleich zur WT-sgRNA. Dies deutet auf eine Abhängigkeit der RNA-Synthese durch NS5 von der spezifischen RNA-Sequenz im SLA hin und könnte auf eine verminderte Bindung von NS5 zu dieser SLAMut-RNA hinweisen. Es konnte jedoch für DENV gezeigt werden, dass eine Bindung von NS5 an den SLA allein nicht ausreichend für eine effiziente Replikation ist. Dies bedeutet, dass ein weiterer Schritt nach der Bindung erforderlich ist, um den Komplex in eine replikationskompetente Form zu überführen. Womöglich sind strukturelle Veränderungen *downstream* des SLA, die nach Bindung der RdRp-Domäne beobachtet wurden, für eine effiziente Initiation der (-)-Strang-RNA-Synthese notwendig (Filomatori et al. 2011).

Das flavivirale NS5 ist ein multifunktionales Protein. Zusätzlich zur RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Grun und Brinton 1986) enthält NS5 eine Methyltransferase- (MTase) sowie eine Guanyltransferase-Aktivität, die beide für die Formierung der cap I-Struktur am 5'-Ende

der viralen RNA notwendig sind (Egloff et al. 2002; Issur et al. 2009). Die Methyltransferase des WNV katalysiert dabei zwei Methylierungen der cap-Struktur an der N7-Position des Guanins und an der 2'-O Position der Ribose des ersten Nukleotids (Ray et al. 2006; Dong et al. 2008a). In diesem Zusammenhang konnten RNA-Elemente in dem SLA identifiziert werden, die essentiell für die zwei sukzessiven cap-Methylierungen sind (Dong et al. 2007). Somit hat der SLA mindestens zwei Funktionen im viralen Lebenszyklus. Zum einen dient er als Promoter für die RNA-Replikation, zum anderen als Ausgangspunkt für die erfolgreiche Methylierung der cap-Struktur am 5'-Ende. Bei der RNA-Bindung durch NS5 gibt es jedoch Unterschiede zwischen DENV und WNV. Während bei WNV die MTase-Domäne relativ stark und die RdRp-Domäne nur schwach an die SLA-Struktur binden, ist bei DENV die Situation umgekehrt (Filomatori et al. 2006; Dong et al. 2008b; Filomatori et al. 2011). Weiterhin konnte demonstriert werden, dass chimäre DENV, die das WNV-NS5 enthielten (RdRp- und/oder MTase-Domäne), replikationsdefizient waren. Dies deutet darauf hin, dass, trotz vieler Gemeinsamkeiten zwischen DENV und WNV, auch Unterschiede im Replikationsmechanismus, speziell in der Bindung der RNA durch NS5, beider Flaviviren existieren.

Zusammenfassend dargestellt bietet die Genomzyklisierung von RNA-Viren folgende Vorteile. Zum einen kann es der Koordination der beiden Prozesse der Translation bzw. Replikation förderlich sein. Zum anderen lokalisiert es die Polymerase an den Startpunkt der Replikation. Außerdem könnte es ein Kontrollmechanismus sein, der sicherstellt, dass nur vollständige RNA-Genome amplifiziert werden.

4.6. AUF1 verstärkt die flavivirale 5'-3'-RNA-Interaktion

Die Zyklisierungssequenz UAR in der 5'UTR ist *upstream* des AUG-Startcodons im *stem-loop* B (SLB) lokalisiert. Ebenso befindet sich die UAR-Sequenz der 3'UTR in einer *stem-loop*-Struktur, dem 3'SL (Abb. 42). Voraussetzung für eine Interaktion der komplementären 5'- und 3'UAR-Sequenzen sind Konformationsänderungen der konservierten RNA-Sekundärstrukturen. Dabei öffnen sich der SLB in der 5'UTR sowie der 3'-terminale SL, um die 5'-3'-Hybridisierung zu ermöglichen. Dies hat zur Folge, dass ein weniger stabiler 3'SL gebildet wird und außerdem einzelsträngige Nukleotide am 3'-Ende zur Verfügung stehen (Abb. 42; Dong et al. 2008b; Filomatori et al. 2011). Es wird vermutet, dass einzelsträngige Nukleotide die Initiation der RNA-Replikation durch NS5 erleichtern. Diese Vermutung wird durch die Kristallstruktur der flaviviralen RdRp-Domäne unterstützt. Die Struktur offenbarte, dass der Kanal für die Bindung des RNA-Substrats sehr eng ist und somit die Notwendigkeit einer ss-RNA deutlich macht (Malet et al. 2007; Yap et al. 2007).

Das „Aufschmelzen“ des 3'SL ist die Voraussetzung für die Initiation der (-)-Strang-RNA-Replikation, da die 3'UTR allein kein effizientes Template im *in vitro* RdRp-Assay ist (You et al. 2001; Nomaguchi et al. 2004; Filomatori et al. 2006). Es konnte sogar gezeigt werden, dass der 3'SL einen inhibitorischen Effekt auf die *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese ausübt (Filomatori et al. 2011). Dementsprechend dient die 5'-3'-UAR-Interaktion zwei Zwecken. Zum einen wird der *silencing*-Effekt des 3'SL aufgehoben und zum anderen wird der SLA-NS5-Komplex an das 3'-Ende der RNA positioniert.

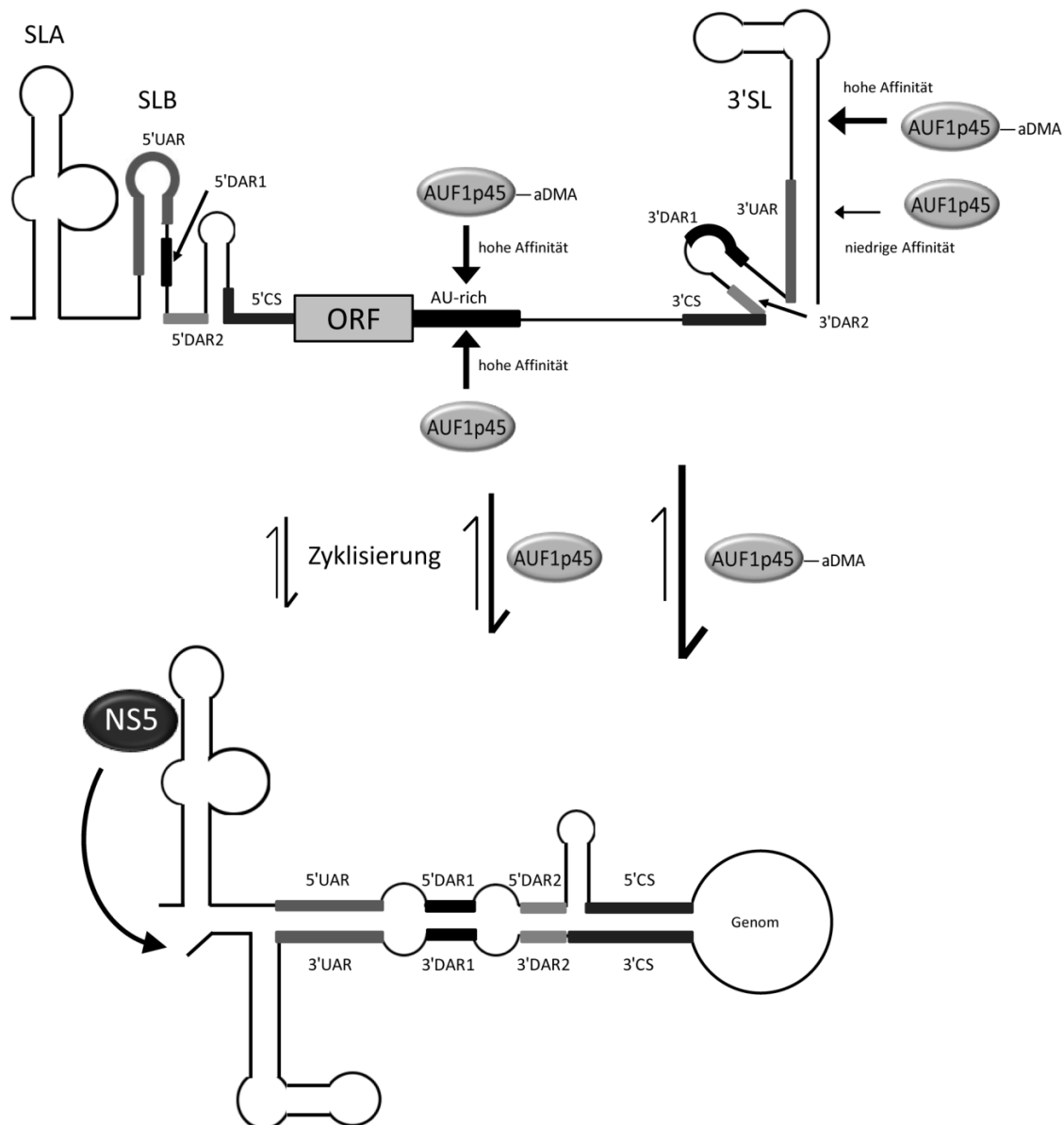


Abb. 42. Modell über die Beteiligung von AUF1 an der Zyklisierung der flaviviralen RNA. Die Replikation von Flaviviren ist abhängig von der Zyklisierung der genomischen RNA. Voraussetzung für die Interaktion der 5'-3'-Enden durch komplementäre Zyklisierungssequenzen sind Veränderungen der Sekundärstruktur der 5'UTR und des terminalen *stem-loops* der 3'UTR. Durch die Umstrukturierung entstehen am 3'-Ende einzelsträngige Nukleotide, die es der NS5-Polymerase vermutlich erleichtern, die (-)-RNA-Synthese zu initiieren. Das RNA-Bindeprotein AUF1p45 bindet mit hoher Affinität an die AU-reiche Region der 3'UTR, unabhängig von der Methylierung. Die Methylierung von AUF1p45 erhöht jedoch die Affinität des Proteins zum terminalen 3'-*stem-loop* (3'SL). Die Interaktion von AUF1p45 mit dem 3'SL führt zu einer Destabilisierung dieses *stem-loops*. Dadurch wird die Interaktion der 5'-3'-UAR-Sequenzen erleichtert und es stehen mehr zyklisierte RNA-Genome zur Verfügung, die von NS5 für die (-)-RNA-Synthese verwendet werden können.

Cis-aktive RNA-Elemente, die als *silencer* der Replikation agieren, konnten auch schon bei anderen (+)-Strang-RNA-Viren identifiziert werden. In dieser Hinsicht wurde ebenfalls beschrieben, dass eine Umstrukturierung am 3'-Ende eine Voraussetzung für die Initiation der RNA-Replikation ist (Olsthoorn et al. 1999; Pogany et al. 2003; Zhang et al. 2004; Zhang et al. 2006).

Obwohl *in vitro* mit Hilfe von *bandshift*-Assays eine RNA-RNA-Interaktion zwischen den flaviviralen 5'- und 3'-Enden gezeigt werden konnte, war diese nur effizient bei sehr hohen Konzentrationen beider RNAs oder bei hohem Überschuss einer der RNAs (Alvarez et al. 2005b; Alvarez et al. 2008; Dong et al. 2008b; Zhang et al. 2008; Lodeiro et al. 2009). Bei äquimolaren, physiologisch relevanteren RNA-Konzentrationen ist hingegen nur eine schwache Ausbildung eines 5'-3'-RNA-Komplexes sichtbar (Ivanyi-Nagy und Darlix 2012 und diese Arbeit). Dies wirft die Frage auf, ob virale und/oder zelluläre Faktoren an der RNA-RNA-Interaktion beteiligt sind. Die Beteiligung des WNV *core*-Proteins beim 5'-3'-*annealing* konnte kürzlich gezeigt werden. Dabei wurde in einem *bandshift*-Assay demonstriert, dass das *core*-Protein die Interaktion der 5'- und 3'-Enden beschleunigen kann. Jedoch wurden die viralen RNAs vor der Reaktion auf 95°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde das *annealing* der beiden RNAs in An- und Abwesenheit des *core*-Proteins verfolgt. Dadurch war der experimentelle Aufbau so gewählt, dass die RNA-*annealing*-Aktivität von *core* in den Focus gerückt wurde, und nicht eine putative Fähigkeit vorhandene *stem-loop*-Strukturen zu modulieren (Ivanyi-Nagy und Darlix 2012). Eine DNA bzw. RNA-*annealing*-Aktivität von *core* konnte schon für andere Mitglieder der *Flaviviridae* (DENV, HCV, BVDV) gezeigt werden. Es wird vermutet, dass diese RNA-*Chaperone*-Aktivität an der Genom-Verpackung beteiligt ist, bei der eine strukturelle Komprimierung stattfinden muss (Cristofari et al. 2004; Ivanyi-Nagy et al. 2008; Pong et al. 2011). Dagegen ist das *core*-Protein für die virale Replikation und folglich auch für die Zyklisierung der RNA entbehrlich, da flavivirale RNAs mit einer Deletion der Strukturgene (*core*, prM, E) selbstständig in Zellen replizieren (Khromykh und Westaway 1997).

Das flavivirale NS3-Protein übernimmt mehrere enzymatische Funktionen im viralen Lebenszyklus. Die Triphosphatase-Aktivität ist bei der Bildung der cap I-Struktur involviert und die Protease-Domäne ist bei der Prozessierung des viralen Polyproteins beteiligt (Chambers et al. 1990; Warrenner et al. 1993). Die genaue Funktion der ATP-abhängigen NS3-Helikase ist unbekannt, es wird aber vermutet, dass es bei der RNA-Replikation den neu gebildeten Doppelstrang trennt und bei der Initiation der RNA-Synthese Sekundärstrukturen in der 3'UTR aufwindet (Chen et al. 1997). Kürzlich wurde eine ATP-unabhängige RNA-*annealing*-Aktivität der DENV NS3-Helikase beschrieben (Gebhard et al. 2012). In einem *bandshift*-Assay konnten die Autoren zeigen, dass NS3 (vergleichbar mit AUF1p45 in dieser Arbeit) die Interaktion der viralen 5'- und 3'-Enden erleichtert. Jedoch konnten sie diese

Aktivität nicht in Verbindung mit einer verbesserten Replikation setzen, wodurch die Frage aufgeworfen wird, ob diese *annealing*-Aktivität physiologisch relevant für die flavivirale Replikation ist. Dementsprechend diskutieren die Autoren diese NS3-*annealing*-Aktivität im Zusammenhang mit einer anderen Funktion im Lebenszyklus, denn für die NS3-Helikase wurde eine Beteiligung an der Morphogenese von Viruspartikeln postuliert (Liu et al. 2002; Patkar und Kuhn 2008).

Im Zusammenhang der *core*-Protein-vermittelten RNA-*annealing*-Aktivität wurde diskutiert, dass zelluläre RNA-Bindeproteine eine wichtige Funktion bei der RNA-Zyklisierung übernehmen könnten (Ivanyi-Nagy und Darlix 2012). Eine Vielzahl von RNA-Bindeproteinen, die an die flaviviralen untranslatierten Regionen binden, konnte inzwischen identifiziert werden; die genaue Funktion dieser RNA-Protein-Interaktion jedoch bleibt unklar (siehe Einleitung). In dieser Arbeit konnte das RNA-Bindeprotein AUF1p45 als ein neuer Bindungspartner der WNV-RNA identifiziert werden. Darüber hinaus konnten Daten gewonnen werden, die demonstrieren, dass die RNA-*Chaperone*-Aktivität von AUF1p45 die RNA-Zyklisierung beschleunigt. AUF1p45 bindet an die 5'- und 3'UTR der WNV-RNA und vermittelt die 5'-3'-Interaktion in einem radioaktiven *bandshift*-Assay. Obwohl AUF1 die virale RNA-RNA-Interaktion erleichtert, ist eine vollständige Komplexbildung, auch bei hohen AUF1p45-Konzentrationen, nicht zu beobachten. Dies steht in Übereinstimmung mit einem kürzlich vorgeschlagenen Modell, indem ein Gleichgewicht zwischen der linearen und der zirkulären Konformation als entscheidend für die virale Replikation beschrieben wird (Villordo et al. 2010). Analog zum *in vitro* RdRp-Assay konnte auch für den *bandshift*-Assay gezeigt werden, dass die methylierte Variante von AUF1p45 eine höhere Aktivität aufwies, d.h. AUF1p45^{adMA} unterstützte die Ausbildung des 5'-3'-Komplexes effizienter (Abb. 42).

Weiterhin konnte mittels analytischer Ultrazentrifugation keine signifikante Interaktion zwischen AUF1p45 und der viralen Polymerase NS5 detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend ist der stimulierende Effekt von AUF1p45 auf die (-)-Strang-RNA-Synthese durch NS5 ausschließlich auf eine Interaktion mit der viralen RNA zurückzuführen.

Die subzelluläre Lokalisation der AUF1-Proteine wird durch aktive Transportprozesse (*Shuttling*) zwischen Cytoplasma und Zellkern gewährleistet, die isoform- und zelltypspezifisch sind (Loflin et al. 1999; Sarkar et al. 2003a). Die AUF1-Proteine in Huh7-Zellen sind hauptsächlich im Zellkern lokalisiert und verändern nach Replikation bzw. Infektion mit WNV ihre intrazelluläre Lokalisation nicht (Daten nicht gezeigt). Die flavivirale Replikation findet vorwiegend in membrangebundenen Replikationskomplexen statt; jedoch konnten aktive Replikationskomplexe auch im Zellkern infizierter Zellen nachgewiesen werden (siehe Einleitung). Demnach liegt die Vermutung nahe, dass AUF1 aufgrund seiner subzellulären Lokalisation die für die RNA-Replikation des WNV essentielle Genomzyklisierung hauptsächlich im Zellkern unterstützt.

Eine aktuelle Veröffentlichung erweitert das etablierte Flavivirus-Replikationsmodell. Die Autoren schlagen zusätzlich zur intramolekularen (+)-Strang-Zyklisierung die Existenz von Genom-Dimeren sowie Genom-Konkatemeren vor (Lott und Doran 2013). Diese RNA-Konformationen könnten mit spezifischen Phasen der viralen Infektion assoziiert sein. In einer frühen Phase der Infektion könnte die zyklisierte RNA-Konformation aufgrund geringer RNA-Konzentrationen einen Vorteil haben, während den intermolekularen RNA-RNA-Interaktionen zu späteren Zeitpunkten der Infektion, wenn die Replikation etabliert ist, eine größere Bedeutung zukommt (Lott und Doran 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Depletion von AUF1 die Vermehrung eines infektiösen Virus verzögert. Daher kann vermutet werden, dass AUF1 für eine effiziente Replikation zu frühen Zeitpunkten der Infektion notwendig ist. Sobald eine bestimmte RNA-Konzentration erreicht wird, wäre es denkbar, dass die RNA-Replikation unabhängig von zellulären Proteinen wie AUF1 stattfindet.

4.7. Die RNA-*Chaperone*-Aktivität von AUF1 destabilisiert den 3'SL

Proteine mit RNA-*Chaperone*-Aktivität sind ubiquitär verbreitet und übernehmen wichtige Funktionen im RNA-Metabolismus wie z.B. in der Transkription, im Zusammenbau und der Stabilisierung von Ribonukleoproteinkomplexen, beim RNA-Export und beim Spleißen (Rajkowitsch et al. 2007). Sie modifizieren RNAs, die in einer nicht-funktionalen Konformation „gefangen“ sind, indem sie die Sekundärstrukturen auflösen, ohne dabei ATP zu verbrauchen. Dies unterscheidet sie von RNA-Helikasen, für dessen Funktion eine ATPase-Aktivität essentiell ist. Proteine mit RNA-*Chaperone*-Aktivität interagieren nur vorübergehend mit der RNA und sind nicht mehr notwendig, sobald die RNA korrekt gefaltet ist (Rajkowitsch et al. 2007; Semrad 2011). Gemäß dieser Definition kann AUF1 als ein Protein mit RNA-*Chaperone*-Aktivität bezeichnet werden, da in dieser Arbeit im *bandshift*-Assay das Protein durch Phenol-Chloroform-Extraktion nach der Reaktion entfernt und offensichtlich nicht mehr für die Aufrechterhaltung des 5'-3'-Komplexes benötigt wurde.

Viele Proteine mit RNA-*Chaperone*-Aktivität zeigen die Tendenz zu dimerisieren bzw. zu oligomerisieren. Zum einen könnte dies die funktionale Proteineinheit darstellen, zum anderen aber auch der RNA-*Chaperone*-Aktivität behilflich sein (Rajkowitsch et al. 2007). Für AUF1 wurde gezeigt, dass alle Isoformen als Dimer existieren (DeMaria et al. 1997; Wilson et al. 1999; Zucconi et al. 2010). Dies steht im Widerspruch mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten, die beweisen, dass AUF1p45 als Monomer vorliegt. Durch analytische Ultrazentrifugation konnte gezeigt werden, dass das Molekulargewicht von AUF1p45 39.8 kDa beträgt, welches in guter Übereinstimmung mit dem theoretischen Molekulargewicht von 38.3 kDa ist. Eine Erklärung für diese Diskrepanz kann womöglich in der rekombinanten

Reinigung gefunden werden. Die Arbeitsgruppe um Gary Brewer reinigt die AUF1-Proteine über einen NiNTA-Affinitätschromatographie-Schritt. Direkt im Anschluss daran erfolgte der Nachweis des Dimers mit analytischer Ultrazentrifugation (AUF1p37, DeMaria et al. 1997) bzw. Gelfiltration (alle AUF1 Isoformen, Zucconi et al. 2010). Der Nachweis, dass die Präparation frei von Nukleinsäuren ist, wurde nicht erbracht. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit durch eine zusätzliche Ionenaustausch-Chromatographie sichergestellt, dass die Proteinpräparation von AUF1p45 frei von Verunreinigungen durch Nukleinsäuren ist. Dies konnte durch Aufnahme eines UV-Absorptionsspektrums bestätigt werden. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Abwesenheit von Nukleinsäuren wichtig für die Ausbildung des monomeren Zustands ist, da vor der Ionenaustausch-Chromatographie das Protein oligomer war (Daten nicht gezeigt). Die Bindung von RNA führt zur Oligomerisierung von AUF1 bis hin zur Ausbildung von Hexameren (Daten nicht gezeigt, DeMaria et al. 1997; Wilson et al. 1999; Zucconi et al. 2010). Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass die in der Literatur beobachtete Dimer-Struktur von AUF1 auf eine Verunreinigung der Proteinpräparation mit Nukleinsäuren hinweist.

AUF1 ist in der Lage strukturelle Veränderungen in gebundenen RNA-Substraten zu induzieren, die Phosphorylierungs- und Isoform-abhängig sind (Wilson et al. 2001; Wilson et al. 2003a; Zucconi et al. 2010). Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass nach Ausbildung eines AUF1-Tetramers die Isoformen p37 und p40 eine kondensierte RNA-Struktur aufrechterhalten, während die Isoformen p42 und p45 die RNA in eine offene Konformation überführen können (Zucconi et al. 2010). Solche Isoform-spezifischen Funktionen von AUF1 könnten eine Erklärung dafür sein, weshalb in dieser Arbeit nur die Isoform p45 von AUF1 die (-)-Strang-RNA-Synthese im *in vitro* RdRp-Assay stimulieren konnte.

Der in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenz-basierende RNA-*annealing*-Assay ist so konzipiert worden, dass das „Aufschmelzen“ der 3'SL^{trunc}-RNA eine Voraussetzung ist, damit ein Signal detektiert werden konnte. Der erste Schritt der Reaktion ist somit das „Aufschmelzen“ der 3'SL^{trunc}-RNA und der zweite Schritt ist das *annealing* der komplementären 5'-3'-UAR-Sequenzen. Das „Aufschmelzen“ des 3'SL^{trunc} ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, da die Geschwindigkeitskonstante unabhängig von der 3'SL^{trunc}-Konzentration war (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dessen wurden die Daten nach einer Reaktion erster Ordnung analysiert. Die komplementäre unmarkierte 3'UAR-RNA wurde dabei im Überschuss zur 3'SL^{trunc}-RNA eingesetzt, damit die RNA-RNA-Interaktion schnellstmöglich abläuft und die Gesamtreaktion nicht limitiert. Mit zunehmenden AUF1p45-Konzentrationen konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion anstieg. Dadurch war die Reaktion nicht mehr erster Ordnung, sondern zweiter Ordnung, d.h. die Entfaltung des 3'SL^{trunc} war nicht mehr geschwindigkeitsbestimmend.

Einblick in die Funktionsweise gewonnen werden. Dabei wurde gezeigt, dass das Nukleokapsid-*Chaperone* (NC) des murinen Leukämievirus intramolekulare Interaktionen schwächt, an denen exponierte Guanosin-Reste involviert sind. Dadurch werden starke Basenpaarungen destabilisiert und die Faltung der RNA wird vereinfacht. Interessanterweise interagiert das NC-Protein mit der finalen dimeren RNA-Struktur ebenso wie mit dem RNA-Monomer. Daraus wurde geschlossen, dass RNA-*Chaperones* nicht zwischen „korrektgefalteten“ und „falschgefalteten“ RNAs unterscheiden, sondern dass die Guanosin-Reste solange umgeordnet werden, bis das RNA-*Chaperone* die finale RNA-Struktur nicht mehr allzu stark destabilisieren kann (Grohman et al. 2013).

Weiterhin wird vermutet, dass die ungeordneten Regionen im Protein bei der *Chaperone*-Funktion eine wichtige Rolle einnehmen. Die Proteinklasse der RNA-*Chaperones* weist einen ca. 50%igen Anteil an ungeordneten Regionen auf (Tompa und Csermely 2004). Um den Mechanismus des RNA-*Chaperoning* zu erklären, wurde ein Entropie-Transfer-Modell vorgeschlagen. Dies besagt, dass die notwendige Energie zum Entfalten von lokalen RNA-Strukturen durch die gleichzeitig induzierte Faltung des RNA-*Chaperones* gewonnen wird. Tatsächlich konnte für viele *Chaperone*-Proteine eine Faltung von ungeordneten Bereichen nach Bindung des Substrats gezeigt werden (Dyson und Wright 2005; Kiefhaber et al. 2012). Auch AUF1 besitzt einen hohen Anteil an ungeordneten Regionen. Ähnlich wie das gut untersuchte RNA-*Chaperone* hnRNPA1 und das WNV *core*-Protein enthält es vor allem im N- und C-Terminus unstrukturierte Bereiche. Im Gegensatz dazu weist die Helikase-Domäne von DENV NS3 ein hohes Maß an gefalteten Strukturen auf (Abb. 44). Die N- und C-Termini von WNV *core* sind in der Lage separat RNA zu binden, jedoch konnte eine RNA-*Chaperone*-Aktivität nur dem C-Terminus zugeschrieben werden (Ivanyi-Nagy et al. 2008). Für die beiden hnRNP-Proteine hnRNPA1 und hnRNPU konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne eine RNA-Bindung und auch eine RNA-*Chaperone*-Aktivität vermittelt (Pontius und Berg 1990; Kiledjian und Dreyfuss 1992; Munroe und Dong 1992). Darüber hinaus konnte eine DNA-Bindungs-Aktivität im C-Terminus von AUF1 identifiziert werden (Tolnay et al. 2000). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die in dieser Arbeit beschriebene RNA-*Chaperone*-Aktivität von AUF1p45 vom C-Terminus vermittelt wird. Dies ist insbesondere hinsichtlich des dimethylierten Arginins von AUF1p45 an Position 345 interessant, da dieses ebenfalls in einem RGG-Motiv des C-Terminus lokalisiert ist und die methylierte Variante von AUF1p45 das *annealing* der viralen RNAs noch effizienter beschleunigt. Damit konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die posttranslationale Methylierung eines Proteins dessen RNA-*Chaperone*-Aktivität verstärkt und möglicherweise reguliert. Der hohe Anteil an ungeordneten Regionen von AUF1p45 konnte in dieser Arbeit mittels CD-Spektroskopie bestätigt werden. Basierend auf dem gemessenen CD-Spektrum lag der Anteil an ungeordneten Proteinstrukturen bei 56 %. Das

CD-Spektrum von AUF1p45 zeigte eine hohe Ähnlichkeit mit dem CD-Spektrum von AUF1 Isoform p37 (DeMaria et al. 1997). Dies deutet darauf hin, dass trotz der in Isoform p45 zusätzlich vorhandenen Proteinbereiche, die durch Exon 2 und 7 kodiert werden, die Sekundärstruktur der AUF1 Isoformen vergleichbar ist. Die methylierte Variante von AUF1p45 zeigte im CD-Spektrum eine Zunahme an α -helikalen Strukturen. Demnach führt die Methylierung zu einem erhöhten Anteil an gefalteten (stabilisierten) Strukturen in AUF1p45, die höchstwahrscheinlich zu der verbesserten RNA-Bindung des Proteins beitragen.

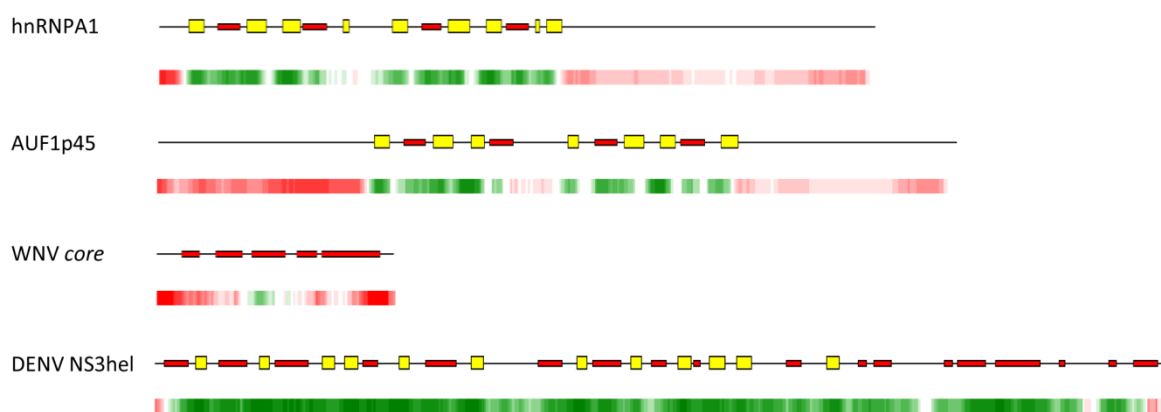


Abb. 44. Vergleich der Sekundärstrukturen verschiedener Proteine mit RNA-*Chaperone*-Aktivität. Dargestellt sind die Sekundärstrukturvorhersagen von hnRNPA1, AUF1 Isoform p45, WNV *core* und der NS3-Helikase Domäne von DENV. Die Sekundärstrukturvorhersagen sind mit den Programmen PROFsec und MD der Webseite www.predictprotein.org erstellt worden. Jeweils oben sind die Positionen der α -Helices (rote Boxen) und der β -Faltblätter (gelbe Boxen) innerhalb der Proteinsequenz gezeigt. Darunter ist die Unordnungsverteilung des Proteins dargestellt (rot: höchste Unordnung/Flexibilität, grün: gefaltet).

Zelluläre RNA-Bindeproteine wie hnRNPA1, YB-1 oder das La-Protein, die eine RNA-*Chaperone*-Aktivität aufweisen, konnten als Wirtsfaktoren verschiedener Viren identifiziert werden (siehe Einleitung; Zuniga et al. 2009). Diesen Wirtsfaktoren konnte zumeist eine Beteiligung an der Translation sowie an der Replikation nachgewiesen werden, jedoch ist unklar, inwiefern die Interaktion dieser Proteine mit der viralen RNA diese Prozesse unterstützt. Das zelluläre La-Protein bindet an die 5'- und 3'-Enden der RNA des Japanischen Enzephalitis-Virus und es wurde vermutet, dass dadurch die Zyklisierung der viralen RNA erleichtert wird (Vashist et al. 2011). Dagegen inhibierte das La-Protein allerdings die *in vitro* RNA-Replikation des Dengue-Virus (Yocupicio-Monroy et al. 2007).

Eine direkte Beteiligung der RNA-*Chaperone*-Aktivität eines zellulären Proteins bei der Vermehrung einer pathogenen RNA konnte beim Avocado-*sunblotch*-Viroid (ASBV) gezeigt werden (Daros und Flores 2002). Viroide sind die kleinsten bekannten Krankheitserreger und bestehen aus einer einzelsträngigen, zirkulären RNA. Da Viroide für keine Proteine kodieren,

müssen sie Wirtsfaktoren rekrutieren, die ihnen bei ihrer Vermehrung assistieren. Bei der Prozessierung der ASBV-RNA ist das Chloroplasten-RNA-Bindeprotein PARBP33 mit seiner RNA-*Chaperone*-Aktivität involviert, da es *in vitro* die durch das *hammerhead*-Ribozym-vermittelte Spaltung der ASBV-RNA stimuliert (Daros und Flores 2002).

4.8. Die Bedeutung der AU-reichen Region für *mosquito-borne*-Flaviviren

Instabile mRNAs enthalten AU-reiche Elemente (AU-rich elements, AREs) in ihren 3'UTRs. Diese AREs sind ungefähr 50 -150 Nt lang und enthalten oft ein oder mehrere Motive des Pentanukleotids AUUUA innerhalb einer Uracil-reichen Region (Chen und Shyu 1995; Barreau et al. 2005). AUF1 bindet effizient an die AREs verschiedener mRNAs *in vitro*, jedoch sind dafür intakte AUUUA-Motive nicht zwingend notwendig (DeMaria und Brewer 1996). Die AU-reiche Region der 3'UTR des WNV enthält zwei AUUUA-Motive (Abb. 45). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass rekombinantes AUF1p45, unabhängig vom Methylierungsstatus, eine hohe Affinität zur AU-reichen Region der WNV-RNA aufweist. Ob die AUUUA-Motive eine Rolle bei der hohen Affinität von AUF1p45 zur AU-reichen Region spielen, ist jedoch noch nicht geklärt.

Ein Sequenzvergleich zeigt, dass die AU-reiche Region bei *mosquito-borne*-Flaviviren unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Während die AU-reiche Region beim WNV und dem Subtyp Kunjin-Virus relativ lang ist (ca. 100 Nt) und einen hohen AU-Gehalt (79 bzw. 80 %) aufweist, ist sie bei JEV und DENV deutlich verkürzter (ca. 50 bzw. 30 Nt) und weniger AU-reich (58 bzw. 62 %). Der 3'UTR des YFV fehlt sogar eine Region mit einem hohen AU-Gehalt (Abb. 45). Die Deletion der AU-reichen Region des Kunjin-Virus hatte keinen Effekt auf die Replikation (Khromykh und Westaway 1997; Pijlman et al. 2008). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Deletionsmutante in der AU-reichen Region des WNV replikations-defizient war. Ein auffälliger Unterschied zwischen den 3'UTRs beider Viren ist das Fehlen der beiden AUUUA-Motive beim Kunjin-Virus (Abb. 45). Möglich wäre, dass speziell diese AUUUA-Motive essentiell für die Replikation des WNV sind.

Die Notwendigkeit der AU-reichen Region für die Replikation des WNV kann verschiedene Ursachen haben. Einerseits könnte sie zur Rekrutierung von AUF1 an die virale RNA dienen. Durch die Bindung von AUF1 an die AU-reiche Region würde es in der Nähe des 3'SL positioniert werden und könnte die Zyklisierung der WNV-RNA unterstützen. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die AU-reiche Region nicht essentiell ist für die *in vitro* (-)Strang-RNA-Synthese sowie für die stimulatorische Aktivität von AUF1p45. Andererseits ist die *in vivo*-Situation deutlich komplexer und kann die Interaktion von AUF1 mit der AU-reichen Region durchaus erfordern. Diese Möglichkeit wird dahingehend unterstützt, dass

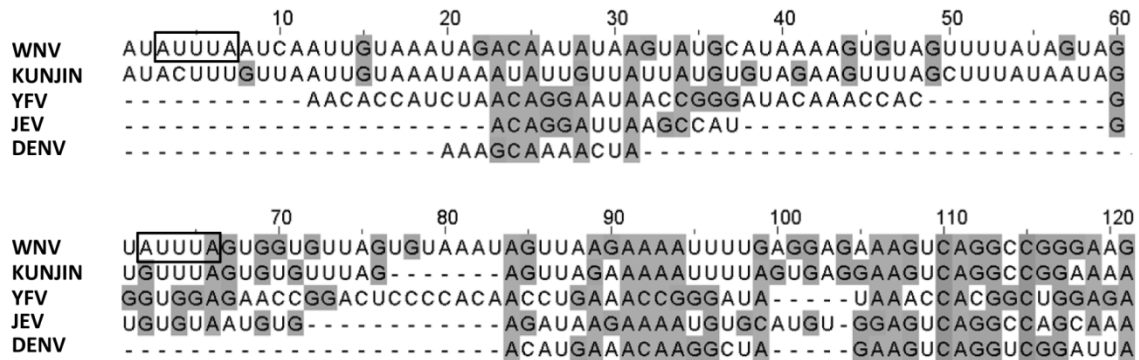


Abb. 45. Sequenzvergleich des 5'-Endes der 3'UTR verschiedener *mosquito-borne* Flaviviren. Die kompletten 3'UTRs von WNV, Kunjin-Virus, Gelbfiebervirus (YFV), Japanisches Enzephalitis-Virus (JEV) und Dengue-Virus (DENV) wurden mit dem *Alignment*-Programm MUSCLE (Edgar 2004) auf der ViPR (*Virus Pathogen Resource*)-Internetseite (www.viprbrc.org) verglichen. Die NCBI-Datenbank-Referenzen für die Nukleotidsequenzen sind folgende: WNV (AF404756), Kunjin-Virus (AY274505.1), YFV (NC_002031.1), JEV (AB698907.1), DENV (U87411.1). Dargestellt sind die ersten 120 Nt der WNV-3'UTR sowie die der Sequenz angeglichenen 5'-Enden der 3'UTRs von Kunjin-Virus, YFV, JEV und DENV. Die zwei Pentanukleotide AUUUA der WNV 3'UTR sind eingerahmt.

die AU-reiche Region sich innerhalb der 3'UTR in räumlicher Nähe zum 3'SL befindet. So könnte in einem denkbaren Szenario die 3'CS-Sequenz Basenpaarungen mit der AU-reichen Sequenz eingehen, sodass diese neben dem 3'SL positioniert wird (Strukturvorhersage mit dem RNA-Faltungsprogramm *mfold*, Abb. 46 im Anhang). Durch die Bindung von AUF1 an die AU-reiche Sequenz würde eine räumliche Nähe des Proteins zum terminalen 3'SL erreicht, wo es dann seine destabilisierende Funktion ausüben könnte.

Eine interessante Beobachtung wurde 2005 im Zusammenhang mit der DENV-Replikation gemacht. Die Deletion der variablen Region (inklusive der AU-reichen Region) der 3'UTR von DENV inhibierte die Replikation in BHK- (*baby hamster kidney*) Zellen. In der Stechmücken-Zelllinie C6/36 war die Replikation dieser DENV-RNA jedoch unbeeinflusst. Es wurde vermutet, dass RNA-Elemente der variablen Region der 3'UTR, vermutlich durch die Interaktion mit Wirtsfaktoren, die virale Replikation unterschiedlich in Säuger- bzw. Stechmücken-Zellen modulieren (Alvarez et al. 2005a). Diesbezüglich wäre es möglich, dass die AU-reiche Region des WNV bzw. das Wirtsprotein AUF1 nur in Säugierzellen und nicht in den Zellen des biologischen Überträgers für die Replikation des WNV essentiell ist.

Es wäre weiterhin denkbar, dass die Rekrutierung von AUF1 an die AU-reiche Region einen Vorteil für das Virus darstellt, indem es die zelluläre Homöostase von AUF1, d.h. die Interaktion mit anderen ARE-RNAs und/oder Proteinpartnern, stört. Darüber hinaus könnte die Bindung von ARE-Bindeproteinen an die AU-reiche Region zur Stabilisierung der viralen RNA beitragen. Dem steht gegenüber, dass die Deletionsmutante der AU-reichen Region 3 h nach der Transfektion die gleiche Stabilität wie die WT-RNA aufwies. Dennoch kann eine stabilisierende Rolle zu späteren Zeitpunkten der Replikation nicht ausgeschlossen werden.

4.9. Ausblick

Erste *in vivo*-Experimente mit einem DENV-Replikon in dieser Arbeit konnten eine Beteiligung von AUF1 an der Replikation dieses, mit dem WNV verwandten, Flavivirus nachweisen. Die in dieser Arbeit etablierten RNA-*annealing*-Assays sollten genutzt werden, um zu untersuchen, ob AUF1 auch in der Zyklisierung der DENV-RNA involviert ist. Damit könnte gezeigt werden, ob AUF1 mit seiner RNA-Chaperone-Aktivität generell die flavivirale Genom-Zyklisierung unterstützt.

Die (-)-Strang-RNA-Synthese erfordert die Zyklisierung des viralen Genoms. Indes ist noch unklar, welche RNA-Konformation für die Synthese neuer (+)-RNA-Moleküle ausgehend von den (-)-RNA-Intermediaten benötigt wird. Bis jetzt gibt es noch keine Möglichkeit die (+)- und (-)-Strang-Replikation *in vivo* getrennt voneinander zu betrachten. Jedoch könnte man die (+)-RNA-Replikation, ausgehend von dem (-)-Strang als Template, im *in vitro* RdRp-Assay untersuchen. Dabei könnte der Einfluss der Zyklisierungssequenzen sowie der Einfluss von AUF1p45 auf die (+)-Strang-RNA-Synthese näher analysiert werden. Darüber hinaus könnten die RNA-*annealing*-Assays genutzt werden, um eine putative (-)-Zyklisierung zu untersuchen. Der Fluoreszenz-basierte RNA-*annealing*-Assay könnte außerdem so konzipiert werden, sodass es möglich wäre zu überprüfen, ob AUF1p45 den *stem-loop* B (SLB) in der 5'UTR, welcher die 5'UAR-Sequenz enthält, destabilisieren kann, um die Interaktion mit der 3'UAR-Sequenz zu erleichtern.

Von Interesse wäre es auch, Deletionsvarianten von AUF1p45 zu charakterisieren, um herauszufinden, welche Proteindomänen die RNA-Chaperone-Aktivität vermitteln.

Eine Strukturanalyse der Zyklisierungsreaktion der WNV-RNAs mit und ohne AUF1p45 wäre hilfreich, um die Nukleotide zu identifizieren, die von AUF1p45 bevorzugt gebunden werden. Dazu könnte die SHAPE-*(selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension)* Methode angewandt werden, mit der man die RNA-Faltung auf Ebene jedes einzelnen Nukleotids zeitabhängig untersuchen kann (Mortimer und Weeks 2009; Grohman et al. 2013).

Zu guter Letzt sollte die Methylierung des endogenen AUF1 näher charakterisiert werden. Zum Beispiel könnte das Methylierungsmuster des zellulären AUF1 vor und während der Replikation einer WNV-Replikon-RNA analysiert werden. Dabei sollten alle Isoformen von AUF1 mit einbezogen werden, um herauszufinden, ob der durch Exon 7 kodierte Proteimbereich im C-Terminus wichtig für die Methylierung durch PRMT1 ist. Die Transfektion der restlichen AUF1-Isoformen p37, p40 und p42 in humane Zellen und eine anschließende massenspektrometrische Analyse der immunpräzipitierten FLAG-getaggten Isoformen sollten dabei Aufschluss geben.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund ihrer begrenzten Genomgröße sind Viren während ihres Lebenszyklus auf Wirtszellen angewiesen und gelten nicht als eigenständige Lebewesen. Das (+)-Strang-RNA-Virus West-Nil (WNV) gehört zur Familie der *Flaviviridae* und nutzt bei seiner Vermehrung in Säugerzellen verschiedene zelluläre Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurde das RNA-Bindeprotein AUF1 als ein neuer Wirtsfaktor der West-Nil-Virus-Replikation identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass AUF1 die, für die RNA-Replikation notwendige, Zyklisierung des viralen Genoms effizient unterstützt.

1. Zelluläre RNA-Bindeproteine wurden spezifisch angereichert um sie hinsichtlich einer Beteiligung am ersten Schritt der WNV Replikation, d.h. der (-)-Strang-RNA-Synthese, zu untersuchen. Die massenspektrometrische Analyse der finalen Proteinfraction mit stimulatorischer Aktivität auf die (-)-Strang-RNA-Synthese identifizierte u.a. das RNA-Bindeprotein *AU-rich element binding factor 1* (AUF1).
2. Die Depletion des endogenen AUF1 durch RNA-Interferenz reduzierte die Replikation eines WNV-Replikons. Durch Verwendung eines Renilla-Luziferase-Reporter-Replikons konnte eine Beteiligung von AUF1 an der Translation der WNV-RNA ausgeschlossen werden. Weiterhin führte die AUF1-Depletion zu einer verzögerten Vermehrung eines infektiösen WNV. Diese Daten ließen auf eine Funktion von AUF1 als Wirtsfaktor der Replikation des WNV schließen.
3. AUF1 fördert die WNV *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese. Die vier Isoformen von AUF1 p37, p40, p42 und p45 wurden als FLAG-Fusionsproteine immunpräzipitiert. Von den vier getesteten AUF1-Isoformen stimulierte nur die Isoform p45 die (-)-Strang-RNA-Synthese von NS5. Diese Daten konnten mit rekombinant gereinigtem AUF1p45 aus *E. coli* bestätigt werden.
4. In humanen Zellen exprimiertes FLAG-AUF1p45 assoziiert mit *heterogeneous ribonucleoprotein H1* (hnRNPH1) und der Methyltransferase PRMT1. Weiterhin konnte eine posttranslationale Modifikation von FLAG-AUF1p45 in Form einer Dimethylierung des Arginins an Position 345 identifiziert werden.
5. Rekombinant gereinigtes PRMT1 aus *E. coli* methyliert AUF1p45 *in vitro*. Dabei zeigte sich, dass AUF1p45 von den hier getesteten PRMT1-Isoformen v1, v2, v3 und v5 mit gleicher Effizienz *in vitro* methyliert wurde.
6. AUF1p45 wurde als methylierte Variante (AUF1p45^{adMA}) aus *E. coli* durch eine Co-Expression mit PRMT1 v1 rekombinant gereinigt. Die Analyse von AUF1p45^{adMA} durch Massenspektrometrie bestätigte die Dimethylierung des Arginins an Position 345. Die

- methylierte Variante AUF1p45^{aDMA} erwies sich als effizienter die WNV *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese zu stimulieren im Vergleich zum nicht-methylierten AUF1p45.
7. In Protein-RNA-Interaktionsstudien konnte nachgewiesen werden, dass die nicht-methylierte und methylierte Variante von AUF1p45 an die WNV-RNA binden. Beide Varianten zeigten eine vergleichbar hohe Affinität zur AU-reichen Region in der 3'UTR. Dagegen war die Affinität der methylierten Variante zu den 5'- und 3'-terminalen Enden der WNV-RNA, im Vergleich zum nicht-methylierten Protein, deutlich verbessert.
 8. AUF1p45 verstärkt die Interaktion der 5'- und der 3'-terminalen Enden der WNV-RNA. Dabei zeigte sich, dass die methylierte Variante, im Vergleich zur nicht-methylierten Variante von AUF1p45, die Interaktion beider RNAs effizienter unterstützte. Damit wurde eine Beteiligung von AUF1p45 an der Genomzyklisierung der WNV-RNA nachgewiesen.
 9. Es wurde ein Fluoreszenz-basierter RNA-*annealing*-Assay etabliert, der die Interaktion der 5'- und 3'UAR-Sequenzen des WNV-Genoms repräsentiert. Damit konnte gezeigt werden, dass AUF1p45 den 3'-terminalen *stem-loop* der WNV-RNA destabilisiert und somit die Interaktion zwischen den 5'- und 3'UAR-Sequenzen beschleunigt. Die methylierte Variante von AUF1p45 erwies sich dabei, im Vergleich zum nicht-methylierten Protein, als deutlich effizienter das 5'-3'-*annealing* zu beschleunigen. Diese Daten zeigen erstmals, dass die Argininmethylierung als post-translationale Modifikation die RNA-Chaperone-Aktivität eines Proteins verbessert.
 10. Die Sekundärstruktur von AUF1p45 weist einen relativ hohen Anteil an ungeordneten Proteinstrukturen auf. Die Methylierung von AUF1p45 führte zu einem erhöhten Anteil an α -helikalen Strukturen und ist höchstwahrscheinlich eine Erklärung für die veränderten Eigenschaften des Proteins hinsichtlich seiner RNA-Bindungseigenschaften und der RNA-Chaperone-Aktivität.
 11. Die Deletion der AU-reichen Region in der 3'UTR des WNV-Replikons führte zum völligen Verlust der Replikationsfähigkeit der viralen RNA. Die Deletion der AU-reichen Region im Renilla-Luziferase-Reporter-Replikon zeigte, dass die Translation nur minimal beeinflusst war. Damit konnte die AU-reiche Region als ein essentielles RNA-Element für die RNA-Replikation des WNV-Replikons *in vivo* identifiziert werden. Sie ist jedoch nicht essentiell für die AUF1p45-vermittelte Stimulierung der *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese durch NS5.
 12. Die RNAi-vermittelte Depletion des endogenen AUF1 verminderte die Translation und die Replikation eines Dengue-Virus-Replikons *in vivo*. Damit konnten erste Hinweise auf eine generelle Funktion von AUF1 als Wirtsfaktor der Replikation von *mosquito-borne* Flaviviren gewonnen werden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Agis-Juarez, R.A., Galvan, I., Medina, F., Daikoku, T., Padmanabhan, R., Ludert, J.E. und del Angel, R.M.** 2009. Polypyrimidine tract-binding protein is relocated to the cytoplasm and is required during dengue virus infection in Vero cells. *J Gen Virol* **90**(Pt 12): 2893-2901.
- Ahlquist, P., Noueir, A.O., Lee, W.M., Kushner, D.B. und Dye, B.T.** 2003. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* **77**(15): 8181-8186.
- Akada, R.** 1994. Quick-check method to test the size of Escherichia coli plasmids. *Biotechniques* **17**(1): 58.
- Allison, S.L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C.W., Kunz, C. und Heinz, F.X.** 1995. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol* **69**(2): 695-700.
- Alvarez, D.E., De Lella Ezcurra, A.L., Fucito, S. und Gamarnik, A.V.** 2005a. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology* **339**(2): 200-212.
- Alvarez, D.E., Filomatori, C.V. und Gamarnik, A.V.** 2008. Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs. *Virology* **375**(1): 223-235.
- Alvarez, D.E., Lodeiro, M.F., Luduena, S.J., Pietrasanta, L.I. und Gamarnik, A.V.** 2005b. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J Virol* **79**(11): 6631-6643.
- Arnold, C.** 2012. West Nile virus bites back. *Lancet Neurol* **11**(12): 1023-1024.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Sedman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K.** 1993. *Current protocols in molecular biology*.
- Barreau, C., Paillard, L. und Osborne, H.B.** 2005. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* **33**(22): 7138-7150.
- Barton, D.J., Morasco, B.J. und Flanagan, J.B.** 1999. Translating ribosomes inhibit poliovirus negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **73**(12): 10104-10112.
- Barton, D.J., O'Donnell, B.J. und Flanagan, J.B.** 2001. 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *EMBO J* **20**(6): 1439-1448.
- Bedford, M.T. und Clarke, S.G.** 2009. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* **33**(1): 1-13.
- Behrens, S.E., Grassmann, C.W., Thiel, H.J., Meyers, G. und Tautz, N.** 1998. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol* **72**(3): 2364-2372.
- Behrens, S.E., Tomei, L. und De Francesco, R.** 1996. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* **15**(1): 12-22.
- Blackwell, J.L. und Brinton, M.A.** 1997. Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 3' stem-loop region of West Nile virus genomic RNA. *J Virol* **71**(9): 6433-6444.
- Boffa, L.C., Karn, J., Vidali, G. und Allfrey, V.G.** 1977. Distribution of NG, NG₂-dimethylarginine in nuclear protein fractions. *Biochem Biophys Res Commun* **74**(3): 969-976.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bredenbeek, P.J., Kooi, E.A., Lindenbach, B., Huijckman, N., Rice, C.M. und Spaan, W.J.** 2003. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J Gen Virol* **84**(Pt 5): 1261-1268.
- Brewer, G.** 1991. An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol* **11**(5): 2460-2466.
- Brierley, I., Pennell, S. und Gilbert, R.J.** 2007. Viral RNA pseudoknots: versatile motifs in gene expression and replication. *Nat Rev Microbiol* **5**(8): 598-610.
- Brinton, M.A.** 2002. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol* **56**: 371-402.
- Brinton, M.A. und Dispoto, J.H.** 1988. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology* **162**(2): 290-299.

- Brinton, M.A., Fernandez, A.V. und Dispoto, J.H.** 1986. The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology* **153**(1): 113-121.
- Buckley, A., Gaidamovich, S., Turchinskaya, A. und Gould, E.A.** 1992. Monoclonal antibodies identify the NS5 yellow fever virus non-structural protein in the nuclei of infected cells. *J Gen Virol* **73** (Pt 5): 1125-1130.
- Bulich, R. und Aaskov, J.G.** 1992. Nuclear localization of dengue 2 virus core protein detected with monoclonal antibodies. *J Gen Virol* **73** (Pt 11): 2999-3003.
- Chambers, T.J., Weir, R.C., Grakoui, A., McCourt, D.W., Bazan, J.F., Fletterick, R.J. und Rice, C.M.** 1990. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(22): 8898-8902.
- Chen, C.J., Kuo, M.D., Chien, L.J., Hsu, S.L., Wang, Y.M. und Lin, J.H.** 1997. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *J Virol* **71**(5): 3466-3473.
- Chen, C.Y. und Shyu, A.B.** 1995. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* **20**(11): 465-470.
- Chu, J.J. und Ng, M.L.** 2004. Interaction of West Nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells. *J Biol Chem* **279**(52): 54533-54541.
- Corver, J., Lenches, E., Smith, K., Robison, R.A., Sando, T., Strauss, E.G. und Strauss, J.H.** 2003. Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. *J Virol* **77**(3): 2265-2270.
- Cote, J., Boisvert, F.M., Boulanger, M.C., Bedford, M.T. und Richard, S.** 2003. Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Mol Biol Cell* **14**(1): 274-287.
- Cristofari, G., Ivanyi-Nagy, R., Gabus, C., Boulant, S., Lavergne, J.P., Penin, F. und Darlix, J.L.** 2004. The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro. *Nucleic Acids Res* **32**(8): 2623-2631.
- Danis, K., Papa, A., Papanikolaou, E., Dougas, G., Terzaki, I., Baka, A., Vrioni, G., Kapsimali, V., Tsakris, A., Kansouzidou, A. et al.** 2011a. Ongoing outbreak of West Nile virus infection in humans, Greece, July to August 2011. *Euro Surveill* **16**(34).
- Danis, K., Papa, A., Theocharopoulos, G., Dougas, G., Athanasiou, M., Detsis, M., Baka, A., Lytras, T., Mellou, K., Bonovas, S. et al.** 2011b. Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010. *Emerg Infect Dis* **17**(10): 1868-1872.
- Daros, J.A. und Flores, R.** 2002. A chloroplast protein binds a viroid RNA in vivo and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *EMBO J* **21**(4): 749-759.
- Davis, W.G., Basu, M., Elrod, E.J., Germann, M.W. und Brinton, M.A.** 2013. Identification of cis-acting nucleotides and a structural feature in the West Nile virus 3' terminal RNA that facilitate viral minus strand RNA synthesis. *J Virol*.
- Davis, W.G., Blackwell, J.L., Shi, P.Y. und Brinton, M.A.** 2007. Interaction between the cellular protein eEF1A and the 3'-terminal stem-loop of West Nile virus genomic RNA facilitates viral minus-strand RNA synthesis. *J Virol* **81**(18): 10172-10187.
- De Filette, M., Ulbert, S., Diamond, M. und Sanders, N.N.** 2012. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet Res* **43**(1): 16.
- De Nova-Ocampo, M., Villegas-Sepulveda, N. und del Angel, R.M.** 2002. Translation elongation factor-1alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology* **295**(2): 337-347.
- DeMaria, C.T. und Brewer, G.** 1996. AUF1 binding affinity to A+U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J Biol Chem* **271**(21): 12179-12184.
- DeMaria, C.T., Sun, Y., Long, L., Wagner, B.J. und Brewer, G.** 1997. Structural determinants in AUF1 required for high affinity binding to A + U-rich elements. *J Biol Chem* **272**(44): 27635-27643.
- den Boon, J.A. und Ahlquist, P.** 2010. Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu Rev Microbiol* **64**: 241-256.

- den Boon, J.A., Diaz, A. und Ahlquist, P. 2010. Cytoplasmic viral replication complexes. *Cell Host Microbe* **8**(1): 77-85.
- Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J. und Gygi, S.P. 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(31): 10762-10767.
- Diez, J., Ishikawa, M., Kaido, M. und Ahlquist, P. 2000. Identification and characterization of a host protein required for efficient template selection in viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(8): 3913-3918.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. und Roeder, R.G. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**(5): 1475-1489.
- Dong, H., Ray, D., Ren, S., Zhang, B., Puig-Basagoiti, F., Takagi, Y., Ho, C.K., Li, H. und Shi, P.Y. 2007. Distinct RNA elements confer specificity to flavivirus RNA cap methylation events. *J Virol* **81**(9): 4412-4421.
- Dong, H., Ren, S., Zhang, B., Zhou, Y., Puig-Basagoiti, F., Li, H. und Shi, P.Y. 2008a. West Nile virus methyltransferase catalyzes two methylations of the viral RNA cap through a substrate-repositioning mechanism. *J Virol* **82**(9): 4295-4307.
- Dong, H., Zhang, B. und Shi, P.Y. 2008b. Terminal structures of West Nile virus genomic RNA and their interactions with viral NS5 protein. *Virology* **381**(1): 123-135.
- Dyson, H.J. und Wright, P.E. 2005. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(3): 197-208.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**(5): 1792-1797.
- Egloff, M.P., Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J.L. und Canard, B. 2002. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J* **21**(11): 2757-2768.
- Elghonemy, S., Davis, W.G. und Brinton, M.A. 2005. The majority of the nucleotides in the top loop of the genomic 3' terminal stem loop structure are cis-acting in a West Nile virus infectious clone. *Virology* **331**(2): 238-246.
- Elshuber, S., Allison, S.L., Heinz, F.X. und Mandl, C.W. 2003. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol* **84**(Pt 1): 183-191.
- Emara, M.M. und Brinton, M.A. 2007. Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(21): 9041-9046.
- Emara, M.M., Liu, H., Davis, W.G. und Brinton, M.A. 2008. Mutation of mapped TIA-1/TIAR binding sites in the 3' terminal stem-loop of West Nile virus minus-strand RNA in an infectious clone negatively affects genomic RNA amplification. *J Virol* **82**(21): 10657-10670.
- Enokizono, Y., Konishi, Y., Nagata, K., Ouhashi, K., Uesugi, S., Ishikawa, F. und Katahira, M. 2005. Structure of hnRNP D complexed with single-stranded telomere DNA and unfolding of the quadruplex by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D. *J Biol Chem* **280**(19): 18862-18870.
- Eversole, A. und Maizels, N. 2000. In vitro properties of the conserved mammalian protein hnRNP D suggest a role in telomere maintenance. *Mol Cell Biol* **20**(15): 5425-5432.
- Falgout, B., Pethel, M., Zhang, Y.M. und Lai, C.J. 1991. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol* **65**(5): 2467-2475.
- Fellows, A., Deng, B., Mierke, D., Robey, R.B. und Nichols, R.C. 2013. Peptides modeled on the RGG domain of AUF1/hnRNP-D regulate 3' UTR-dependent gene expression. *Int Immunopharmacol.*
- Fernandez-Garcia, M.D., Mazzon, M., Jacobs, M. und Amara, A. 2009. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe* **5**(4): 318-328.

- Filomatori, C.V., Iglesias, N.G., Villordo, S.M., Alvarez, D.E. und Gamarnik, A.V. 2011. RNA sequences and structures required for the recruitment and activity of the dengue virus polymerase. *J Biol Chem* **286**(9): 6929-6939.
- Filomatori, C.V., Lodeiro, M.F., Alvarez, D.E., Samsa, M.M., Pietrasanta, L. und Gamarnik, A.V. 2006. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev* **20**(16): 2238-2249.
- Forwood, J.K., Brooks, A., Briggs, L.J., Xiao, C.Y., Jans, D.A. und Vasudevan, S.G. 1999. The 37-amino-acid interdomain of dengue virus NS5 protein contains a functional NLS and inhibitory CK2 site. *Biochem Biophys Res Commun* **257**(3): 731-737.
- Friebe, P. und Harris, E. 2010. Interplay of RNA elements in the dengue virus 5' and 3' ends required for viral RNA replication. *J Virol* **84**(12): 6103-6118.
- Friebe, P., Shi, P.Y. und Harris, E. 2011. The 5' and 3' downstream AUG region elements are required for mosquito-borne flavivirus RNA replication. *J Virol* **85**(4): 1900-1905.
- Fronz, K., Guttinger, S., Burkert, K., Kuhn, U., Stohr, N., Schierhorn, A. und Wahle, E. 2011. Arginine methylation of the nuclear poly(a) binding protein weakens the interaction with its nuclear import receptor, transportin. *J Biol Chem* **286**(38): 32986-32994.
- Fuentes-Panana, E.M., Peng, R., Brewer, G., Tan, J. und Ling, P.D. 2000. Regulation of the Epstein-Barr virus C promoter by AUF1 and the cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway. *J Virol* **74**(17): 8166-8175.
- Funk, A., Truong, K., Nagasaki, T., Torres, S., Floden, N., Balmori Melian, E., Edmonds, J., Dong, H., Shi, P.Y. und Khromykh, A.A. 2010. RNA structures required for production of subgenomic flavivirus RNA. *J Virol* **84**(21): 11407-11417.
- Gamarnik, A.V. und Andino, R. 1997. Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *RNA* **3**(8): 882-892.
- Gamarnik, A.V. und Andino, R. 1998. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* **12**(15): 2293-2304.
- Garcia-Montalvo, B.M., Medina, F. und del Angel, R.M. 2004. La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA. *Virus Res* **102**(2): 141-150.
- Gebhard, L.G., Kaufman, S.B. und Gamarnik, A.V. 2012. Novel ATP-independent RNA annealing activity of the dengue virus NS3 helicase. *PLoS One* **7**(4): e36244.
- Gomila, R.C., Martin, G.W. und Gehrke, L. 2011. NF90 binds the dengue virus RNA 3' terminus and is a positive regulator of dengue virus replication. *PLoS One* **6**(2): e16687.
- Gouble, A., Grazide, S., Meggetto, F., Mercier, P., Delsol, G. und Morello, D. 2002. A new player in oncogenesis: AUF1/hnRNP overexpression leads to tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Res* **62**(5): 1489-1495.
- Goulet, I., Gauvin, G., Boisvenue, S. und Cote, J. 2007. Alternative splicing yields protein arginine methyltransferase 1 isoforms with distinct activity, substrate specificity, and subcellular localization. *J Biol Chem* **282**(45): 33009-33021.
- Grassmann, C.W., Yu, H., Isken, O. und Behrens, S.E. 2005. Hepatitis C virus and the related bovine viral diarrhea virus considerably differ in the functional organization of the 5' non-translated region: implications for the viral life cycle. *Virology* **333**(2): 349-366.
- Grohman, J.K., Gorelick, R.J., Lickwar, C.R., Lieb, J.D., Bower, B.D., Znosko, B.M. und Weeks, K.M. 2013. A guanosine-centric mechanism for RNA chaperone function. *Science* **340**(6129): 190-195.
- Grun, J.B. und Brinton, M.A. 1986. Characterization of West Nile virus RNA-dependent RNA polymerase and cellular terminal adenylyl and uridylyl transferases in cell-free extracts. *J Virol* **60**(3): 1113-1124.
- Hahn, C.S., Hahn, Y.S., Rice, C.M., Lee, E., Dalgarno, L., Strauss, E.G. und Strauss, J.H. 1987. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J Mol Biol* **198**(1): 33-41.
- Han, S.P., Tang, Y.H. und Smith, R. 2010. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J* **430**(3): 379-392.

- Heinz, F.X., Collett, M.S., Purcell, R.H., Gould, E.A., Howard, C.R., Houghton, M., Moormann, R.J.M., Rice, C.M. und Thiel, H.J. 2000. Family Flaviviridae. in *Virus Taxonomy Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (ed. M. van, C.F. Regenmortel, DHL Bishop, EB Carstens, MK Estes, SM Lemon, J, and M.M. Maniloff, DJ McGeoch, CR Pringle, RB Wickner), pp. pp. 860-878. Academic Press, San Diego.
- Herold, J. und Andino, R. 2001. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* **7**(3): 581-591.
- Hsu, N.Y., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y.H., Takvorian, P.M., Pau, C., van der Schaar, H., Kaushik-Basu, N., Balla, T. et al. 2010. Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* **141**(5): 799-811.
- Hung, M.L., Hautbergue, G.M., Snijders, A.P., Dickman, M.J. und Wilson, S.A. 2010. Arginine methylation of REF/ALY promotes efficient handover of mRNA to TAP/NXF1. *Nucleic Acids Res* **38**(10): 3351-3361.
- Iglesias, N.G., Filomatori, C.V. und Gamarnik, A.V. 2011. The F1 motif of dengue virus polymerase NS5 is involved in promoter-dependent RNA synthesis. *J Virol* **85**(12): 5745-5756.
- Isken, O., Baroth, M., Grassmann, C.W., Weinlich, S., Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A. und 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. und Behrens, S.E. 2003. Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus. *EMBO J* **22**(21): 5655-5665.
- Isken, O., Grassmann, C.W., Yu, H. und Behrens, S.E. 2004. Complex signals in the genomic 3' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus coordinate translation and replication of the viral RNA. *RNA* **10**(10): 1637-1652.
- Issur, M., Geiss, B.J., Bougie, I., Picard-Jean, F., Despins, S., Mayette, J., Hobdey, S.E. und Bisailon, M. 2009. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA* **15**(12): 2340-2350.
- Ivanyi-Nagy, R. und Darlix, J.L. 2012. Core protein-mediated 5'-3' annealing of the West Nile virus genomic RNA in vitro. *Virus Res* **167**(2): 226-235.
- Ivanyi-Nagy, R., Davidovic, L., Khandjian, E.W. und Darlix, J.L. 2005. Disordered RNA chaperone proteins: from functions to disease. *Cell Mol Life Sci* **62**(13): 1409-1417.
- Ivanyi-Nagy, R., Lavergne, J.P., Gabus, C., Ficheux, D. und Darlix, J.L. 2008. RNA chaperoning and intrinsic disorder in the core proteins of Flaviviridae. *Nucleic Acids Res* **36**(3): 712-725.
- Janda, M. und Ahlquist, P. 1998. Brome mosaic virus RNA replication protein 1a dramatically increases in vivo stability but not translation of viral genomic RNA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2227-2232.
- Kapoor, M., Zhang, L., Ramachandra, M., Kusukawa, J., Ebner, K.E. und Padmanabhan, R. 1995. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J Biol Chem* **270**(32): 19100-19106.
- Katoh, H., Mori, Y., Kambara, H., Abe, T., Fukuhara, T., Morita, E., Moriishi, K., Kamitani, W. und Matsuura, Y. 2011. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through an interaction with viral proteins and RNA. *J Virol* **85**(21): 10976-10988.
- Khromykh, A.A., Meka, H., Guyatt, K.J. und Westaway, E.G. 2001. Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J Virol* **75**(14): 6719-6728.
- Khromykh, A.A. und Westaway, E.G. 1997. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J Virol* **71**(2): 1497-1505.
- Kiefhaber, T., Bachmann, A. und Jensen, K.S. 2012. Dynamics and mechanisms of coupled protein folding and binding reactions. *Curr Opin Struct Biol* **22**(1): 21-29.
- Kiledjian, M. und Dreyfuss, G. 1992. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J* **11**(7): 2655-2664.

- Kilpatrick, A.M.** 2012. Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus. *Science* **334**(6054): 323-327.
- Koonin, E.V.** 1993. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J Gen Virol* **74** (Pt 4): 733-740.
- Kramer, L.D., Li, J. und Shi, P.Y.** 2007. West Nile virus. *Lancet Neurol* **6**(2): 171-181.
- Krishnan, M.N., Ng, A., Sukumaran, B., Gilfoy, F.D., Uchil, P.D., Sultana, H., Brass, A.L., Adametz, R., Tsui, M., Qian, F. et al.** 2008. RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* **455**(7210): 242-245.
- Kumar, A., Ray, U. und Das, S.** 2013. Human La Protein Interaction With GCAC Near the Initiator AUG Enhances HCV RNA Replication by Promoting Linkage Between 5' -and 3' - Untranslated Regions. *J Virol*.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lanciotti, R.S., Ebel, G.D., Deubel, V., Kerst, A.J., Murri, S., Meyer, R., Bowen, M., McKinney, N., Morrill, W.E., Crabtree, M.B. et al.** 2002. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology* **298**(1): 96-105.
- Lanciotti, R.S., Roehrig, J.T., Deubel, V., Smith, J., Parker, M., Steele, K., Crise, B., Volpe, K.E., Crabtree, M.B., Scherret, J.H. et al.** 1999. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* **286**(5448): 2333-2337.
- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G. und Schneider, R.J.** 1999. Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* **284**(5413): 499-502.
- Laroia, G., Sarkar, B. und Schneider, R.J.** 2002. Ubiquitin-dependent mechanism regulates rapid turnover of AU-rich cytokine mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 1842-1846.
- Laroia, G. und Schneider, R.J.** 2002. Alternate exon insertion controls selective ubiquitination and degradation of different AUF1 protein isoforms. *Nucleic Acids Res* **30**(14): 3052-3058.
- Lee, J.W., Chu, J.J. und Ng, M.L.** 2006. Quantifying the specific binding between West Nile virus envelope domain III protein and the cellular receptor alphaVbeta3 integrin. *J Biol Chem* **281**(3): 1352-1360.
- Lee, N., Pimienta, G. und Steitz, J.A.** 2012. AUF1/hnRNP D is a novel protein partner of the EBER1 noncoding RNA of Epstein-Barr virus. *RNA* **18**(11): 2073-2082.
- Li, W., Li, Y., Kedersha, N., Anderson, P., Emara, M., Swiderek, K.M., Moreno, G.T. und Brinton, M.A.** 2002. Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *J Virol* **76**(23): 11989-12000.
- Li, X.F., Jiang, T., Yu, X.D., Deng, Y.Q., Zhao, H., Zhu, Q.Y., Qin, E.D. und Qin, C.F.** 2010. RNA elements within the 5' untranslated region of the West Nile virus genome are critical for RNA synthesis and virus replication. *J Gen Virol* **91**(Pt 5): 1218-1223.
- Liao, B., Hu, Y. und Brewer, G.** 2007. Competitive binding of AUF1 and TIAR to MYC mRNA controls its translation. *Nat Struct Mol Biol* **14**(6): 511-518.
- Liao, H.J., Kobayashi, R. und Mathews, M.B.** 1998. Activities of adenovirus virus-associated RNAs: purification and characterization of RNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8514-8519.
- Lindenbach, B.D., Thiel, H.J. und Rice, C.M.** 2007. Flaviviridae: The viruses and their replication. in *Fields Virology, 5th Edition* (ed. D.M. Knipe and P.M. Howley). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Liu, Q. und Dreyfuss, G.** 1995. In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* **15**(5): 2800-2808.
- Liu, W.J., Sedlak, P.L., Kondratieva, N. und Khromykh, A.A.** 2002. Complementation analysis of the flavivirus Kunjin NS3 and NS5 proteins defines the minimal regions essential for formation of a replication complex and shows a requirement of NS3 in cis for virus assembly. *J Virol* **76**(21): 10766-10775.

- Lo, M.K., Tilgner, M., Bernard, K.A. und Shi, P.Y.** 2003. Functional analysis of mosquito-borne flavivirus conserved sequence elements within 3' untranslated region of West Nile virus by use of a reporting replicon that differentiates between viral translation and RNA replication. *J Virol* **77**(18): 10004-10014.
- Lodeiro, M.F., Filomatori, C.V. und Gamarnik, A.V.** 2009. Structural and functional studies of the promoter element for dengue virus RNA replication. *J Virol* **83**(2): 993-1008.
- Loflin, P., Chen, C.Y. und Shyu, A.B.** 1999. Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev* **13**(14): 1884-1897.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. und Bartenschlager, R.** 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**(5424): 110-113.
- Lott, W.B. und Doran, M.R.** 2013. Do RNA viruses require genome cyclisation for replication? *Trends Biochem Sci* **38**(7): 350-355.
- Lu, J.Y., Sadri, N. und Schneider, R.J.** 2006. Endotoxic shock in AUF1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs. *Genes Dev* **20**(22): 3174-3184.
- Lund, N., Milev, M.P., Wong, R., Sanmuganatham, T., Woolaway, K., Chabot, B., Abou Elela, S., Moulard, A.J. und Cochrane, A.** 2012. Differential effects of hnRNP D/AUF1 isoforms on HIV-1 gene expression. *Nucleic Acids Res* **40**(8): 3663-3675.
- Mackenzie, J.M., Jones, M.K. und Westaway, E.G.** 1999. Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. *J Virol* **73**(11): 9555-9567.
- Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A. und Parton, R.G.** 2007. Cholesterol manipulation by West Nile virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host Microbe* **2**(4): 229-239.
- Malet, H., Egloff, M.P., Selisko, B., Butcher, R.E., Wright, P.J., Roberts, M., Gruez, A., Sulzenbacher, G., Vonrhein, C., Bricogne, G. et al.** 2007. Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5. *J Biol Chem* **282**(14): 10678-10689.
- Mandel, M. und Higa, A.** 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**(1): 159-162.
- Mazan-Mamczarz, K., Lal, A., Martindale, J.L., Kawai, T. und Gorospe, M.** 2006. Translational repression by RNA-binding protein TIAR. *Mol Cell Biol* **26**(7): 2716-2727.
- Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Buhler, S. und Bartenschlager, R.** 2007. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem* **282**(12): 8873-8882.
- Miller, S. und Krijnse-Locker, J.** 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* **6**(5): 363-374.
- Mortimer, S.A. und Weeks, K.M.** 2009. Time-resolved RNA SHAPE chemistry: quantitative RNA structure analysis in one-second snapshots and at single-nucleotide resolution. *Nat Protoc* **4**(10): 1413-1421.
- Mukhopadhyay, S., Kim, B.S., Chipman, P.R., Rossmann, M.G. und Kuhn, R.J.** 2003. Structure of West Nile virus. *Science* **302**(5643): 248.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J. und Rossmann, M.G.** 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* **3**(1): 13-22.
- Munroe, S.H. und Dong, X.F.** 1992. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 catalyzes RNA-RNA annealing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(3): 895-899.
- Nomaguchi, M., Teramoto, T., Yu, L., Markoff, L. und Padmanabhan, R.** 2004. Requirements for West Nile virus (-) and (+)-strand subgenomic RNA synthesis in vitro by the viral RNA-dependent RNA polymerase expressed in Escherichia coli. *J Biol Chem* **279**(13): 12141-12151.
- Olsen, J.V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M.L., Jensen, L.J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T.S., Nigg, E.A. et al.** 2010. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal* **3**(104): ra3.
- Olsthoorn, R.C. und Bol, J.F.** 2001. Sequence comparison and secondary structure analysis of the 3' noncoding region of flavivirus genomes reveals multiple pseudoknots. *RNA* **7**(10): 1370-1377.

- Olsthoorn, R.C., Mertens, S., Brederode, F.T. und Bol, J.F.** 1999. A conformational switch at the 3' end of a plant virus RNA regulates viral replication. *EMBO J* **18**(17): 4856-4864.
- Ong, S.E., Mittler, G. und Mann, M.** 2004. Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy methyl SILAC. *Nat Methods* **1**(2): 119-126.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Rucknagel, K.P., Schierhorn, A., Moritz, B., Huttelmaier, S., Flach, N., Handoko, L. und Wahle, E.** 2006. Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src. *J Biol Chem* **281**(16): 11115-11125.
- Paek, K.Y., Kim, C.S., Park, S.M., Kim, J.H. und Jang, S.K.** 2008. RNA-binding protein hnRNP D modulates internal ribosome entry site-dependent translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* **82**(24): 12082-12093.
- Paranjape, S.M. und Harris, E.** 2007. Y box-binding protein-1 binds to the dengue virus 3'-untranslated region and mediates antiviral effects. *J Biol Chem* **282**(42): 30497-30508.
- Patkar, C.G. und Kuhn, R.J.** 2008. Yellow Fever virus NS3 plays an essential role in virus assembly independent of its known enzymatic functions. *J Virol* **82**(7): 3342-3352.
- Pawlak, M.R., Banik-Maiti, S., Pietenpol, J.A. und Ruley, H.E.** 2002. Protein arginine methyltransferase I: substrate specificity and role in hnRNP assembly. *J Cell Biochem* **87**(4): 394-407.
- Perez-Iratxeta, C. und Andrade-Navarro, M.A.** 2008. K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Struct Biol* **8**: 25.
- Petersen, L.R. und Fischer, M.** 2012. Unpredictable and difficult to control--the adolescence of West Nile virus. *N Engl J Med* **367**(14): 1281-1284.
- Pijlman, G.P., Funk, A., Kondratieva, N., Leung, J., Torres, S., van der Aa, L., Liu, W.J., Palmenberg, A.C., Shi, P.Y., Hall, R.A. et al.** 2008. A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe* **4**(6): 579-591.
- Pinol-Roma, S., Choi, Y.D., Matunis, M.J. und Dreyfuss, G.** 1988. Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes Dev* **2**(2): 215-227.
- Pogany, J., Fabian, M.R., White, K.A. und Nagy, P.D.** 2003. A replication silencer element in a plus-strand RNA virus. *EMBO J* **22**(20): 5602-5611.
- Polacek, C., Foley, J.E. und Harris, E.** 2009a. Conformational changes in the solution structure of the dengue virus 5' end in the presence and absence of the 3' untranslated region. *J Virol* **83**(2): 1161-1166.
- Polacek, C., Friebe, P. und Harris, E.** 2009b. Poly(A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *J Gen Virol* **90**(Pt 3): 687-692.
- Pong, W.L., Huang, Z.S., Teoh, P.G., Wang, C.C. und Wu, H.N.** 2011. RNA binding property and RNA chaperone activity of dengue virus core protein and other viral RNA-interacting proteins. *FEBS Lett* **585**(16): 2575-2581.
- Pontius, B.W. und Berg, P.** 1990. Renaturation of complementary DNA strands mediated by purified mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 protein: implications for a mechanism for rapid molecular assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(21): 8403-8407.
- Proutski, V., Gould, E.A. und Holmes, E.C.** 1997. Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: similarities and differences. *Nucleic Acids Res* **25**(6): 1194-1202.
- Pryor, M.J., Rawlinson, S.M., Butcher, R.E., Barton, C.L., Waterhouse, T.A., Vasudevan, S.G., Bardin, P.G., Wright, P.J., Jans, D.A. und Davidson, A.D.** 2007. Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin alpha/beta-recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection. *Traffic* **8**(7): 795-807.
- Qing, M., Yang, F., Zhang, B., Zou, G., Robida, J.M., Yuan, Z., Tang, H. und Shi, P.Y.** 2009. Cyclosporine inhibits flavivirus replication through blocking the interaction between host cyclophilins and viral NS5 protein. *Antimicrob Agents Chemother* **53**(8): 3226-3235.

- Raineri, I., Wegmueller, D., Gross, B., Certa, U. und Moroni, C. 2004. Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucleic Acids Res* **32**(4): 1279-1288.
- Rajkowsitch, L., Chen, D., Stampfl, S., Semrad, K., Waldsich, C., Mayer, O., Jantsch, M.F., Konrat, R., Blasi, U. und Schroeder, R. 2007. RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases. *RNA Biol* **4**(3): 118-130.
- Ray, D., Shah, A., Tilgner, M., Guo, Y., Zhao, Y., Dong, H., Deas, T.S., Zhou, Y., Li, H. und Shi, P.Y. 2006. West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5. *J Virol* **80**(17): 8362-8370.
- Ray, U. und Das, S. 2011. Interplay between NS3 protease and human La protein regulates translation-replication switch of Hepatitis C virus. *Sci Rep* **1**: 1.
- Reed, W. und Agramonte, A. 1983. Landmark article. Feb 16, 1901: The etiology of yellow fever. An additional note. By Walter Reed, Jas. Carroll and Aristides Agramonte. *JAMA* **250**(5): 649-658.
- Roosendaal, J., Westaway, E.G., Khromykh, A. und Mackenzie, J.M. 2006. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *J Virol* **80**(9): 4623-4632.
- Ross, J. 1995. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* **59**(3): 423-450.
- Rozovics, J.M., Chase, A.J., Cathcart, A.L., Chou, W., Gershon, P.D., Palusa, S., Wilusz, J. und Semler, B.L. 2012. Picornavirus modification of a host mRNA decay protein. *MBio* **3**(6): e00431-00412.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*.
- Sarkar, B., Lu, J.Y. und Schneider, R.J. 2003a. Nuclear import and export functions in the different isoforms of the AUF1/heterogeneous nuclear ribonucleoprotein protein family. *J Biol Chem* **278**(23): 20700-20707.
- Sarkar, B., Xi, Q., He, C. und Schneider, R.J. 2003b. Selective degradation of AU-rich mRNAs promoted by the p37 AUF1 protein isoform. *Mol Cell Biol* **23**(18): 6685-6693.
- Schwartz, M., Chen, J., Janda, M., Sullivan, M., den Boon, J. und Ahlquist, P. 2002. A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol Cell* **9**(3): 505-514.
- Sela-Brown, A., Silver, J., Brewer, G. und Naveh-Many, T. 2000. Identification of AUF1 as a parathyroid hormone mRNA 3'-untranslated region-binding protein that determines parathyroid hormone mRNA stability. *J Biol Chem* **275**(10): 7424-7429.
- Semrad, K. 2011. Proteins with RNA chaperone activity: a world of diverse proteins with a common task-impediment of RNA misfolding. *Biochem Res Int* **2011**: 532908.
- Sessions, O.M., Barrows, N.J., Souza-Neto, J.A., Robinson, T.J., Hershey, C.L., Rodgers, M.A., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., Yang, P.L., Pearson, J.L. et al. 2009. Discovery of insect and human dengue virus host factors. *Nature* **458**(7241): 1047-1050.
- Shi, P.Y., Brinton, M.A., Veal, J.M., Zhong, Y.Y. und Wilson, W.D. 1996. Evidence for the existence of a pseudoknot structure at the 3' terminus of the flavivirus genomic RNA. *Biochemistry* **35**(13): 4222-4230.
- Shi, P.Y., Tilgner, M. und Lo, M.K. 2002. Construction and characterization of subgenomic replicons of New York strain of West Nile virus. *Virology* **296**(2): 219-233.
- Smithburn, K.C., Haddow, A.J. und Mahaffy, A.F. 1946. A neurotropic virus isolated from Aedes mosquitoes caught in the Semliki forest. *Am J Trop Med Hyg* **26**: 189-208.
- Stadler, K., Allison, S.L., Schalich, J. und Heinz, F.X. 1997. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* **71**(11): 8475-8481.
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J. und Holle, A. 2003. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* **376**(7): 952-965.
- Ta, M. und Vratsi, S. 2000. Mov34 protein from mouse brain interacts with the 3' noncoding region of Japanese encephalitis virus. *J Virol* **74**(11): 5108-5115.

- Tang, J., Frankel, A., Cook, R.J., Kim, S., Paik, W.K., Williams, K.R., Clarke, S. und Herschman, H.R.** 2000. PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells. *J Biol Chem* **275**(11): 7723-7730.
- Tilgner, M., Deas, T.S. und Shi, P.Y.** 2005. The flavivirus-conserved penta-nucleotide in the 3' stem-loop of the West Nile virus genome requires a specific sequence and structure for RNA synthesis, but not for viral translation. *Virology* **331**(2): 375-386.
- Tilgner, M. und Shi, P.Y.** 2004. Structure and function of the 3' terminal six nucleotides of the west Nile virus genome in viral replication. *J Virol* **78**(15): 8159-8171.
- Tolnay, M., Baranyi, L. und Tsokos, G.C.** 2000. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 contains transactivator and DNA-binding domains. *Biochem J* **348 Pt 1**: 151-158.
- Tolnay, M., Juang, Y.T. und Tsokos, G.C.** 2002. Protein kinase A enhances, whereas glycogen synthase kinase-3 beta inhibits, the activity of the exon 2-encoded transactivator domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D in a hierarchical fashion. *Biochem J* **363**(Pt 1): 127-136.
- Tolnay, M., Lambris, J.D. und Tsokos, G.C.** 1997. Transcriptional regulation of the complement receptor 2 gene: role of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein. *J Immunol* **159**(11): 5492-5501.
- Tolnay, M., Vereshchagina, L.A. und Tsokos, G.C.** 1999. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0B is a sequence-specific DNA-binding protein. *Biochem J* **338 (Pt 2)**: 417-425.
- Tompa, P. und Csermely, P.** 2004. The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J* **18**(11): 1169-1175.
- Uchil, P.D., Kumar, A.V. und Satchidanandam, V.** 2006. Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. *J Virol* **80**(11): 5451-5464.
- Vashist, S., Anantpadma, M., Sharma, H. und Vрати, S.** 2009. La protein binds the predicted loop structures in the 3' non-coding region of Japanese encephalitis virus genome: role in virus replication. *J Gen Virol* **90**(Pt 6): 1343-1352.
- Vashist, S., Bhullar, D. und Vрати, S.** 2011. La protein can simultaneously bind to both 3'- and 5'-noncoding regions of Japanese encephalitis virus genome. *DNA Cell Biol* **30**(6): 339-346.
- Villordo, S.M., Alvarez, D.E. und Gamarnik, A.V.** 2010. A balance between circular and linear forms of the dengue virus genome is crucial for viral replication. *Rna* **16**(12): 2325-2335.
- von Roretz, C., Di Marco, S., Mazroui, R. und Gallouzi, I.E.** 2011. Turnover of AU-rich-containing mRNAs during stress: a matter of survival. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**(3): 336-347.
- Wagner, B.J., DeMaria, C.T., Sun, Y., Wilson, G.M. und Brewer, G.** 1998. Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics* **48**(2): 195-202.
- Warrener, P., Tamura, J.K. und Collett, M.S.** 1993. RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria. *J Virol* **67**(2): 989-996.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J. und Bartenschlager, R.** 2009. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* **5**(4): 365-375.
- Wengler, G.** 1991. The carboxy-terminal part of the NS 3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. *Virology* **184**(2): 707-715.
- Wengler, G. und Gross, H.J.** 1978. Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. *Virology* **89**(2): 423-437.
- Westaway, E.G., Mackenzie, J.M., Kenney, M.T., Jones, M.K. und Khromykh, A.A.** 1997. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J Virol* **71**(9): 6650-6661.
- Wilson, G.M., Lu, J., Sutphen, K., Suarez, Y., Sinha, S., Brewer, B., Villanueva-Feliciano, E.C., Ysla, R.M., Charles, S. und Brewer, G.** 2003a. Phosphorylation of p40AUF1 regulates binding to A

- + U-rich mRNA-destabilizing elements and protein-induced changes in ribonucleoprotein structure. *J Biol Chem* **278**(35): 33039-33048.
- Wilson, G.M., Lu, J., Sutphen, K., Sun, Y., Huynh, Y. und Brewer, G.** 2003b. Regulation of A + U-rich element-directed mRNA turnover involving reversible phosphorylation of AUF1. *J Biol Chem* **278**(35): 33029-33038.
- Wilson, G.M., Sun, Y., Lu, H. und Brewer, G.** 1999. Assembly of AUF1 oligomers on U-rich RNA targets by sequential dimer association. *J Biol Chem* **274**(47): 33374-33381.
- Wilson, G.M., Sutphen, K., Moutafis, M., Sinha, S. und Brewer, G.** 2001. Structural remodeling of an A + U-rich RNA element by cation or AUF1 binding. *J Biol Chem* **276**(42): 38400-38409.
- Wilusz, C.J., Wormington, M. und Peltz, S.W.** 2001. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(4): 237-246.
- Wong, J., Si, X., Angeles, A., Zhang, J., Shi, J., Fung, G., Jagdeo, J., Wang, T., Zhong, Z., Jan, E. et al.** 2013. Cytoplasmic redistribution and cleavage of AUF1 during coxsackievirus infection enhance the stability of its viral genome. *FASEB J*.
- Xu, N., Chen, C.Y. und Shyu, A.B.** 2001. Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Mol Cell Biol* **21**(20): 6960-6971.
- Yamagata, K., Daitoku, H., Takahashi, Y., Namiki, K., Hisatake, K., Kako, K., Mukai, H., Kasuya, Y. und Fukamizu, A.** 2008. Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Mol Cell* **32**(2): 221-231.
- Yap, T.L., Xu, T., Chen, Y.L., Malet, H., Egloff, M.P., Canard, B., Vasudevan, S.G. und Lescar, J.** 2007. Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. *J Virol* **81**(9): 4753-4765.
- Yi, Z., Sperzel, L., Nurnberger, C., Bredenbeek, P.J., Lubick, K.J., Best, S.M., Stoyanov, C.T., Law, L.M., Yuan, Z., Rice, C.M. et al.** 2011. Identification and characterization of the host protein DNAJC14 as a broadly active flavivirus replication modulator. *PLoS Pathog* **7**(1): e1001255.
- Yi, Z., Yuan, Z., Rice, C.M. und MacDonald, M.R.** 2012. Flavivirus replication complex assembly revealed by DNAJC14 functional mapping. *J Virol* **86**(21): 11815-11832.
- Yocupicio-Monroy, M., Padmanabhan, R., Medina, F. und del Angel, R.M.** 2007. Mosquito La protein binds to the 3' untranslated region of the positive and negative polarity dengue virus RNAs and relocates to the cytoplasm of infected cells. *Virology* **357**(1): 29-40.
- You, S., Falgout, B., Markoff, L. und Padmanabhan, R.** 2001. In vitro RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5'- and 3'-terminal regions that influence RNA structure. *J Biol Chem* **276**(19): 15581-15591.
- You, S. und Padmanabhan, R.** 1999. A novel in vitro replication system for Dengue virus. Initiation of RNA synthesis at the 3'-end of exogenous viral RNA templates requires 5'- and 3'-terminal complementary sequence motifs of the viral RNA. *J Biol Chem* **274**(47): 33714-33722.
- Yu, H., Isken, O., Grassmann, C.W. und Behrens, S.E.** 2000. A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J Virol* **74**(13): 5825-5835.
- Yu, L. und Markoff, L.** 2005. The topology of bulges in the long stem of the flavivirus 3' stem-loop is a major determinant of RNA replication competence. *J Virol* **79**(4): 2309-2324.
- Zhang, B., Dong, H., Stein, D.A., Iversen, P.L. und 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.
- Zhang, G., Zhang, J., George, A.T., Baumstark, T. und Simon, A.E.** 2006. Conformational changes involved in initiation of minus-strand synthesis of a virus-associated RNA. *RNA* **12**(1): 147-162.
- Zhang, G., Zhang, J. und Simon, A.E.** 2004. Repression and derepression of minus-strand synthesis in a plus-strand RNA virus replicon. *J Virol* **78**(14): 7619-7633.
- Zucconi, B.E., Ballin, J.D., Brewer, B.Y., Ross, C.R., Huang, J., Toth, E.A. und Wilson, G.M.** 2010. Alternatively expressed domains of AU-rich element RNA-binding protein 1 (AUF1) regulate

- RNA-binding affinity, RNA-induced protein oligomerization, and the local conformation of bound RNA ligands. *J Biol Chem* **285**(50): 39127-39139.
- Zuker, M.** 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3406-3415.
- Zuniga, S., Sola, I., Cruz, J.L. und Enjuanes, L.** 2009. Role of RNA chaperones in virus replication. *Virus Res* **139**(2): 253-266.

VII. ANHANG

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Primer

Name/ Orientierung ←/→	5'→ 3'-Sequenz ^{a)}	Beschreibung
	Primer für die SUMO-Expressionsplasmide	
NS5polWestFor	→ ATGGTCTCATGGTGGTGGGGCAAAGGACGCACC	<i>Bsal</i> -Schnittstelle, <i>forward</i> Primer zur Amplifikation von NS5
NS5polWestRev	← ACGGATCCCTACAGTACTGTGTCCTCAACCAAAGTTG	<i>Bam</i> HI-Schnittstelle, <i>reverse</i> Primer zur Amplifikation von NS5
AUF1BsalFor	→ ATGGTCTCATGGTTCGGAGGAGCAGTTCGGCGG	<i>Bsal</i> -Schnittstelle, <i>forward</i> Primer zur Amplifikation von <i>HNRNPD</i>
AUF1BamHIRev	← ACGGATCCTTAGTATGGTTGTAGCTATTTTGATGACC	<i>Bam</i> HI-Schnittstelle, <i>reverse</i> Primer zur Amplifikation von <i>HNRNPD</i>
H1BsalFor	→ ATGGTCTCATGGTATGTTGGGCACGGAAGGTGG	<i>Bsal</i> -Schnittstelle, <i>forward</i> Primer zur Amplifikation von <i>HNRNPH1</i>
H1BamHIRev	← ACGGATCCCTATGCAATGTTTGATTGAAAATCACTGG	<i>Bam</i> HI-Schnittstelle, <i>reverse</i> Primer zur Amplifikation von <i>HNRNPH1</i>
PRMT1v1v2BsalFor	→ ATGGTCTCATGGTGCGGCAGCCGAGGCCGGAAC	<i>Bsal</i> -Schnittstelle, <i>forward</i> Primer zur Amplifikation von <i>PRMT1</i> <i>variant 1 und 2</i>
PRMT1v3BsalFor	→ ATGGTCTCATGGTGTAGGCGTGGCTGAGGTGTCC	<i>Bsal</i> -Schnittstelle, <i>forward</i> Primer zur Amplifikation von <i>PRMT1</i> <i>variant 3</i>
PRMT1v5BsalFor	→ ATGGTCTCATGGTGAGGTGTCCTGTGGCCAGG	<i>Bsal</i> -Schnittstelle, <i>forward</i> Primer zur Amplifikation von <i>PRMT1</i> <i>variant 5</i>
PRMT1_XhoI	← ATCTCGAGTCAGCGCATCCGGTAGTCGGTGGAG	<i>Xho</i> I-Schnittstelle, <i>reverse</i> Primer zur Amplifikation von <i>PRMT1</i>
PRMT1RBSFor	→ GAAGGAGATATACATATGGCGGCAGCCGAGGCCGGAAC	<i>forward</i> Primer zur Amplifikation von <i>PRMT1</i> inkl. einer RBS
PRMT1RBSRev	← TCAGCGCATCCGGTAGTCGGTGGAG	<i>reverse</i> Primer zur Amplifikation von <i>PRMT1</i>
pETSUMORBSFor	→ GAAGGAGATATACATATGGGCAGC	<i>forward</i> Primer zur Amplifikation von SFri4

pETSUMORBSRev	←	TTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGGAATTG	reverse Primer zur Amplifikation von SFri4
		Primer für die FLAG-AUF1-Expressionsplasmide	
hnRNP_HindIII	→	ATAAGCTTGCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAG GCCCGGGCGGATTTCGGAGGAGCAGTTCGGCGGGGACG	HindIII-Schnittstelle, forward Primer zur Amplifikation von HNRNPD, FLAG-tag, Linkersequenz
hnRNP_XhoI	←	ATCTCGAGTTAGTATGGTTTGTAGCTATTTGATGACC	XhoI-Schnittstelle, reverse Primer zur Amplifikation von HNRNPD
		Primer für die Klonierung der WNV-cDNAs	
5'UTRWestFor	→	ATAAGCTTtaatacgactcactataggAGTAGTTCGCTGTGTGA GCTGA	HindIII-Schnittstelle, forward Primer zur Amplifikation der 5'UTR, T7 Promoter
5'UTRWestRev	←	ATCCCGGCATTCCGCGTTTTAGCATATTGACAGCC	SmaI-Schnittstelle, reverse Primer zur Amplifikation der 5'UTR
3'UTRWestFor	→	ATAAGCTTtaatacgactcactataggTAGATATTTAATCAATTG TAAATAG	HindIII-Schnittstelle, forward Primer zur Amplifikation der 3'UTR, T7 Promoter
3'UTRWestRev	←	ATTCTAGAACGTAGATCCTGTGTTCTCGCACCA	XbaI-Schnittstelle, reverse Primer zur Amplifikation der 3'UTR
3UTRnativRev	←	AGATCCTGTGTTCTCGACCACCAGCC	Primer zur Amplifizierung der sgRNA
3UTR104Rev	←	CTCAAATTTTCTTAECTATTTACAC	reverse Primer zur Amplifikation der AU-reichen Region
3UTRCSFor	→	ATAAGCTTtaatacgactcactataggAAACAGCATATTGACACCT GG	HindIII-Schnittstelle, forward Primer zur Amplifikation der terminalen 111 Nt der 3'UTR, T7 Promoter
		Primer zur Fusion des Ribozyms an die 3'UTR der WNV-RNA	
HDVr_Rev1	←	GTAGCCAGGTCCGACCGAGGAGGTGGAGATGCCATGCC GACCCAGATCCTGTGTTCTCGCACCA	Fusion des Hepatitis Delta Virus Ribozym an die 3'UTR der West-Nil-RNA
HDVr_Rev2	←	GCTCTAGACTTCTCCCTTAGCCTACCGAAGTAGCCAGGTCG GACCGCGAGGAG	XbaI-Schnittstelle, Fusion des Hepatitis Delta Virus Ribozym an die 3'UTR der West-Nil-RNA
		Primer zur Einführung des Rluc-Gens in pWNVRepHDVr	
RlucAflIIIFor	→	TACTCTTAAGATGACTTCGAAAGTTTATGATCC	AflIII-Schnittstelle, forward Primer zur Amplifikation des Gens der Renilla

			Luciferase
RlucFMDV2aRev	←	GTCTCCGCAAGTTTAAGAAGGTCAAATTCAACAGCTGTTG TTCATTTTTGAGAACTCGCTC	<i>reverse</i> Primer zur Amplifikation des Gens der Renilla Luciferase, Fusion einer FMDV 2A Autoprotease
FMDV2aAflIIIRev	←	TACTCTTAAGGGGCCAGGGTTGGACTCGACGTCTCCGC AAGTTTAAGAAGGTCA	<i>reverse</i> Primer zur Amplifikation der FMDV 2A Autoprotease Sequenz
Primer für real-time-PCR			
qRT-NS5For	→	AGAGTTCGGAAAGCCAAG	<i>forward</i> Primer, bindet ca. an Position 1400 des NS5-Gens
qRT-NS5Rev	←	CAGAGCCTCGAACTCCAGAA	<i>reverse</i> Primer, bindet ca. an Position 1480 des NS5-Gens
qRTDengueFor	→	CGGCAGTACCATCACATTGG	<i>forward</i> Primer, bindet ca. an Position 2340 des NS5-Gens von Dengue-Virus
qRTDengueRev	←	GGGTTTTCTTGAATCCACACC	<i>reverse</i> Primer, bindet ca. an Position 2420 des NS5-Gens von Dengue Virus
GAPDHfw	→	AGCCTCAAGATCATCAGCAATGC	<i>forward</i> Primer, bindet ca. an Position 430 von GAPDH
GAPDHrv	←	ATGGCATGGACTGTGGTCATG	<i>reverse</i> Primer, bindet ca. an Position 520 von GAPDH
Primer für Reverse Transkription			
qRT-3'UTR_Rev	←	CGCAGACTGCACTCTCCG	<i>reverse</i> Primer, bindet ca. an Position 320 der 3'UTR
3UTRDengueRev	←	TGTTGCTGCGATTTGTAAGGGAG	<i>reverse</i> Primer, bindet ca. an Position 240 der 3'UTR von Dengue-Virus
OligodT	←	TTTTTTTTTTTTTTTTTT	<i>reverse</i> Primer, zur Synthese von cDNA aus poly(A)-mRNA
Sequenzierprimer			
5'UTR_Seq	→	CTCCTGCATTAGGAAGCAGCC	<i>forward</i> Primer, bindet ca. 50 bp upstream der BamHI-Schnittstelle von pWNVHDVr
3'UTR_Seq_Rev	←	CAAATAGGGTTCCGCGCAC	<i>reverse</i> Primer, bindet ca. 100 bp downstream der XbaI-Schnittstelle von pWNVHDVr

		Mutageneseprimer	
NS5PolQuikFor	→	GCTGTCAGTGGAGATGCCTGTGTGGTAAAGCCC	<i>forward</i> Primer, führt Mutationen in NS5 ein (D ₆₆₉ A im Protein)
NS5PolQuikRev	←	GGGCTTTACCACACAGGCATCTCCACTGACAGC	<i>reverse</i> Primer, führt Mutationen in NS5 ein (D ₆₆₉ A im Protein)
SLA_MutLI_For	→	AGCTGACAAACTGATGATTGTTTGTGAGGA	<i>forward</i> Primer, Mutagenese des Stemloop A in der 5'UTR
SLA_MutLI_Rev	←	TCCTCACAACAATCATCAGTTTGTGAGCT	<i>reverse</i> Primer, Mutagenese des Stemloop A in der 5'UTR
5'CS_Mut_1_For	→	CAAGAGCCGGGCTGCACATATGCTAAAACGCGG	<i>forward</i> Primer, Mutagenese der CS-Sequenz in der 5'UTR
5'CS_Mut_1_Rev	←	CCGCGTTTTAGCATATGTGCAGCCCGGCTCTTG	<i>reverse</i> Primer, Mutagenese der CS-Sequenz in der 5'UTR
5'CS_Mut_2_For	→	CAAGAGCCGGGCTGCACAGCTCCTAAAACGCGGAATGC	<i>forward</i> Primer, Mutagenese der CS-Sequenz in der 5'UTR
5'CS_Mut_2_Rev	←	GCATTCCGCGTTTTAGGAGCTGTGCAGCCCGGCTCTTG	<i>reverse</i> Primer, Mutagenese der CS-Sequenz in der 5'UTR
3'CS_Komp_1_For	→	CCACAACAAAACAGGAGTTTGACACCTGGGATAG	<i>forward</i> Primer, Komplementations-Mutagenese der CS-Sequenz in der 3'UTR
3'CS_Komp_1_Rev	←	CTATCCCAGGTGTCAAACCTCTGTTTTGTTGTGG	<i>reverse</i> Primer, Komplementations-Mutagenese der CS-Sequenz in der 3'UTR
3'CS_Komp_For	→	CCACAACAAAACAGGAGTTGTGCACCTGGGATAG	<i>forward</i> Primer, Komplementations-Mutagenese der CS-Sequenz in der 3'UTR
3'CS_Komp_Rev	←	CTATCCCAGGTGCACAACCTCTGTTTTGTTGTGG	<i>reverse</i> Primer, Komplementations-Mutagenese der CS-Sequenz in der 3'UTR
3UTRUARMutFor_1	→	GATAGACTAGGAGAAATTCTGCTCTGCACAAC	<i>forward</i> Primer, Mutagenese der UAR-Sequenz in der 3'UTR
3UTRUARMutRev_1	←	GTTGTGCAGAGCAGAAATTCTCCTAGTCTATC	<i>reverse</i> Primer, Mutagenese der UAR-Sequenz in der 3'UTR
3UTRUARMutFw	→	GACTAGGAGAAAATCTACTCTGCACAACCAGC	<i>forward</i> Primer, Mutagenese der UAR-Sequenz in der 3'UTR
3UTRUARMutRv	←	GCTGGTTGTGCAGAGTAGATTTCTCCTAGTC	<i>reverse</i> Primer, Mutagenese der UAR-Sequenz in der 3'UTR

5UTRUARcompFor	→	GCTGTTTCTTAGTACGATTTTCTCGATGTCTA	<i>forward</i> Primer, Komplementations-Mutagenese der UAR-Sequenz in der 5'UTR
5UTRUARcompRev	←	TAGACATCGAGAAAATCGTACTAAGAAACAGC	<i>reverse</i> Primer, Komplementations-Mutagenese der UAR-Sequenz in der 5'UTR
5UTRDAR1MutFor	→	GAAGATCTCGATGAAAAGAAACCAGGAG	<i>forward</i> Primer, Mutagenese der DAR1-Sequenz in der 5'UTR
5UTRDAR1MutRev	←	C TCCTGGTTTCTTTTCATCGAGATCTTC	<i>reverse</i> Primer, Mutagenese der DAR1-Sequenz in der 5'UTR
3UTRDAR1compFor	→	GACACCTGGGATTTTCTAGGAGATCTTC	<i>forward</i> Primer, Komplementations-Mutagenese der DAR1-Sequenz in der 3'UTR
3UTRDAR1compRev	←	GAAGATCTCCTAGAAAATCCCAGGTGTC	<i>reverse</i> Primer, Komplementations-Mutagenese der DAR1-Sequenz in der 3'UTR
3UTRDARMutFor	→	ACAGCATATTGACAGAAGAGATAGACTAGGAGATC	<i>forward</i> Primer, Mutagenese der DAR2-Sequenz in der 3'UTR
3UTRDARMutRev	←	GATCTCCTAGTCTATCTCTTCTGTCAATATGCTGT	<i>reverse</i> Primer, Mutagenese der DAR2-Sequenz in der 3'UTR
5UTRDARcompFor	→	CGATGTCTAAGAAATCTTCAGGGCCCGGCAAG	<i>forward</i> Primer, Komplementations-Mutagenese der DAR2-Sequenz in der 5'UTR
5UTRDARcompRev	←	CTTGCCGGGCCCTGAAGATTTCTTAGACATCG	<i>reverse</i> Primer, Komplementations-Mutagenese der DAR2-Sequenz in der 5'UTR
S190E T193DFor	→	GTT GGT GGC CTT GAA CCA GAT GAT CCT GAA GAG AAA ATA AG	<i>forward</i> Primer, führt Mutationen in <i>HNRNPD</i> ein (S ₁₉₀ E, T ₁₉₃ D im Protein)
S190E T193DRev	←	CT TAT TTT CTC TTC AGG ATC ATC TGG TTC AAG GCC ACC AAC	<i>reverse</i> Primer, führt Mutationen in <i>HNRNPD</i> ein (S ₁₉₀ E, T ₁₉₃ D im Protein)

^{a)}Für die Klonierung relevante Schnittstellen, die neu eingeführt wurden, sind unterstrichen. Nicht unterstrichene Schnittstellen wurden nicht für die Klonierung verwendet. Vergrößert dargestellte Basen weisen auf eingeführte Mutationen hin. Ein eingeführter T7-Promoter ist **fett** dargestellt.

Plasmidkonstruktion

pETSUMO-Expressionskonstrukte

Das pETSUMO-Expressionssystem wurde zur Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* verwendet. pETSUMOadapt (Dr. Eva Bosse-Doenicke) ist ein Derivat des pETSUMO-Vektors (life technologies, Darmstadt) und enthält eine zusätzliche *multiple cloning site*.

pETSUMOadapt-NS5 WNV (SFri2): Die kodierende Sequenz für WNV NS5 wurde mit den Primern NS5polWestFor und NS5polWestRev durch PCR von pWNVRep amplifiziert und über die *BsaI*- und *BamHI*-Restriktionsschnittstellen in pETSUMOadapt ligiert.

pETSUMOAUF1p45 (SFri4): Die kodierende Sequenz für AUF1 Isoform p45 wurde von pcDNA5/TO-FLAG-AUF1p45 (siehe unten) durch PCR mit den Primern AUF1BsaIFor und AUF1BamHIRev amplifiziert und über die *BsaI*- und *BamHI*-Restriktionsschnittstellen in pETSUMOadapt ligiert.

pETSUMOPRMT1v1 (SFri48): Die cDNA, die für PRMT1 Isoform v1 kodiert, wurde durch RT-PCR von Gesamt-RNA aus Huh7-Zellen mit den Primern PRMT1v1v2BsaIFor und PRMT1XhoI generiert und über die *BsaI*- und *XhoI*-Restriktionsschnittstellen in pETSUMOadapt ligiert.

pETSUMOPRMT1v2 (SFri49): Die cDNA, die für PRMT1 Isoform v2 kodiert, wurde durch RT-PCR von Gesamt-RNA aus Huh7-Zellen mit den Primern PRMT1v1v2BsaIFor und PRMT1XhoI generiert und über die *BsaI*- und *XhoI*-Restriktionsschnittstellen in pETSUMOadapt ligiert.

pETSUMOPRMT1v3 (SFri50): Die cDNA, die für PRMT1 Isoform v3 kodiert, wurde durch RT-PCR von Gesamt-RNA aus Huh7-Zellen mit den Primern PRMT1v3BsaIFor und PRMT1XhoI generiert und über die *BsaI*- und *XhoI*-Restriktionsschnittstellen in pETSUMOadapt ligiert.

pETSUMOPRMT1v5 (SFri51): Die cDNA, die für PRMT1 Isoform v5 kodiert, wurde durch RT-PCR von Gesamt-RNA aus Huh7-Zellen mit den Primern PRMT1v5BsaIFor und PRMT1XhoI generiert und über die *BsaI*- und *XhoI*-Restriktionsschnittstellen in pETSUMOadapt ligiert.

pET-PRMT1v1-SUMO-AUF1p45 (SFri57): Die kodierende Sequenz für PRMT1v1 wurde von pETSUMOPRMT1v1 durch PCR mit den Primern PRMT1RBSFor (enthält eine Ribosomenbindestelle, RBS) und PRMT1RBSRev amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde über *blunt end*-Ligation in das PCR-amplifizierte (Primer pETSUMORBSFor and pETSUMORBSRev) Plasmid pETSUMOAUF1p45 *upstream* der RBS inseriert.

pETSUMOAUF1p45 S_{190E} T_{193D} (SFri68): Die Mutationen, die zum Austausch der Aminosäuren Serin zu Glutamat an Position 190 sowie Threonin zu Aspartat an Position 193 innerhalb der Aminosäuresequenz von AUF1p45 führen, wurden über *site-directed mutagenesis*-PCR mit den Primern S190E T193DFor und S190E T193DRev in das Plasmid pETSUMOAUF1p45 eingeführt.

Virale Replikon-RNAs kodierende Plasmide:

pWNV HDVr (SFri8): Zur Erhöhung der Replikationseffizienz wurde eine 67 bp Fragment, welches für das Hepatitis Delta Virus Ribozym (HDVr) kodiert, an das 3'Ende der cDNA des WNV in pWNVRep (Shi et. al. 2002) fusioniert. Das HDVr-Fragment wurde über eine PCR der 3'UTR mit den Primern 3UTRWestFor und HDVrRev1 und einer zweiten PCR mit den Primern

3UTRWestFor und HDVrRev2 eingeführt. Das finale PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *SacII* und *XbaI* in das Plasmid pWNVRep ligiert.

pWNV HDVr GDA Mutant (SFri9): Das *SpeI-SacII*-Fragment von pWNVRep, welches für einen Teil der WNV RNA kodiert wurde in pGEM® –T Easy kloniert. In diesem Subklon wurde eine Mutation, die zum Austausch der Aminosäure Aspartat zu Alanin an Position 669 des NS5 Proteins führt, über *site-directed mutagenesis*-PCR mit den Primern eingeführt. Das *SpeI-SacII*-Fragment mit der eingeführten Mutation wurde über die gleichen Schnittstellen in pWNVRep ligiert. Die Einführung einer für das Hepatitis Delta Virus Ribozym kodierenden Sequenz erfolgte wie für pWNV HDVr beschrieben.

pWNV Renilla luciferase FMDV2a HDVr (SFri11): Dieses Reporterplasmid ist ein Derivat von pWNV HDVr und kodiert zusätzlich für die Renilla Luziferase (Rluc). Das Gen, welches für die Rluc kodiert, wurde über PCR mit den Primern RlucAflIIFor und RlucFMDV2aRev amplifiziert. Es erfolgte eine zweite PCR mit den Primern RlucAflIIFor und FMDV2aAflIIRev. Damit wurde die kodierende Sequenz der FMDV2a Autoprotease an das 3'-Ende der kodierenden Sequenz der Rluc fusioniert und ermöglicht die Prozessierung des authentischen C-Terminus des Rluc-Proteins. Das finale PCR-Produkt wurde in die *AflII*-Schnittstelle von pWNV HDVr ligiert.

pWNV Rluc2a HDVr CSMut (SFri58): Das *BamHI-AflII*-Fragment von pWNV HDVr, welches für einen Teil der WNV RNA kodiert, wurde in pCR®4-TOPO® (life technologies, Darmstadt) kloniert. In diesem Subklon wurden Mutationen in der Zyklisierungssequenz CS der 5'UTR über *site-directed mutagenesis*-PCR mit den Primern 5'CS_Mut_2_For und 5'CS_Mut_2_Rev eingeführt. Das *BamHI-AflII*-Fragment mit den eingeführten Mutationen wurde über die gleichen Schnittstellen in pWNV Renilla luciferase FMDV2a HDVr ligiert. Diese Mutationen haben zur Folge, dass eine Basenpaarung zwischen der 5'CS- und der 3'CS-Sequenz inhibiert wird und das RNA-Replikon replikationsdefizient ist (Lo et. al. 2003).

pWNV Rluc2a HDVr SLAMutLI (SFri59): Diese Replikon cDNA enthält Mutationen in der kodierenden Sequenz des *stem-loop* A der 5'UTR, die einen replikationsdefizienten Phänotyp zur Folge haben (Dong et. al. 2008). Die Klonierung erfolgte wie für pWNV Rluc2a HDVr CSMut beschrieben. Die *site-directed mutagenesis*-PCR erfolgte mit den Primern SLA_MutLI_For und SLA_MutLI_Rev.

pWNV Rluc2a HDVr DAR1Mut (SFri60): Diese Replikon cDNA enthält Mutationen in der Zyklisierungssequenz DAR1 der 5'UTR. Die Klonierung erfolgte wie für pWNV Rluc2a HDVr CSMut beschrieben. Die *site-directed mutagenesis*-PCR erfolgte mit den Primern 5UTRDAR1MutFor und 5UTRDAR1MutRev.

pWNV Rluc2a HDVr DAR2Mut (SFri61): Diese Replikon cDNA enthält Mutationen in der Zyklisierungssequenz DAR2 der 3'UTR. Das *SacII-XbaI*-Fragment aus pWNV HDVr Subreplikon 2 DAR2Mut (siehe unten) wurde über die gleichen Schnittstellen in pWNV Renilla luciferase FMDV2a HDVr ligiert.

pWNV HDVr ΔAU (SFri62): In dieser Replikon cDNA ist die kodierende Sequenz der AU-reichen Region der 3'UTR deletiert. Es wurde eine *overlap*-PCR mit den Primern 3UTRdAUFor und 3UTRdAURev in einem Subklon (oben beschrieben für pWNV HDVr GDA Mutant) durchgeführt. Das *SpeI-SacII*-Fragment mit der deletierten Sequenz wurde über die gleichen Schnittstellen in pWNV HDVr ligiert.

pWNV Rluc2a HDVr ΔAU (SFri63): Die Klonierung erfolgte wie für pWNV HDVr ΔAU beschrieben, außer dass das finale Fragment in pWNV Renilla luciferase FMDV2a HDVr ligiert wurde.

Plasmide zur Generierung subgenomischer viraler RNAs

pUC18-5'UTR-West Nile Virus (SFri17): Die für die 5'UTR kodierende cDNA wurde von pWNVRep mittels PCR mit den Primern 5UTRWestFor und 5UTRWestRev amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *SmaI* in pUC18 ligiert.

pUC18-3'UTR-West Nile Virus (SFri18): Die für die 3'UTR kodierende cDNA wurde von pWNVRep mittels PCR mit den Primern 3UTRWestFor und 3UTRWestRev amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *XbaI* in pUC18 ligiert.

pWNV HDVr Subreplicon 2 (SFri23): Dieses Plasmid kodiert für eine subgenomische RNA des WNV (sgRNA). pWNVRep wurde mit *AflII* und *MfeI* geschnitten und anschließend mit Mung Bean Nuklease behandelt und religiert. Das resultierende Plasmid kodiert für die 5'-terminalen 184 Nt und die 3'-terminalen 611 Nt der genomischen RNA des WNV. Die Einführung der kodierenden Sequenz für das Hepatitis Delta Virus Ribozym (HDVr) erfolgte wie für pWNV HDVr beschrieben.

pWNV HDVr Subreplicon 2 CSMut2 (SFri26): Ausgehend von pWNV HDVr Subreplicon 2 wurden Mutationen in der Zyklisierungssequenz CS der 5'UTR über *site-directed mutagenesis*-PCR in zwei Schritten mit den Primerpaaren 5'CS Mut 1 For und 5'CS Mut 1 Rev sowie 5'CS Mut 2 For und 5'CS Mut 2 Rev eingeführt.

pWNV HDVr Subreplicon 2 3'CSMut2 (SFri27): Ausgehend von pWNV HDVr Subreplicon 2 CSMut2 wurden Mutationen in der Zyklisierungssequenz CS der 3'UTR über *site-directed mutagenesis*-PCR in zwei Schritten mit den Primerpaaren 3'CS Komp 1 For und 3'CS Komp 1 Rev sowie 3'CS Komp 2 For und 3'CS Komp 2 Rev eingeführt.

pWNV HDVr Subreplicon 2 SLA MutLI (SFri28): Ausgehend von pWNV HDVr Subreplicon 2 wurden Mutationen in der kodierenden Sequenz des *stem-loop* A der 5'UTR über *site-directed mutagenesis*-PCR mit den Primern SLA MutLI For und SLA MutLI Rev eingeführt.

pWNV HDVr Subreplicon 3 (SFri30): Dieses Plasmid kodiert für eine subgenomische RNA des WNV (sgRNAΔAU). pWNV HDVr Subreplicon 2 wurde mit *NsiI* und *SacII* geschnitten und anschließend mit Mung Bean Nuklease behandelt und religiert. Das resultierende Plasmid kodiert für die 5'-terminalen 184 Nt sowie für die Nukleotide 21-37 und 428 - 631 der 3'UTR der genomischen RNA des WNV.

pWNV HDVr Subreplicon 2 DAR2Mut (SFri31): Ausgehend von pWNV HDVr Subreplicon 2 wurden Mutationen in der Zyklisierungssequenz DAR2 der 3'UTR über *site-directed mutagenesis*-PCR mit den Primern 3UTRDARMutFor und 3UTRDARMutRev eingeführt.

pWNV HDVr Subreplicon 2 DAR2comp (SFri32): Ausgehend von pWNV HDVr Subreplicon 2 DAR2Mut wurden Mutationen in der Zyklisierungssequenz DAR2 der 5'UTR über *site-directed mutagenesis*-PCR mit den Primern 5UTRDARcompFor und 5UTRDARcompRev eingeführt.

pWNV HDVr Subreplicon 2 DAR1Mut (SFri33): Ausgehend von pWNV HDVr Subreplicon 2 wurden Mutationen in der Zyklisierungssequenz DAR1 der 5'UTR über *site-directed mutagenesis*-PCR mit den Primern 5UTRDAR1MutFor und 5UTRDAR1MutRev eingeführt.

pWNV HDVr Subreplicon 2 DAR1comp (SFri36): Ausgehend von pWNV HDVr Subreplicon 2 DAR1Mut wurden Mutationen in der Zyklisierungssequenz DAR1 der 3'UTR über *site-directed mutagenesis*-PCR mit den Primern 3UTRDAR1compFor und 3UTRDAR1compRev eingeführt.

pWNV HDVr Subreplicon 2 3UTRUARMut (SFri34): Ausgehend von pWNV HDVr Subreplicon 2 wurden Mutationen in der Zyklisierungssequenz UAR der 3'UTR über *site-directed mutagenesis*-PCR in zwei Schritten mit den Primerpaaren 3UTRUARMutFor 1 und 3UTRUARMutRev 1 sowie 3UTRUARMutFw und 3UTRUARMutRv eingeführt.

pWNV HDVr Subreplicon 2 5UTRUARcomp (SFri35): Ausgehend von pWNV HDVr Subreplicon 2 3UTRUARMut wurden Mutationen in der Zyklisierungssequenz UAR der 5'UTR über *site-directed mutagenesis*-PCR mit den Primern 5UTRUARcompFor und 5UTRUARcompRev eingeführt.

pWNV HDVr Subreplicon 2 AUcomplete (SFri67): Dieses Plasmid kodiert für eine subgenomische RNA des WNV (sgRNA^{mod}). Durch *site-directed mutagenesis*-PCR mit den Primern SubAUFor und SubAURev, Phosphorylierung und Religation wurde die kodierende Sequenz für die 3'UTR komplettiert. Das resultierende Plasmid kodiert für die 5'-terminalen 184 Nt sowie für die 3'-terminalen 631 Nt der 3'UTR der genomischen RNA des WNV.

pCDNA5/TO-Expressionskonstrukte

Die cDNAs, die für die AUF1-Isoformen p37, p40, p42 und p45 kodieren, wurden durch RT-PCR von Gesamt-RNA aus Huh7-Zellen mit den Primern hnRNPd HindIII und hnRNPd XhoI amplifiziert und über die *HindIII*- und *XhoI*-Restriktionsschnittstellen in pCDNA5/TO ligiert. Eine für einen FLAG-tag kodierende Sequenz wurde über den *forward* Primer eingefügt. Daraus ergaben sich die Plasmide **pCDNA5/TO-FLAG-AUF1p37 (SFri46)**, **pCDNA5/TO-FLAG-AUF1p40 (SFri45)**, **pCDNA5/TO-FLAG-AUF1p42 (SFri44)** und **pCDNA5/TO-FLAG-AUF1p45 (SFri43)**.

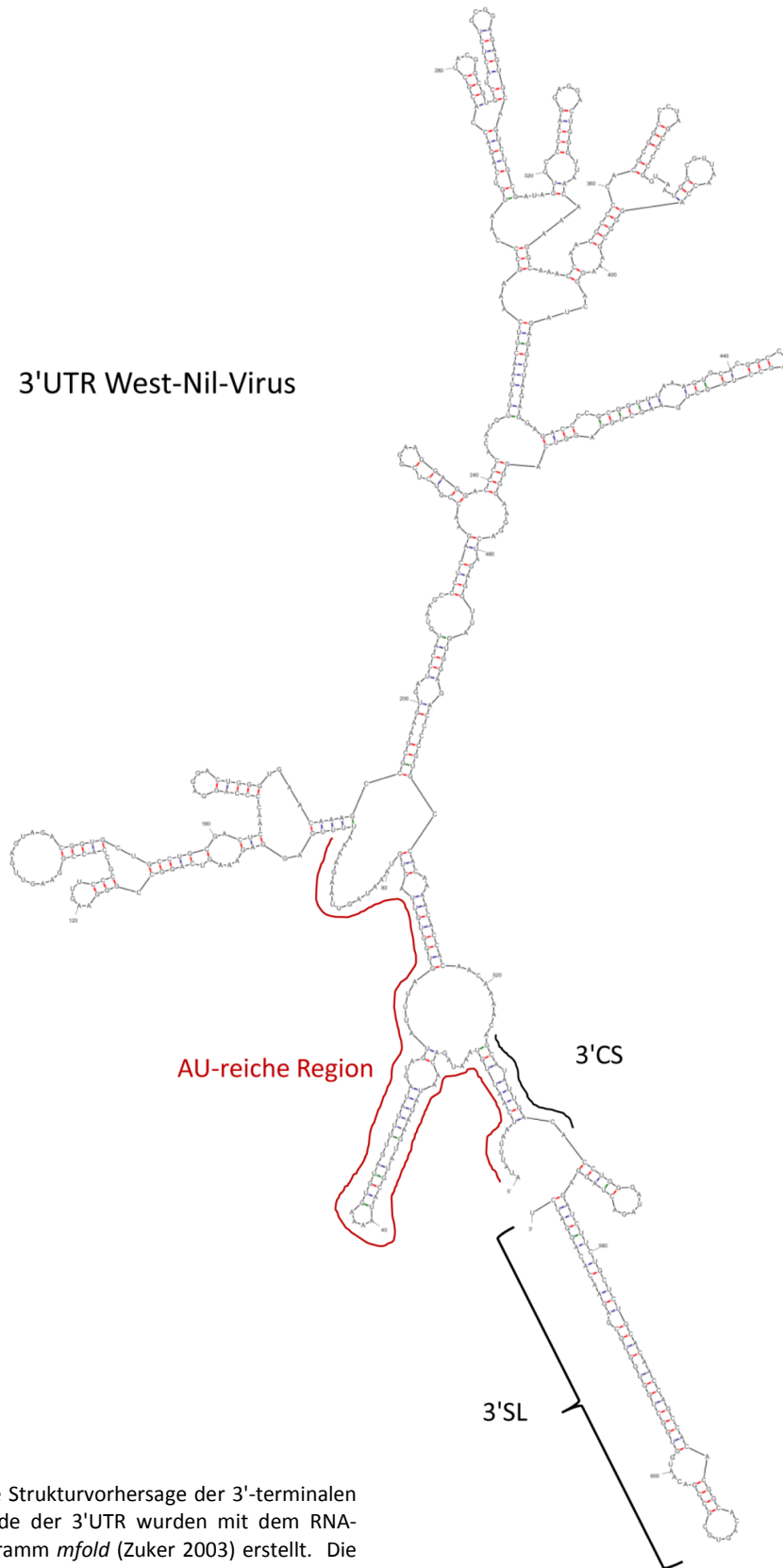


Abb. 46. Eine Strukturvorhersage der 3'-terminalen 631 Nukleotide der 3'UTR wurden mit dem RNA-Faltungsprogramm *mfold* (Zuker 2003) erstellt. Die AU-reiche Region am 5'-Ende der 3'UTR ist mit einer roten Linie gekennzeichnet. Die Zyklisierungssequenz 3'CS ist mit einer schwarzen Linie markiert. Der 3'-terminale *stem-loop* 3'SL ist mit einer Klammer versehen.

PUBLIKATIONSLISTE

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Große, C.[§], Friedrich, S.[§] und Nies, D.H. 2007. Contribution of extracytoplasmic function sigma factors to transition metal homeostasis in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**(3-4):227-40

[§]contributed equally to this paper

Friedrich, S., Sims, Y. und Baldwin, G.S. 2008. Preparation and properties of recombinant rat and human procholecystokinin(57-95). *Protein J* **27**(3):186-91

Friedrich, S., Schmidt, T., Geissler, R., Schierhorn, A., Lilie, H., Golbik, R.P. und Behrens, S.E. 2013. The cellular AUF1 p45 protein promotes West Nile virus replication by a methylation-enhanced RNA chaperone activity. *submitted*

Winkler, E., Aurich, H., Geissler, R., Mensch, A., Stöhr, N., Friedrich, S., Hüttelmaier, S. und Behrens, S.E. 2013. Hepatitis C virus replication induces expression of vascular endothelial growth factor and accelerates vascularization of human hepatoma. Manuskript in Vorbereitung

Tagungsbeiträge-Vorträge

Friedrich, S., Geißler, R. und Behrens, S.E.: RNA binding protein AUF1 is involved in West Nile virus RNA replication "22. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie", 14.-17.03.2012, Essen.

Friedrich, S., Schmidt, T., Golbik, R.P., Geißler, R., und Behrens, S.E.: RNA binding protein AUF1 is involved in West Nile virus RNA replication "23. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie", 06.-09.03.2013, Kiel.

Tagungsbeiträge-Poster

Friedrich, S., Geißler, R. und Behrens, S.E.: Cellular RNA-binding proteins are involved in West Nile virus RNA replication. "19. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie", 18.-21.03.2009, Leipzig.

Friedrich, S., Geißler, R. und Behrens, S.E.: Cellular RNA-binding proteins are involved in West Nile virus RNA replication. "16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses", 03.-07.10.2009, Nizza, Frankreich.

Friedrich, S., Geißler, R. und Behrens, S.E.: RNA binding protein AUF1 is involved in West Nile virus RNA replication. "First international meeting-Posttranscriptional Control of Gene Expression-Mechanism and Role in Pathogenesis, 15.-17.03.2012, Halle.

Friedrich, S., Schmidt, T., Golbik, R.P., Geißler, R., und Behrens, S.E.: The RNA binding protein AUF1 supports 5'-3' interactions of the West Nile virus RNA genome and thus promotes viral replication. "Keystone Symposia - Positive strand RNA Viruses", 28.04.-03.05.2013, Boston, USA.

DANKSAGUNG

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

Herrn Prof. Dr. Gary Sawers und Prof. Dr. Norbert Tautz danke ich für die freundliche Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens.

Bei PD Dr. habil. Ralph Peter Golbik möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft und die förderlichen Diskussionen sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Mein spezieller Dank gilt Dipl.-Biochemiker Tobias Schmidt für die vielen motivierenden Diskussionen, Anregungen und Hilfestellungen bei den biophysikalischen Experimenten sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dr. René Geißler danke ich für die Beteiligung an der Reinigungsprozedur der Wirtsfaktoren sowie für konstruktive Gespräche im Laboralltag.

Bei Dr. Thomas Ruppert vom Zentrum für molekulare Biologie der Universität Heidelberg sowie bei Dr. Angelika Schierhorn vom Institut für Biochemie und Biotechnologie der Universität Halle-Wittenberg bedanke ich mich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

PD Dr. habil. Hauke Lillie vom Institut für Biochemie und Biotechnologie der Universität Halle-Wittenberg danke ich für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation.

Bei Stefan Chabierski und Dr. Sebastian Ulbert vom Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie Leipzig möchte ich mich für die Durchführung der Experimente mit infektiösem West-Nil-Virus bedanken.

Herrn Prof. Dr. Uwe Gerd Liebert vom Institut für Virologie der Universität Leipzig danke ich für die Analyse der Virustiter.

Ich bedanke mich bei Dipl.-Biochemiker Bodo Moritz für die Einleitung in die radioaktiven Methylierungsassays sowie bei Prof. Dr. Elmar Wahle für die Möglichkeit diese Experimente in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.

Bei Prof. Dr. Pei-Yong Shi vom Novartis Institut for Tropical Diseases bedanke ich mich für das zur Verfügung gestellte Plasmid mit der cDNA des West-Nil-Virus.

Bei Claudia Müller vom HALOmem-Institut der Universität Halle-Wittenberg möchte ich mich vielmals für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Zu guter Letzt bedanke ich mich herzlich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung Mikrobielle Biotechnologie für ein freundliches und angenehmes Arbeitsklima.

LEBENS LAUF**PERSÖNLICHE DATEN**

Name Susann Friedrich
Geburtsdatum 21. April 1981
Staatsangehörigkeit deutsch

AUSBILDUNG

10/2000-10/2005 Diplomstudium der Biologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Diplomarbeit: Charakterisierung neuer *extracytoplasmic function*
(ECF)-Sigmafaktoren aus *Cupriavidus metallidurans*
Abschluss: Diplom-Biologe

1991-1999 Walter-Gropius-Gymnasium, Dessau
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1987-1991 Grundschule, Dessau

ARBEITSERFAHRUNG

seit 10/2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Biochemie und
Biotechnologie, Abteilung Mikrobielle Biotechnologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens
Untersuchungen zur RNA-Replikation des West-Nil-Virus

10/2006-12/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Department of Surgery,
und Universität von Melbourne, Australien
03/2007-05/2007 Betreuer: Associate Prof. Dr. Graham Baldwin
Klonierung, Expression und Reinigung gastrointestinaler Peptid-
hormone

11/2005-04/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Mikrobiologie, Martin-
Luther-Universität Halle-Wittenberg
Betreuer: Prof. Dr. Dietrich H. Nies
Beitrag der *extracytoplasmic function*-Sigmafaktoren zur
Homöostase von Übergangsmetallen in *Cupriavidus metallidurans*

09/1999-08/2000 Freiwilliges Ökologisches Jahr, Biosphärenreservat „Mittlere Elbe“,
Dessau

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Halle (Saale), den

Susann Friedrich