

Charakterisierung des RNA-bindenden Proteinkomplexes NF90-NF45: Identifizierung einer RNA-Chaperon-Aktivität

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Herrn Dipl.-Biochemiker Tobias Schmidt

geb. am 06.09.1987 in Halle/Saale

öffentlich verteidigt am 26.10.2015

Gutachter:

Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

Prof. Dr. Gary Sawers

jun. Prof. Sandro Keller

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
I. EINLEITUNG	1
1.1 Die NFAR-Proteine NF90 und NF45.....	1
1.2 Biologische Funktionen von NF90 / NF90-NF45.....	2
1.2.1 Regulation der Genexpression durch NF90.....	2
1.2.2 Funktionen von NF90 in Wirt-Pathogen-Interaktionen.....	5
1.2.3 NF90 und das Hepatitis-C-Virus.....	7
1.2.3.1 Der Lebenszyklus des Hepatitis-C-Virus.....	7
1.2.3.2 NF90 ist ein Wirtsfaktor des Hepatitis-C-Virus.....	9
1.3 Die RNA-bindenden Motive von NF90	10
1.3.1 Das <i>double-stranded RNA binding motif</i>	10
1.3.2 Das RGG-Motiv	12
1.4 Zielstellung.....	13
II. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Chemikalien, Puffer und Verbrauchsmaterial.....	14
2.2 Molekularbiologische Arbeiten mit RNA.....	14
2.2.1 <i>In-vitro</i> -Transkription.....	14
2.2.2 Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese / Größenstandards.....	15
2.2.3 Konzentrationsbestimmung von RNA	15
2.3 Molekularbiologische Arbeiten mit DNA.....	16
2.3.1 Transformation von bakteriellen Zellen nach der CaCl ₂ -Methode.....	16
2.3.2 Miniplasmidpräparation	16
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese / Größenstandards	17
2.3.4 DNA-Sequenzierung.....	17
2.3.5 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	17
2.3.6 Reinigung von DNA	17
2.3.7 Isolation von DNA aus Agarosegelen.....	18
2.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten	18
2.3.9 Phosphorylierung von DNA/RNA.....	18
2.3.10 Polymerase-Kettenreaktion.....	18
2.3.11 Ortsgerichtete Mutagenese.....	20
2.3.12 Konzentrationsbestimmung von DNA	20
2.4 Proteinbiochemische Methoden	20
2.4.1 Präparation der rekombinanten Proteine	20
2.4.1.1 Biomasseproduktion	20
2.4.1.2 Rekombinante Herstellung von NF90 und Varianten	21
2.4.1.3 Rekombinante Herstellung von NF45	23
2.4.1.4 Rekonstitution des Heterodimer NF90-NF45.....	23
2.4.1.5 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	23
2.4.1.6 Konzentrierung von Proteinen	24
2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Coomassie- und Silberfärbung	24
2.4.3 Analytische Ultrazentrifugation.....	26
2.4.4 Massenspektrometrie.....	26
2.5 Methoden zur strukturellen Analyse von NF90	26
2.5.1 Circular dichroismus	26

2.5.2	Intrinsische Fluoreszenz.....	27
2.5.3	Chemische De- und Renaturierung von NF90	27
2.6	Bestimmung thermodynamischer Parameter der Nukleinsäure-Bindung von NF90....	29
2.6.1	Fluorophor-markierte Oligonukleotide	29
2.6.2	Fluorimetrische Quantifizierung der RNA-Protein-Interaktion	29
2.6.2.1	Aktive Zentren-Titration	30
2.6.2.2	Bestimmung der Dissoziationskonstante von RNA-Protein-Komplexen	30
2.6.2.3	Analyse der Protein-RNA-Interaktion nach einer linearen-freien-Enthalpie-Beziehung	30
2.6.2.4	Temperaturabhängigkeit der Protein-RNA-Interaktion	31
2.7	Bestimmung kinetischer Parameter der RNA-Bindung von NF90	32
2.8	RNA-annealing-Assay	33
2.8.1	Temperaturabhängigkeit des RNA-annealing	34
2.9	<i>in-vitro</i> RNA-abhängiger RNA-Polymerase-Assay	34
2.10	Bestimmung der thermodynamischen Stabilität von Nukleinsäuren.....	35
2.11	Statistische Auswertung.....	36
III.	ERGEBNISSE	37
3.1	Charakterisierung von NF90	37
3.1.1	Strukturelle Integrität und Reversibilität der Faltung von NF90	38
3.1.2	NF90 bindet mit hoher Affinität an dsRNA.....	41
3.1.3	NF90 interagiert in unterschiedlicher Weise mit unterschiedlichen RNAs	42
3.1.4	Beide dsRBMs von NF90 sind für eine effektive RNA-Bindung essentiell	45
3.1.5	Der C-Terminus von NF90 ist essentiell an der Bindung von ssRNA beteiligt	47
3.1.6	Die RNA-bindenden Motive von NF90 assoziieren kooperativ an RNA.	48
3.1.7	Die Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs von NF90 moduliert den gesamten RNA-Bindungsprozess.....	50
3.1.8	Die Pseudophosphorylierung von Ser651 verändert die Konformationseigenschaften der RGG-Region.....	51
3.1.9	Die Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs blockiert Konformationsänderungen von NF90, die durch RNA-Bindung induziert werden.....	53
3.1.10	NF90 ^{S651E} bindet selektiv an RNA-Konformationen	54
3.2	Charakterisierung von NF90-NF45	57
3.2.1	Rekonstitution des Komplexes NF90-NF45	57
3.2.2	Die Heterodimerisierung von NF90-NF45 führt zu Sekundär-strukturänderungen in den Proteinen	58
3.2.3	Die Heterodimerisierung von NF90-NF45 induziert eine thermodynamische Stabilisierung beider Proteine gegenüber den jeweiligen Monomeren	59
3.2.4	Die Heterodimerisierung von NF90-NF45 verbessert die RNA-Bindungseigenschaften von NF90	62
3.2.5	Etablierung eines RNA-Chaperon-Aktivitätsassay	64
3.2.6	NF90 und das Heterodimer NF90-NF45 sind RNA-annealer	67
3.2.7	Die durch die Komplexbildung von NF90 mit NF45 stabilisierten Strukturelemente sind nicht an der RNA-Bindung beteiligt	70
3.2.8	Die Strukturelemente in NF90, die durch die Komplexbildung mit NF45 stabilisiert werden, tragen zur RNA-Chaperon-Aktivität bei.....	72
3.2.9	Der C-Terminus von NF90 ist in der Interaktion mit NF45 involviert.....	73
3.2.10	Die Heterodimerisierung von NF90-NF45 fördert den Beitrag der dsRBMs zur Bindung von ssRNA-1.....	75

3.2.11	Die Heterodimerisierung von NF90 mit NF45 verändert die Aktivität des C-Terminus von NF90 bei der RNA-Bindung	77
3.2.12	Die RNA-bindenden Motive von NF90 leisten unterschiedliche Beiträge zur RNA-Chaperon-Aktivität	79
3.2.13	Das RGG-Motiv von NF90 ist essentiell für die RNA-Chaperon-Aktivität von NF90. Das gilt nicht für die RCA von NF90-NF45.	81
3.3	Untersuchungen zum Mechanismus der RNA-Chaperon-Aktivität	82
3.3.1	Der Übergangszustand des unkatalysierten RNA- <i>annealing</i> von HCV-SL3 und RaSc weist ähnliche Eigenschaften auf	83
3.3.2	Das NF90-katalysierte RNA- <i>annealing</i> ist durch verbesserte enthalpische Prozesse charakterisiert.....	86
3.3.3	Die ssRNA-1-Bindung von NF90 und NF90-NF45 ist enthalpisch getrieben.....	87
3.3.4	Die strukturelle Organisation der RNAs beeinflusst die Effektivität der RNA-Chaperon-Aktivität von NF90	89
3.3.5	NF90wt und NF90wt-NF45 katalysieren eine <i>strand displacement</i> Reaktion auf unvollständig komplementären HCV-SL3 RNAs	91
3.4	Untersuchungen zur biologischen Relevanz der RNA-Chaperon-Aktivität von NF90 ...	93
3.4.1	Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase katalysiert die Synthese von (-)-Strang-RNA auf der viralen 5BSL3.1_3'-UTR	94
3.4.2	NF90-NF45 stimuliert die RdRP-katalysierte (-)-Strang-RNA-Synthese <i>in vitro</i>	95
3.4.3	NF90wt-NF45 verändert die Struktur oder Konformation von 5BSL3.1_3'-UTR.....	97
3.4.4	Die HCV-3'UTR nimmt alternative Konformationen ein.....	99
3.4.5	NF90-NF45 verändert die Konformation des HsR-SL der VEGF-mRNA	101

IV. DISKUSSION

4.1	Kooperativität der RNA-bindenden Motive von NF90	104
4.1.1	Das dsRBM2 von NF90 liefert den größten Beitrag zur Bindung an dsRNA	104
4.1.2	Die dsRBMs von NF90 tragen zur Bindung desselben RNA-Moleküls bei	105
4.1.3	Die RNA-bindenden Motive von NF90 assoziieren kooperativ an RNA	107
4.1.4	Die Pseudophosphorylierung beeinflusst die Kooperativität und Aktivität der RNA-bindenden Motive von NF90	107
4.1.5	Der C-Terminus von NF90 ist in Konformationsänderungen gebundener ssRNA involviert.....	109
4.2	Die Komplexbildung mit NF45 verändert grundlegende Eigenschaften von NF90	111
4.2.1	Mindestens zwei Interaktionsstellen zwischen NF90 und NF45 induzieren eine thermodynamische Stabilisierung des Komplexes	111
4.2.2	Die Heterodimerisierung von NF90 mit NF45 verstärkt die Kooperativität der RNA-bindenden Motive von NF90 und verbessert so dessen RNA-Bindung.....	112
4.2.3	Homologiemodellierung von NF90-NF45	115
4.2.4	Die Komplexbildung von NF90 und NF45 induziert eine effektive RNA-Chaperon-Aktivität.....	115
4.2.4.1	Die Bedeutung von RNA-Chaperonen im Prozess der RNA-Faltung	115
4.2.4.2	NF90-NF45 ist ein RNA- <i>annealer</i>	117
4.2.4.3	Das RGG-Motiv von NF90 ist von großer Bedeutung für die RNA-Chaperon-Aktivität des Proteins	118
4.2.4.4	NF90-NF45 ist ein spezifisches RNA-Chaperon	118
4.3	Der Mechanismus des RNA-<i>annealing</i>	120
4.3.1	Das unkatalysierte <i>annealing</i>	120
4.3.2	Die NF90-NF45-katalysierte Reaktion.....	122

4.3.3	Die RNA-bindenden Motive von NF90 sind in verschiedener Weise an der Katalyse beteiligt.....	125
4.3.4	Die Aktivität von NF90-NF45 als RNA- <i>annealer</i> im Vergleich anderer RNA- <i>annealer</i> ...	127
4.4	Die biologische Relevanz der RNA-Chaperon-Aktivität	129
4.4.1	NF90 ist ein <i>host factor</i> der Replikation des Hepatitis C-Virus.....	130
4.4.2	Die RNA-Chaperon-Aktivität von NF90-NF45 hat eine wichtige Funktion bei der Stabilisierung von mRNAs.....	133
4.5	Ausblick.....	136
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	138
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	140
VII.	ANHANG	149
7.1	Material und Methoden (Fortsetzung).....	149
7.1.1	Kultivierungsbedingungen bakterieller Zellen.....	152
7.1.2	Herstellung radioaktiv-markierter RNA	153
7.1.3	Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese	153
7.1.4	Filterbindungsassay	153
7.2	Ergänzende Ergebnisse	155
7.2.1	Charakterisierung von NF45	155
7.2.1.1	Präparation von NF45	155
7.2.1.2	Strukturelle und funktionale Eigenschaften von NF45.....	156
7.2.2	Die Lage nicht-komplementärer Bereiche der dsRNA beeinflussen die thermodynamische Stabilität der Nukleinsäure.....	158
7.2.3	Tabellen	161
7.3	Ergänzende Diskussion.....	163
7.4	Homologie-Modell von NF90-NF45.....	164
7.5	Proteinsequenzen.....	170

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin	MS	Massenspektrometrie
<i>ad</i>	lat. „zu“	myoD	myogener Faktor 3
ADAR	engl. <i>adenosine deaminase acting on RNA</i>	NES	engl. <i>nuclear export signal</i>
ARE	engl. <i>AU-rich element</i>	NFAR	engl. <i>nuclear factors associated with RNA</i>
ARRE	engl. <i>antigen receptor response element</i>	NFAT	engl. <i>nuclear factor of activated T-cells</i>
ATP	Adenosintriphosphat	Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
ATPase	Adenosintriphosphatase	NLS	engl. <i>nuclear localization signal</i>
AUBP	engl. <i>AU-rich binding protein</i>	nt	Nukleotid(e)
AUG	Translationsstartcodon	N-Terminus	Amino-Terminus
bp	Basenpaar	OD	optische Dichte
BVDV	Virus der bovinen Virusdiarrhoe	ORF	engl. <i>open reading frame</i>
C	Cytosin	PA	Polyacrylamid
CD	Circulardichroismus	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
C-Terminus	Carboxy-Terminus	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
CTP	Cytidintriphosphat	PRMT	engl. <i>protein arginine methyltransferase</i>
DV	Dengue-Virus	RdRP	RNA-abhängige RNA-Polymerase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RHA	RNA Helikase A
DNase	Desoxyribonuklease	RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphate	RNase	Ribonuklease
DRBP76	engl. <i>double-strand RNA binding protein 76</i>	rpm	engl. <i>rotations per minute</i>
ds	doppelsträngig	RT	Raumtemperatur
dsRBM	engl. <i>double-strand RNA binding motif</i>	SL	engl. <i>stem-loop</i>
DZF	engl. <i>dimerization zinc finger</i>	SPNR	engl. <i>spermatid perinuclear RNA-binding protein</i>
<i>E. coli</i>	lat. <i>Escherichia coli</i>	ss	einzelsträngig
eIF4E	eukaryotischer Initiationsfaktor 4E	SUMO	engl. <i>small ubiquitin-like modifier</i>
g	Erdbeschleunigung	T	Thymin
G	Guanin	TTR-RBP	engl. <i>translation and turnover regulatory RNA binding protein</i>
GCase	Glucocerebrosidase	U	Uracil
HBV	Hepatitis-B-Virus	U	engl. <i>unit</i>
HCV	Hepatitis-C-Virus	uPA	Urokinase
HIV	humanes Immundefizienz-Virus	UTR	engl. <i>untranslated region</i>
hnRNP	engl. <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>	UV	ultraviolett
HLA-DR	humanes Leukozytenantigen DR	VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
IL-2, IL-6, IL-8	Interleukin 2, 6 bzw. 8	Vol	Volumen
ILF3	engl. <i>interleukin enhancer-binding factor 3</i>	v/v	Volumen pro Volumen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	wt	Wildtyp
IRES	engl. <i>internal ribosomal entry site</i>	w/v	Masse pro Volumen
kb	Kilobasenpaar	Zfr	engl. <i>zinc-finger RNA-binding protein</i>
kDa	Kilodalton		
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>		
LFER	lineare freie Enthalpiebeziehung		
MKP-1			
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>		

I. EINLEITUNG

1.1 Die NFAR-Proteine NF90 und NF45

Der *nuclear factor 90* (NF90, auch *nuclear factor associated with RNA 1*, NFAR-1) ist ein in allen tierischen Zellen, evolutionär stark konserviertes Protein. Es wird durch das *interleukin enhancer-binding factor 3* (*ILF3*) Gen kodiert, welches im humanen Genom auf Chromosom 19 lokalisiert ist (1). Das *ILF3*-Gen besteht aus 21 Exons, die für zwei Proteinisoformen durch alternatives Spleißen der *pre*-mRNA kodieren: NF90 (~ 76 kDa) und NF110 (~ 90 kDa, **Abb. 1**). Diese unterscheiden sich nur in der Länge des C-Terminus, welcher bei NF110 um 192 Aminosäuren länger ist und durch die Exons 19-21 kodiert wird (2). Im N-terminalen Bereich (Aminosäuren 1-702/706) zeigen NF90 und NF110 100%ige Identität. Ein weiteres alternatives Spleißen an der Schnittstelle Intron13-Exon14 erzeugt die Isoformen NF90_{a/b} bzw. NF110_{a/b} und generiert eine NVKQ-Sequenz (in b-Isoformen), deren funktionelle Bedeutung bisher nicht geklärt ist (3). Alle Isoformen enthalten eine N-terminale Dimerisierungs-Zinkfinger-Domäne (DZF), die Interaktionen mit anderen DZF-Proteinen eingeht (4), und ein bipartites Kernlokalisierungssignal (NLS) sowie ein Kernexportsignal (NES) (5). Aufgrund des starken NLS ist NF90 größtenteils im Zellkern lokalisiert. Weiterhin besitzen alle Isoformen zwei *double-stranded RNA binding motifs* (dsRBM) und ein C-terminales RGG-Motiv. Für diese Motive wird angenommen, dass sie in der Interaktion der Proteine mit RNA involviert sind. Die zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren von NF110 kodieren für eine Region, die viele Glycine, Glutamine, Serine und Tyrosine enthält und daher als GQSY-Region bezeichnet wird. Es gibt Hinweise, dass diese Region in Interaktionen von

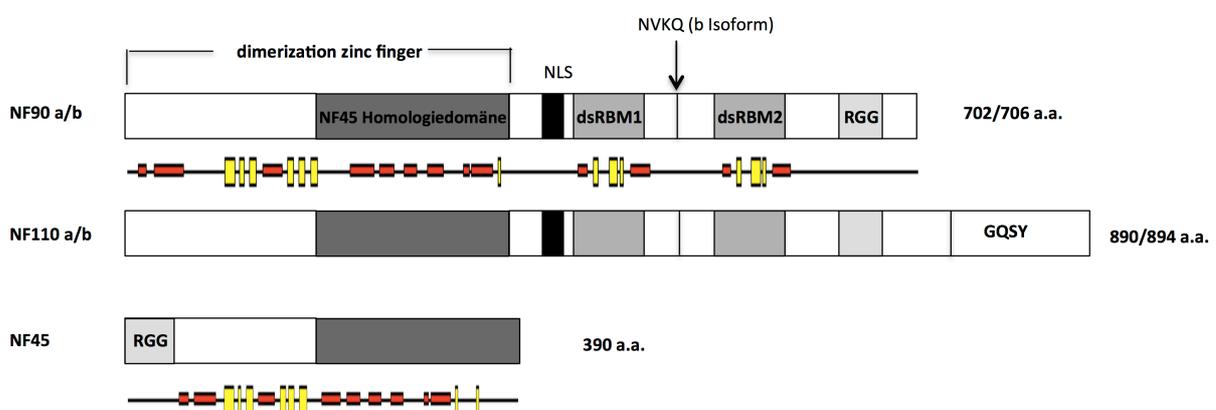


Abbildung 1: Hauptgenprodukte des *ILF3*- und *ILF2*-Gen. Schematische Darstellung der Domänenorganisation der Isoformen NF90_a, NF90_b, NF110_a und NF110_b sowie NF45. Die Doppelstrang-RNA-bindenden Motive (dsRBM), das RGG-Motiv, der *dimerization zinc finger* (DZF) und die NF45-Homologiedomäne sowie isoformspezifische Sequenzen, die in der b-Isoform vorkommen, sind gekennzeichnet. Das farbige Schema zeigt die Vorhersage der Sekundärstrukturen von NF90 (oben) und NF45 (unten) mittels PredictProtein-Server (<http://www.predictprotein.org>, (114)). α-Helices sind rot und β-Faltblätter gelb dargestellt.

NF110 mit Nukleinsäuren und Proteinen involviert ist (6,7).

Der *nuclear factor 45* (NF45, auch *interleukin enhancer-binding factor 2*, ILF2) wird durch das *ILF2*-Gen kodiert, welches auf dem humanen Chromosom 1 lokalisiert ist (8). Es besteht aus 14 Exons, die nicht durch alternatives Spleißen prozessiert werden (9). NF45 ist größtenteils im Zellkern lokalisiert.

Die Primärstruktur des Proteins (**Abb. 1**) enthält eine DZF-Domäne, die eine 27%-ige Identität zur DZF-Domäne von NF90 aufweist. Sie vermittelt die Interaktion von NF45 mit u.a. NF90, *spermatid perinuclear RNA-binding protein* (SPNR) und *zinc-finger RNA-binding protein* (Zfr) (4). Der C-Terminus von NF45 beinhaltet ein saures Glutamat-reiches Motiv, das nicht genauer charakterisiert ist. Die Primärstruktur enthält auch ein N-terminales RGG-Motiv, dessen spezifische Nukleinsäure-Bindungskapazität nicht weiter untersucht ist. Eine Assoziation von NF45 an Nukleinsäuren konnte bisher nur in Komplexen mit anderen Proteinen (z.B. NF90) beobachtet werden. Im Gegensatz zu NF90 ist NF45 als individuelles Protein kaum untersucht. Die meisten funktionalen Analysen betrachten NF45 im Proteinkomplex mit NF90 (s. nachfolgende Abschnitte).

1.2 Biologische Funktionen von NF90 / NF90-NF45

In der Literatur existiert eine uneinheitliche Nomenklatur der NFAR-Proteine. NF90 ist u.a. bekannt als DRBP76, MPP4, NFAR-1, NFAT-90, TCP80, SPNR (*Mus musculus*), p74 (*Rattus norvegicus*), CBTF98 (*Xenopus laevis*) und 4 F.1 (*Xenopus laevis*). Daher wird im nachfolgenden Text, wenn nicht anders gekennzeichnet, NF90 stellvertretend für sämtliche Vertreter der NFAR-Proteinfamilie benutzt. Auf die Hauptfunktionen von NF90 wird in den folgenden Abschnitten spezifischer eingegangen.

1.2.1 Regulation der Genexpression durch NF90

NF90 bzw. NF90-NF45 sind multifunktionale RNA-bindende Proteine (RBP), die in der zellulären Genexpression regulatorische Aufgaben besitzen. So konnte nachgewiesen werden, dass NF90 regulatorisch in der Transkription (10-14), dem Spleißen (1,15) und Transport von mRNA (16) sowie in post-transkriptionellen Prozessen (s.u.) involviert ist. Bei letzteren beeinflusst NF90 bzw. NF90-NF45 auch die Expression verschiedener immunologisch aktiver Gene, weshalb diese Proteine auch eine Bedeutung in der Wirt-Pathogen-Interaktion einnehmen (s. 1.2.2). Wie bereits beschrieben, enthält NF90 drei RNA-bindende Motive, für die vermutet wird, dass diese in der RNA-Protein-Interaktion involviert sind. Die biologischen Funktionen von NF90 als RBP werden daher unmittelbar durch dessen Eigenschaften in der RNA-Bindung definiert. So ist eine Hauptfunktion von NF90 in der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression dokumentiert, bei der es mit mRNAs interagiert (17,18). Diese mRNA-NF90-Interaktionen haben weitreichende

Auswirkungen auf die Eigenschaften und Prozessierung der assoziierten mRNA. So ist von verschiedenen Arbeitsgruppen beobachtet worden, dass die Bindung von NF90 zur Stabilisierung (erhöhte biologische Halbwertszeit) und zu veränderten Translationsaktivitäten assoziierter mRNAs führt (**Tabelle 1**). NF90 wird daher auch als *turnover and translation regulatory protein* (TTR-RBP) klassifiziert (19,20). Die Bedeutung dieser Funktion wurde durch Experimente mit *ILF3-knockout*-Mäusen hervorgehoben. Die *ILF3*-Deletion in den Mäusen induzierte eine post-natale Letalität der Mäuse (21). Dieser Zustand wurde auf eine Destabilisierung von mRNAs von Genen, die in der Muskelausbildung involviert sind, zurückgeführt.

TTR-RBPs wie NF90 wirken nicht als allgemeine zelluläre Regulatoren der Translation, da sie offenbar nur ein bestimmtes Set von mRNAs binden (20). Wie dabei die RNA-bindenden Motive des TTR-RBPs die molekulare Bindungsspezifität determinieren und wie diese Spezifität bzw. Selektivität zu verstehen ist, ist auch im Fall von NF90 größtenteils ungeklärt (siehe 1.3 und Referenz (22)). Kuwano *et al.* analysierten die Sequenzen NF90-assoziiierter mRNAs und identifizierten eine AU-reiche Sequenz in diesen mRNAs, die die Autoren als *NF90 signature motif* (*NF90m*) bezeichneten (23). Das *NF90m* ist eine 25 - 30 bp AU-reiche RNA-Sequenz in der 3'-nicht-translatierten Region (UTR) verschiedener mRNA-Bindungspartner von NF90 und bildet den Autoren zufolge eine *stem-loop* (SL) Struktur aus. Diese RNA-Sequenz vermittelt aber keine Spezifität der NF90-mRNA-Bindung, da viele andere durch NF90-gebundene RNAs das *NF90m* nicht enthalten (**Tabelle 1**). Viele dieser RNAs enthalten jedoch AU-reiche Elemente (ARE) wie oben erwähntes *NF90m*, die ebenfalls Sekundärstrukturelemente der RNA ausbilden. (5,23,24). AREs sind *cis*-agierende Elemente in der 3'-UTR einer mRNA, die durch Interaktion mit *trans*-agierenden Faktoren die Degradation bzw. Stabilität der mRNA und somit die biologische Halbwertszeit der mRNA regulieren (25,26). Viele der *trans*-agierenden Faktoren, die als AU-bindende Proteine (AUBP) bezeichnet werden, konkurrieren um die ARE-Bindung. Die einzelnen AUBPs vermitteln dann eine individuelle Stabilisierung oder Destabilisierung der entsprechenden mRNA (27). NF90 ist daher auch ein AUBP, dessen Interaktion mit bestimmten mRNAs deren Stabilität und somit Halbwertszeit erhöht (21,23,24,28-35). Die molekularen Mechanismen, wie die Assoziation von NF90 an AREs die Stabilisierung der assoziierten mRNA induziert, sind bisweilen ungeklärt. Es wird vermutet, dass eine verzögerte Degradation der mRNAs durch eine Konkurrenz um die mRNA-Bindung zwischen NF90 und a) der Abbaumaschinerie oder b) mRNA destabilisierenden AUBPs entsteht (5). Dass eine mRNA-Assoziation von NF90 die Degradation der mRNA fördert, ist bisher nicht dokumentiert.

Tabelle 1. Funktionen von NF90 in der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression

mRNA	Bindungsstelle von NF90 in der mRNA	Auswirkungen der NF90-Assoziation auf die mRNA	Referenz
IL2			(5)
MyoD			(21)
myogenin	3'UTR	erhöhte Stabilität	(21)
p21 ^{WAF/Cip1}			(21)
HLA-DR			(14)
Tau			(34)
MKP-1	3'UTR	verminderte Translation, erhöhte Stabilität	(36)
GCase	ORF		(37)
VEGF	3'UTR	erhöhte Translation und Stabilität	(24)
Cyclin T1	3'UTR	erhöhte Translation	(38)
uPA			(39)
			(23)
IL-6, IL-8			(35)
eIF4E	3'UTR	verminderte Translation	(23)
NF90m-RNAs, (s. Text)			

Die Halbwertszeit einer mRNA korreliert oftmals mit deren Translationsaktivität (19,40). Studien, in denen NF90 siRNA-vermittelt depletiert wurde, belegten eine unter diesen Bedingungen erhöhte Assoziation an Polysomen der mRNAs, die Interaktionspartner von NF90 darstellen. Daraus wurde geschlossen, dass die Bindung von NF90 an bestimmte mRNAs zur Inhibierung der Translationsinitiation auf diesen mRNAs führt (23). Bei einigen mRNAs findet zusätzlich eine Stabilisierung der RNA durch die NF90-Bindung statt (**Tabelle 1**, (36,37)).

Die Assoziation von NF90 an eine mRNA führt aber nicht ausschließlich zu deren verminderter Translation (**Tabelle 1**). Vumbaca und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass die Bindung von NF90 an die mRNA des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) eine Stabilisierung und eine erhöhte Translationsaktivität der mRNA induziert (24). VEGF übernimmt wichtige Funktionen in der Angiogenese und dessen Genexpression wird allgemein sehr stark über verschiedene post-transkriptionelle Mechanismen reguliert (41). Vumbaca *et al.* konnten weiterhin die RNA-Bindungsstelle von NF90 auf die *hypoxia stability region* (HsR) in der 3'-UTR der VEGF-mRNA eingrenzen. Das HsR-Element ist ein ARE, das eine Sekundärstruktur ausbildet, und reguliert die Stabilität der VEGF-mRNA beim Übergang von norm- zu hypoxischen Bedingungen (42,43). Ray *et al.* konnten zeigen, dass protein-vermittelte spezifische Konformationsänderungen der HsR-Region bei dieser Änderung der äußeren Bedingungen erfolgen (44). Die Autoren identifizierten

zwei Strukturen der HsR-Region, in denen der zentrale *stem-loop* der Region (HsR-SL) in unterschiedlichen Konformationen vorliegt (**Abb. 2**). Die HsR-Struktur, in der HsR-SL nicht ausgebildet ist, liegt unter normoxischen Bedingungen vor und inhibiert die Translation auf der mRNA. Dieses Konformer wurde als *translation silencing* bezeichnet. Die Struktur hingegen, die den vollständig ausgebildeten HsR-SL enthält, liegt unter normoxischen Bedingungen vor und fördert die Translation auf der mRNA. Diese Konformation wurde als *translation permissive* bezeichnet. Entsprechend wurde für das HsR-Element eine Funktion als *riboswitch* definiert. Welche Rolle die Assoziation von NF90 an das HsR-Element dabei einnimmt, ist jedoch nicht bekannt.

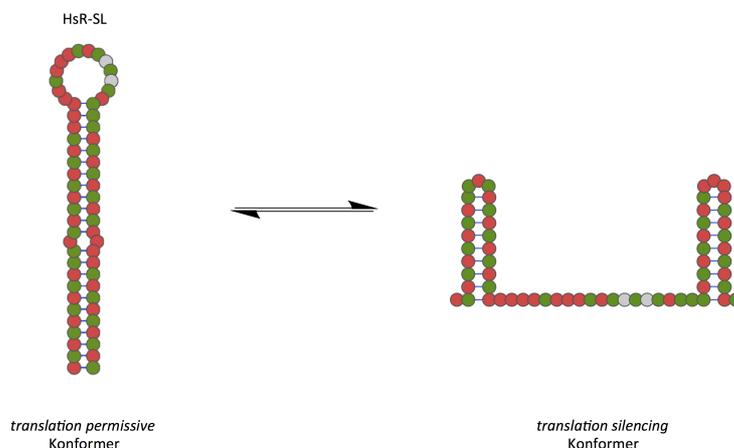


Abbildung 2: Das HsR-Element der VEGF-mRNA ist ein *riboswitch*. Schematische Darstellung der Konformationsänderungen des zentralen *stem-loop* der AU-reichen HsR-Region (HsR-SL, A – rot, U – grün, G/C grau). In der *translation permissive*-Konformation ist der HsR-SL voll ausgebildet, was die Translation fördert. Im *translation silencing*-Konformer ist der HsR-SL nicht präsent. Diese Konformation inhibiert die Translation der VEGF-mRNA. Konformationsmodell modifiziert nach Ray *et al.* (44).

Abgesehen von der VEGF-mRNA konnte auch für andere mRNAs gezeigt werden, dass deren Translation positiv durch NF90 beeinflusst wird (**Tabelle 1**, (38,39)). Die genauen Mechanismen hinter der NF90-vermittelten Translationsregulation dieser mRNAs ist ebenfalls nicht geklärt.

Zusammengefasst kann eine Hauptfunktion von NF90 als die eines RNA-bindenden Proteins festgehalten werden, bei der es an AU-reiche Sequenzmotive in der 3'UTR verschiedener mRNAs assoziiert und diese mRNAs oftmals stabilisiert. Die Translationsaktivität auf der mRNA kann durch die Bindung von NF90 an die mRNA positiv oder negativ beeinflusst sein. Spezifische RNA-Sequenzen, die zur Rekrutierung von NF90 führen, und molekulare Mechanismen der RNA-Bindung von NF90, die die beobachteten Funktionen vermitteln, sind größtenteils unbekannt.

1.2.2 Funktionen von NF90 in Wirt-Pathogen-Interaktionen

Wie bereits eingeführt ist NF90 als TTR-RBP im zellulären RNA-Metabolismus auch regulatorisch in der Expression verschiedener immunologisch wichtiger Gene involviert (**Tabelle 1**). In diesem Zusammenhang wurde auch eine Rolle von NF90 in einer

antiviralen Immunantwort postuliert. Verschiedene Labors konnten zeigen, dass NF90 mit der für diesen Prozess bedeutsamen Proteinkinase PKR interagiert (1,45). PKR wird durch (virale) dsRNA aktiviert und vermittelt durch Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α eine negativen Regulation von Translationsprozessen (46). Hier wurde beobachtet, dass die Interaktion von NF90 mit PKR einerseits zu einer negativen Regulation viraler Prozesse führen (1,47-49), aber andererseits auch die Funktion der PKR selbst inhibieren kann (45). Wie NF90 in beiden Fällen die Funktion der PKR genau beeinflusst, ist kaum geklärt. Es wird u.a. diskutiert, dass NF90 in seiner Funktion als RBP mit der PKR um die Bindung an dsRNA kompetitieren und somit in den Aktivierungsprozess der PKR eingreifen könnte (45,50).

Tabelle 2. Funktionen von NF90 in Wirt-Pathogen-Interaktionen

Virus	virales Genom	viraler Interaktionspartner	Funktion im viralen Lebenszyklus	Referenz
Hepatitis-B-Virus	dsDNA	prägenomische RNA	Stimulation d. Replikation	(51)
Rhinovirus Typ 2	(+)-ssRNA	IRES	Inhibierung d. Translation	(52,53)
HIV	(+)-ssRNA-RT	TAR-SL der TAR-RNA RRE in HIV-Transkripten	Inhibierung d. Replikation	(54,55)
Influenza-A (H5N1)	(-)-ssRNA	virale Polymerase	Inhibierung d. Replikation	(16,56)
Vesikuläres Stomatitis-Virus	(-)-ssRNA	virale mRNA	Inhibierung d. Translation	(48)
Adenovirus	dsDNA	RNA _{II}	Stimulation d. Replikation	(50)
Dengue-Virus	(+)-ssRNA	3'SL in der 3'UTR	Stimulation d. Replikation	(57)
Hepatitis-C-Virus	(+)-ssRNA	5'-UTR + 3'-UTR	Stimulation d. Replikation	(58,59)
BVDV	(+)-ssRNA	5'-UTR + 3'-UTR	Stimulation d. Replikation	(60,61)

TAR = *transactivation response*, RRE = *Rev response element*

Diese Experimente zeigen auch, dass NF90 sowohl an der Detektion viraler Infektionen, als auch am Infektionsprozess bestimmter Viren selbst beteiligt ist (**Tabelle 2**). So konnten inzwischen fördernde als auch inhibierende Einflüsse von NF90 auf die Lebenszyklen vieler verschiedener Viren wie Influenza-A (H5N1) und *human immunodeficiency virus-1* (HIV-1) nachgewiesen werden. Am stärksten sind dabei Funktionen von NF90 im Lebenszyklus von RNA-Viren dokumentiert. Am Beispiel des Rhinovirus, ein (+)-ssRNA-Virus, konnte sogar eine TTR-RBP analoge Funktion nachgewiesen werden. NF90 bindet an die *internal ribosomal entry site* (IRES) der viralen (+)-ssRNA, die virale mRNA, und stört den Initiationsprozess der Translation auf der viralen RNA (52,53). Diese Befunde demonstrieren, dass NF90 als RBP auch bei der Interaktion mit viraler RNA wichtige Funktionen übernimmt. Am detailliertesten sind diese Funktionen von NF90 in den Lebenszyklen von Vertretern der Familie der *Flaviviridae*, (+)-ssRNA-Viren, beschrieben. Bei Dengue-Virus (Genus: *Flavivirus*), dem Virus der bovinen Virusdiarrhoe (BVDV, *Pestivirus*) und Hepatitis C-Virus (HCV, *Hepacivirus*) konnte gezeigt werden, dass NF90 positiv zur viralen Vermehrung *in cellulo* beiträgt (57-61). NF90 wird daher auch als Wirtsfaktor (*host factors*) dieser Viren bezeichnet. Am besten ist diese Funktion von NF90 im Lebenszyklus des Hepatitis-C-Virus belegt. Darauf soll nun näher eingegangen werden.

1.2.3 NF90 und das Hepatitis-C-Virus

1.2.3.1 Der Lebenszyklus des Hepatitis-C-Virus

Wie alle Vertreter der *Flaviviridae* besitzt HCV ein (+)-ssRNA Genom, dessen protein-kodierender Bereich (*open reading frame*, ORF) von einer 5'- und 3'-UTR flankiert wird (**Abb. 3**). Im HCV-Lebenszyklus übernimmt das Genom mehrere Funktionen. Es dient als mRNA für die Translation der viralen Proteine, als Templat der RNA-Replikation und es wird in neue Viruspartikel verpackt (62). Im Unterschied zu zellulärer mRNA befindet sich am 5'-Ende der RNA keine cap-Struktur und am 3'-Ende kein PolyA-Schwanz. Die 5'- sowie 3'-UTR enthalten konservierte RNA-Strukturelemente und -Motive, die an der Initiation der Translation und Replikation der viralen RNA essentiell involviert sind (63). Die Translation des viralen RNA-Genoms beginnt nach der Freisetzung von HCV im Cytoplasma der Zelle. Der ORF kodiert für ein ca. 3000 Aminosäuren großes Polyprotein, dessen Synthese nach einem cap-unabhängigen Mechanismus (64) verläuft, der durch die hochstrukturierte HCV-IRES in der 5'-UTR des viralen Genoms vermittelt wird (**Abb. 3A**). Das Polyprotein wird ko- und post-translational durch zelluläre und virale Proteasen in Strukturproteine und Nichtstrukturproteine prozessiert (65,66). Zu den Nichtstrukturproteinen zählt u.a. NS5B. Dieses Protein besitzt eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) Aktivität (67) und stellt das zentrale Enzym des im Folgenden durch virale Nichtstrukturproteine und Wirtsfaktoren gebildeten Replikationskomplexes

der viralen RNA-Replikation dar. Wie bei anderen Vertretern der *Flaviviridae* synthetisiert die RdRP im ersten Schritt der viralen RNA-Replikation ausgehend vom (+)-Strang-RNA Genom eine vollständig komplementäre (-)-Strang-RNA (**Abb. 3B**). Die (-)-Strang-RNA dient im zweiten RNA-Replikationsschritt als Templat der Synthese neuer (+)-Strang-RNA, die u.a. als RNA-Genom in neue Viruspartikel verpackt wird (62). Die RdRP initiiert in beiden Schritten der RNA-Replikation *de novo*, d.h. am terminalen Nukleotid am 3'-Ende des viralen RNA.

Die 5'- und 3'-UTR des HCV-Genoms enthalten für die Translation der viralen RNA und die RNA-Replikation wichtige RNA-Elemente (**Abb. 3**, (63,68)). Die 5'-UTR besteht hauptsächlich aus der IRES-Struktur, die zur Rekrutierung der zellulären Translationsmaschinerie dient (69). Die 3'-UTR enthält verschiedene Strukturelemente.

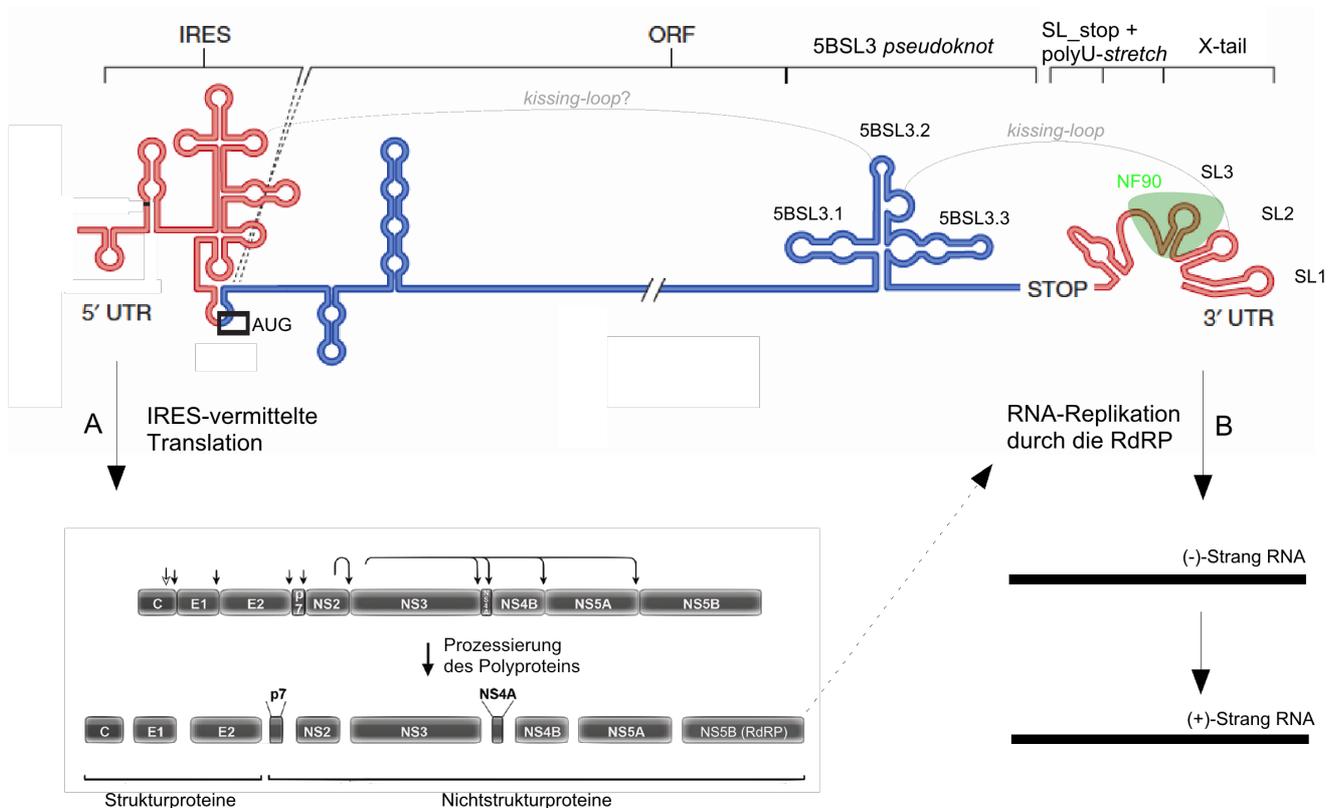


Abbildung 3: Organisation und Sekundärstrukturen der genomischen RNA des Hepatitis-C-Virus. Der offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF, blau) kodiert für ein ca. 3000 aa großes Polyprotein und ist von 5'- und 3'- nicht-translatierten Regionen (UTR, rot) flankiert (modifiziert nach Scheel und Rice (65)). Die 5'-UTR enthält die IRES. Die 3'-UTR besteht aus folgenden Strukturelementen: X-tail (SL1 – SL3), polyU-stretch, und SL_stop. **(A)** Die IRES-Struktur in der 5'-UTR vermittelt die Translation der viralen RNA. Das synthetisierte Polyprotein wird durch nachfolgende proteolytische Spaltungen in die Struktur- (C = core, E1/E2 = envelope-Proteine) und Nichtstrukturproteine (p7 und NS2 – NS5B) prozessiert. **(B)** Im ersten Schritt der RNA-Replikation initiiert die RdRP (NS5B) am 3'-Ende der 3'-UTR der viralen (+)-Strang-RNA und synthetisiert eine vollständig komplementäre (-)-Strang-RNA. Diese wird im anschließenden zweiten Schritt als Templat der RdRP-vermittelten Synthese neuer (+)-Strang RNA genutzt. Für den ersten Schritt stellt der X-tail die Bindestelle der RdRP dar und ist essentiell für die RNA-Replikation (70). Der polyU-stretch ist für eine effiziente Replikation wichtig (70). Die Funktion von SL_stop ist unbekannt. Am Ende des ORF sind die Strukturelemente 5BSL3.1 – 5BSL3.3 lokalisiert. 5BSL3.2 geht kissing-loop-Interaktionen (graue Linien) mit SL2 des X-tails und wahrscheinlich mit der 5'-IRES ein (74,75). Die Bildung des 5BSL3-pseudoknot ist essentiell für die Replikation und es wird postuliert, dass dieser auch in der Regulation der Translations- und Replikationsaktivität auf der viralen RNA involviert ist (73,76). Die grün gekennzeichnete Region zeigt die von Isken *et al.* ermittelte Bindungsstelle von NF90 im HCV-Genom (58).

Am unmittelbaren 3'-Ende der HCV-RNA befindet sich die 3'-X-tail-Region, die sich aus den Elementen SL1, SL2 und SL3 zusammensetzt. Diese Region stellt die Initiationsstelle der RdRP dar und ist für die *de novo* Synthese der (-)-Strang-RNA von essentieller Bedeutung (70). Der polyU-*stretch* unterstützt dabei die Effizienz der RNA-Replikation (70). Die Funktion des RNA-Elements SL_{stop} ist nicht genau geklärt. Es wird diskutiert, dass dieser SL für eine effiziente Termination der Translation auf der viralen RNA verantwortlich ist (71). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten außerdem zeigen, dass intramolekulare RNA-RNA-Wechselwirkungen, die von einem *cis*-agierenden Replikationselement (CRE) in der NS5B-kodierenden Region der viralen RNA ausgehen, eine wichtige Rolle für die Replikation einnehmen (72-76). Strukturanalysen belegten, dass das CRE aus drei *stem-loop* Strukturen besteht, die als 5BSL3.1 – 5BSL3.3 bezeichnet werden (**Abb. 3**, (73,76)). Dabei wurde eine *kissing-loop*-Interaktion zwischen 5BSL3.2 und SL2 des X-tails identifiziert, die eine *pseudoknot*-Struktur zusammensetzt (**Abb. 3**, graue Linie). Friebe *et al.* konnten durch Mutagenese-Studien am 5BSL3.2 der HCV-RNA nachweisen, dass dieser *pseudoknot* essentiell für die virale RNA-Replikation *in cellulo* ist (73,76).

Die Mechanismen, wie die gegenseitige Regulation der Translation und Replikation auf der viralen RNA genau erfolgt, sind zum Großteil ungeklärt. Es wird vermutet, dass bestimmte RNA-Elemente in den UTRs der viralen RNA an der Koordination dieser Prozesse beteiligt sind. So konnten von Tuplin und Mitarbeitern experimentelle Befunde erhalten werden, dass 5BSL3.2 auch in RNA-RNA-Interaktionen mit der 5'-IRES der viralen RNA involviert ist (**Abb. 3**, (75)). Die Autoren schlagen in diesem Zusammenhang vor, dass Wechselwirkungen von viralen und zellulären Faktoren mit dem 5BSL3.2 *pseudoknot* die Translations- und Replikationsaktivität auf der viralen RNA beeinflussen könnten (74).

1.2.3.2 NF90 ist ein Wirtsfaktor des Hepatitis-C-Virus

Die restringierte Größe des RNA-Genoms aller RNA-Viren, so auch von Viren der Familie *Flaviviridae*, limitiert die Anzahl möglicher viral-kodierter Faktoren. Daher haben viele dieser Viren Strategien entwickelt Wirtsfaktoren zu rekrutieren (62). Diese übernehmen zum Teil essentielle Funktionen in der Regulation und Organisation des viralen Lebenszyklus (77). So wurden inzwischen auch viele zelluläre Wirtsfaktoren des HCV-Lebenszyklus identifiziert, die durch eine Assoziation an die HCV-RNA die Prozesse der Translation und RNA-Replikation über unterschiedliche Mechanismen beeinflussen können (63,78,79). In diesem Zusammenhang wurde auch NF90 als Wirtsfaktor des Lebenszyklus von HCV identifiziert (58,59). Erstmals wiesen Isken *et al.* NF90 im HCV-Replikationskomplex in humanen Zellen nach, die mit replikationsfähiger HCV-RNA (sog. Replikons) transfiziert wurden (58). Dabei demonstrierten die Autoren

über UV-*crosslink*-Experimente mit nicht-fraktionierten S100-Zellextrakten eine spezifische Assoziation von NF90 an die 5'- und 3'-UTR der viralen RNA. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass NF90 eine Interaktion zwischen der 5'- und 3'-UTR der viralen RNA vermittelt und eine zirkuläre Struktur der HCV-RNA induzieren kann. Für HCV-verwandte Viren der Gattung *Flavivirus* (Familie: *Flaviviridae*) ist durch verschiedene Gruppen belegt worden, dass eine Zyklisierung des viralen Genoms essentiell für deren RNA-Replikation ist (80). Daher wurde vorgeschlagen, dass eine zirkuläre Struktur der HCV-RNA eine positive Auswirkung auf die Replikationsaktivität der RNA haben könnte. Darüber hinaus konnten Isken *et al.* die Bindestelle von NF90 in der 3'-UTR der viralen RNA auf die Regionen *polyU-stretch* und SL3 des X-tails eingrenzen (**Abb. 3**, (58)). Somit assoziiert NF90 an Strukturelemente der HCV-RNA, die in der Replikation essentiell involviert sind. Ein weiterer Nachweis der Wirtsfaktorfunktion von NF90 in der Vermehrung von HCV wurde durch Li *et al.* erbracht (59). Bei *in cellulo*-Studien mit infektiösem HCV beobachteten die Autoren eine reduzierte Produktion neuer Viruspartikel unter Bedingungen einer NF90-Depletion. Dies wurde von den Autoren auf eine ineffiziente virale RNA-Replikation unter diesen Bedingungen zurückgeführt. Ein Einfluss der NF90-Depletion auf die Translation der viralen RNA konnte nicht festgestellt werden. In Übereinstimmung mit der von Isken *et al.* aufgestellten Hypothese wurden von Li *et al.* somit weitere Belege erhalten, dass NF90 ein Wirtsfaktor des Lebenszyklus von HCV ist und die virale RNA-Replikation stimuliert (58,59). Mechanistische Hintergründe, wie NF90 dabei die zirkuläre Konformation der HCV-RNA bzw. eine Stimulation der RNA-Replikation induzieren soll, sind weiter unklar.

Es kann festgehalten werden, dass ähnlich der Interaktion von NF90 mit zellulärer RNA auch die Wechselwirkung des Proteins mit viraler RNA zu einer Stimulation oder Repression von Prozessen auf der viralen RNA führen kann. Eine detaillierte Analyse der RNA-Bindung von NF90 als RBP ist daher essentiell um die molekularen Funktionen des Proteins zu verstehen.

1.3 Die RNA-bindenden Motive von NF90

1.3.1 Das *double-stranded RNA binding motif*

Das dsRBM wurde über Sequenzanalysen drei nicht-verwandter Proteine identifiziert (81) und ist ein evolutionär sehr stark verbreitetes RNA-bindendes Element, das in pro- und eukaryotischen sowie viralen Proteinen zu finden ist. Es besteht aus etwa 70 Aminosäuren, die eine Konsensussequenz definieren und eine β -*sandwich* Faltung mit einer $\alpha\beta\beta\alpha$ -Topologie einnehmen (**Abb. 4A**, (82,83)). Aminosäuren der Konsensussequenz werden in Gruppen klassifiziert, die zur korrekten Faltung oder RNA-Bindung beitragen (84). Es werden Typ-A und Typ-B-dsRBMs unterschieden, deren

NMR-Strukturen von dsRBMs (z.T. im Komplex mit RNA) basenspezifische Interaktionen von definierten Aminosäuren festgestellt (84,85,87,88). Im Ergebnis wurde eine sequenz- und formspezifische dsRBM-RNA-Interaktion formuliert, die es dem Motiv ermöglicht ein Raster von acht bis zehn Basenpaaren zu binden (**Abb. 4C**). Aufgrund der eher sequenz-unspezifischen Erkennung von RNAs durch die dsRBMs wird angenommen, dass andere zusätzliche RNA-bindenden Motive des Proteins oder die Interaktion mit anderen Proteinen zur Spezifität der RNA-Bindung beitragen. Da viele der analysierten Strukturen der dsRBMs deren RNA-Interaktion mit unspezifischer, nicht nativer RNA zeigen, lässt das Problem der Sequenzspezifität z.T. noch Fragen offen. In höheren Eukaryoten enthalten dsRBPs in der Regel mindestens zwei Kopien eines dsRBMs, wobei eines davon häufig von der Konsensussequenz abweicht und somit schwächere Bindungsaktivität zeigt (89). Diese Motive dienen oft als Plattform von Protein-Protein-Interaktionen *via* dsRBM-dsRBM- oder dsRBM-Protein-Kontakten (90,91). Strukturelle Daten über eine solche Interaktion sind aktuell kaum vorhanden. Die einzige Information zu dsRBM-vermittelten Protein-Protein-Interaktionen basiert auf der Kristallstruktur zweier dsRBMs des Proteins DGCR8. Der dsRBM-dsRBM-Kontakt jeweils durch die Region 2 der Motive herstellt (92).

1.3.2 Das RGG-Motiv

Neben zwei dsRBMs enthält NF90 als drittes RNA-bindendes Motiv ein C-terminales RGG-Motiv (auch RGG/RG- bzw. RGG-Box genannt, (93)). Es wurde zuerst als Zielsequenz post-translationaler Proteinmethylierung durch *protein arginine methyltransferases* (PRMTs, (94)) identifiziert. Später wurde eine Assoziation des Motivs an Nukleinsäuren festgestellt (95).

Mittels Sequenz-*alignment* verschiedener Proteine und weiterer bioinformatischen Methoden wurde das RGG-Motiv als ein evolutionär hoch konserviertes Element identifiziert (95). Das RGG-Motiv assoziiert im Gegensatz zum dsRBM an nahezu jede Art von Nukleinsäure. Eine weiterführende Analyse definierte dabei mehrere Klassen des RGG-Motivs: tri-RGG-, di-RGG-, tri-RG- und di-RG-Motive (93). Diese Analysen wiesen darauf hin, dass sehr häufig auch aromatische, hydrophobe Aminosäuren innerhalb von RGG-Motiven auftreten. Diese sollen möglicherweise zu einem *base stacking* mit den Nukleobasen beitragen (95). Trotz dieser Hinweise ist bisher unklar, wie RGG-Motive dabei mit den Nukleinsäuren interagieren. Die Eigenschaft von Arginin, über die Guanidino-Gruppe amino-aromatische Wechselwirkungen eingehen zu können, soll dabei fundamental zur Interaktion des RGG-Motivs mit RNA beitragen (96). Die NMR-Strukturanalyse einer RGG-Sequenz des *fragile x mental retardation syndrome-related protein 1* (FMRP) im RNA-gebundenen Zustand zeigt Interaktionen bestimmter Argininreste mit der assoziierten RNA auf (97). Für das RGG-Motiv selbst wurde bereits

früher eine Struktur mit Sekundärstrukturelementen aus repetitiven β -turns beschrieben (98). Im Rahmen dieser Strukturanalyse fiel eine besonders hohe konformationelle Flexibilität der Glycine des RGG-Motivs auf. Aus diesem Grund wird vermutet, dass zusätzliche RNA-bindende Motive des das RGG-Motiv enthaltenden Proteins zur Spezifität der RNA-Bindung beitragen.

Des Weiteren konnte eine Funktion des RGG-Motivs in Protein-Protein-Interaktion identifiziert werden (99). Es konnte gezeigt werden, dass einige Interaktionen von Wirtsfaktoren mit viralen Proteinen durch RGG-Motive vermittelt werden (100,101).

Post-translationale Modifikationen des RGG-Motivs nehmen eine zentrale Rolle in der Funktionalität des Motivs ein (93). Die PRMT-vermittelte Methylierung des Motivs führt zur Erhöhung der Basizität der Guanidinogruppe des Arginins und kann somit die Interaktion des Motivs mit RNA sowie Proteinen modulieren. Für die NFAR-Proteine wurde eine Methylierung des RGG-Motivs der NF110-Isoform beschrieben (102). Für NF90 wurde dagegen eine Phosphorylierung eines im RGG-Motiv lokalisierten Serins identifiziert (28). Im Gegensatz zur Methylierung von RGG-Motiven ist die ursächliche Bedeutung von Phosphorylierung von RGG-Motiven kaum untersucht.

1.4 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten NF90 und NF45 sowie deren Proteinkomplex NF90-NF45 vergleichend *in vitro* und deren Funktion als Wirtsfaktoren in der Amplifikation des Genoms des Hepatitis-C-Virus weiter charakterisiert werden. Dazu sollten nach der heterologen rekombinanten Herstellung der Proteine zunächst deren proteinbiochemischen und biophysikalischen Eigenschaften, insbesondere die molekularen Mechanismen der Nukleinsäure-Bindung, untersucht werden. Dabei sollten die Funktionen der RNA-bindenden Motive und die Rolle der Komplexbildung NF90-NF45 aufgeklärt werden. Schlussendlich sollte die Wirtsfaktor-Funktion der Proteine in einem *in vitro*-System definiert werden, um deren Einfluss auf die (-)-Strang-RNA-Synthese durch die HCV RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B darzustellen. Auf Grundlage der Ergebnisse sollte der molekulare Mechanismus aufgeklärt werden, wie die untersuchten Proteine einen Einfluss auf die virale Replikation ausüben.

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien, Puffer und Verbrauchsmaterial

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 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 entsprechenden Textstellen angegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden die vom Hersteller bereitgestellten Puffer verwendet.

Eine Liste der verwendeten Plasmide und Oligonukleotide für die PCR ist im Anhang aufgeführt (s. Anhang 7.1). Die Anzucht und Ernte von Bakterienkulturen erfolgte nach Standardmethoden, wenn nicht anders angegeben (s. Anhang 7.1.1)

2.2 Molekularbiologische Arbeiten mit RNA

2.2.1 *In-vitro*-Transkription

Die *in-vitro*-Transkription wurde zur Herstellung von RNAs für den Polymerase-Assay und Filterbindungs-Assay (s. Anhang 7.1.2) genutzt. Als Templat dienten PCR-Produkte, die einen T7-Promotor enthielten. Der Standard-Ansatz (25 μ L) setzte sich folgendermaßen zusammen:

	<u>Stammlösung</u>	<u>im Ansatz</u>
Transkriptionspuffer (Agilent Technologies)	5x	1x
rNTPs (Jena Bioscience)	10 mM	1 mM
DTT	100 mM	10 mM
Ribolock (ThermoFisher Scientific)	40 U/ μ L	1 U/ μ L
PCR-Produkt		200 ng
T7 RNA-Polymerase (Agilent Technologies)	50 U/ μ L	2 U/ μ L
H ₂ O (RNase-frei, Sigma)		ad 25 μ L

Die Inkubationszeit betrug 3 h bei 37 °C. Anschließend wurde die Templat-DNA durch Zugabe von 10 U DNase I (Roche, Mannheim) und Inkubation für 1 h bei 37 °C abgebaut. Das Transkript wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion aufgearbeitet. Dazu wurde der *in-vitro*-Transkriptionsansatz auf 200 μ L mit RNase-freiem-Wasser (Sigma) aufgefüllt und mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)

extrahiert. Es folgte ein weiterer Extraktionsschritt der wässrigen Phase mit 1 Volumen Chloroform und anschließend die Präzipitation des Materials durch die Zugabe von 2.36 Volumen 100%igem Ethanol und 0.18 Volumen 6 M Ammoniumacetat für 10 min auf Eis. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (16000 g, 4 °C, 30 min) erhalten. Es schlossen sich Waschung (800 µL 75 % Ethanol) und Lufttrocknung des RNA-Pellets an, bevor es in einem geeignetem Volumen Wasser (RNase-frei, Sigma) resuspendiert wurde. Konzentration und Qualität der Transkription wurden spektrometrisch bzw. durch Formaldehyd-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.2 Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese / Größenstandards

Zur Analyse der Produkte der *in-vitro*-Transkription wurden Formaldehydgele verwendet. Dazu wurde 1 – 1.5 % (w/v) Agarose in MOPS-Puffer (20 mM MOPS, pH 7.0, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA) in der Hitze gelöst, nach Abkühlen mit 2.7 mL Formaldehyd / 100 mL Gel versetzt und gegossen. Als Laufpuffer diente ebenfalls der MOPS-Puffer. Zu analysierende Proben wurden 1:1 mit 2x RNA-Ladepuffer (ThermoFisher Scientific) gemischt, für 5 min bei 75 °C erhitzt und für 2 min auf Eis aufbewahrt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V. Nach der Auftrennung erfolgte die Detektion der RNA mittels UV-Licht (UV-Transilluminator, UXT-30M-8E, 312nm, Biostep GmbH, Jansdorf) und Dokumentationsanlage (EDAS 290, Kodak, Rochester, USA)

Als Größenstandards wurden RiboRuler *High Range RNA Ladder* oder RiboRuler *Low Range RNA Ladder* (beide ThermoFisher Scientific, Bonn) verwendet.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von RNAs wurde spektrometrisch durch die Absorption bei 260 nm (A_{260}) bestimmt. Als Spektrometer dienten das BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) oder V-550 Spectrophotometer (Jasco, Tokyo, Japan). Für die Konzentrationsbestimmung von *in-vitro*-Transkriptionsprodukten wurde angenommen, dass eine A_{260} von 1 etwa 40 µg/mL entspricht. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des Quotienten A_{260}/A_{280} , der eine Abschätzung über Verunreinigungen mit Proteinen ermöglicht. Quotienten < 1.7 deuten Verunreinigungen in der Präparation an. Für synthetische Oligonukleotide wurde der für die Nukleinsäure spezifische Extinktionskoeffizient zur Berechnung genutzt.

2.3 Molekularbiologische Arbeiten mit DNA

2.3.1 Transformation von bakteriellen Zellen nach der CaCl₂-Methode

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Calciumchloridmethode hergestellt (103). Eine Übernachtskultur des zu behandelnden Stammes wurde 1:100 mit frischem LB-Medium (50 mL) verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3 angezogen. Es folgte eine Inkubation der Kultur für 10 min auf Eis und anschließende Zentrifugation (10 min, 9000 g, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 10 mL eiskalter 0.1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach erneuter Resuspension des Pellets in 2 mL gleicher Lösung wurde die Suspension auf 25 % (v/v) Glycerin eingestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Transformation der kompetenten Zellen erfolgte nach Sambrook *et al.* (104). Es wurde ein Aliquot der Zellen mit entsprechender DNA (Plasmid, Vektor) gemischt, für 20 min auf Eis belassen und danach einem Hitzeschock unterzogen (30-40 s, 42 °C). Anschließend wurde die Suspension mit frischem LB-Medium versetzt. Es folgte eine Regenerationsphase der Bakterien für 1 h schüttelnd bei 37 °C. Abschließend wurde eine geeignete Menge der transformierten Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.2 Miniplasmidpräparation

Sollten Plasmide präpariert werden, die zur Weiterbehandlung mit Restriktionsendonukleasen bestimmt waren oder als Templat für die PCR dienen sollten, wurde zur Isolation ein Protokoll nach Sambrook *et al.* verwendet (104). Die Anzucht der entsprechenden Zellen erfolgte in 3 mL mit Antibiotikum versetztem LB-Medium als Suspensionskultur über Nacht. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation. Das so erhaltene Zellpellet wurde in 150 µL Lösung A (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.1 mg/mL RNaseA) resuspendiert und durch Zugabe von 150 µL Lösung B (0.2 M NaOH, 10 g/L SDS) lysiert. Nach 5-minütiger Inkubation wurde der Ansatz mit 150 µL Lösung C (3 M Kaliumacetat pH 5.3) versetzt und für 15 min auf Eis gelagert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (10 min, 16000 g, 4 °C) sedimentiert und abgetrennt. Die Präzipitation der DNA in der wässrigen Phase erfolgte durch Zugabe von 2.5 Volumen 100% Ethanol. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde das Präzipitat durch Zentrifugation (10 min, 16000 g, 4 °C) erhalten, mit 70% Ethanol gewaschen und abschließend in einer geeigneten Menge H₂O_{dd} resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Plasmidpräparationen, die einen höheren Reinheitsgrad aufweisen mussten, wurden mittels kommerziellen Kits erhalten. Es kamen das *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*

(ThermoFisher Scientific, Bonn) und zur Präparation größerer Mengen das *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega, Madison, USA) zum Einsatz. Die Anweisungen der Hersteller wurden befolgt.

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese / Größenstandards

Für analytische bzw. präparative Zwecke wurden Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Der Anteil an Agarose variierte je nach Fragmentgröße zwischen 0.5 – 2.5 % (w/v). Für das Gel wurde eine entsprechende Menge in der Hitze in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 7.6, 1 mM EDTA) gelöst und nach Abkühlen mit 0.25 mg/L Ethidiumbromid versetzt. Vor dem Beladen des Gels wurde zu den Proben 6x DNA *loading dye* (ThermoFisher Scientific) gegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V. Nach der Auftrennung erfolgte die Detektion der DNA mittels UV-Licht (UV-Transilluminator, UXT-30M-8E, 312nm, Biostep GmbH, Jansdorf) und Dokumentationsanlage (EDAS 290, Kodak, Rochester, USA). Bei präparativen Trennungen schloss sich eine Isolation der Bande und Elution aus dem Gel an (s. 2.3.7).

2.3.4 DNA-Sequenzierung

Nach Konstruktion neuer Plasmide wurden diese auf ihre Richtigkeit durch Sequenzierung überprüft. Dazu wurden die kommerziellen Anbieter Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und SEQLAB (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) genutzt.

2.3.5 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die analytische und präparative Restriktion von DNA erfolgte mittels kommerziell verfügbarer Enzyme. Reaktionen wurden entsprechend den Empfehlungen der Hersteller unter Verwendung mitgelieferter Puffer angesetzt. Die Enzyme stammten von ThermoFisher Scientific (Bonn) bzw. New England BioLabs GmbH (Frankfurt/Main).

2.3.6 Reinigung von DNA

PCR-Produkte und präparative Restriktionen wurden über das *PCR Purification Kit* (ThermoFisher Scientific) gereinigt. Die Anweisungen des Herstellers wurden befolgt.

Als weitere Methode zur Reinigung und Konzentrierung von DNA wurde die Phenol/Chloroform-Extraktion benutzt. Zunächst wurde der Ansatz mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Ansätze, die kleiner als 200 µL waren, wurden vor dem ersten Extraktionsschritt auf 200 µL mit H₂O_{dd} aufgefüllt. Die wässrige Phase wurde nach der Extraktion entnommen und einem weiteren Extraktionsschritt mit 1 Volumen Chloroform unterzogen. Anschließend wurden der wässrigen Phase 2.5 Volumen 100 % Ethanol und 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH

5.3) beigemischt und die DNA für 30 min bei -20 °C präzipitiert. Durch Zentrifugation erfolgte die Sedimentation der DNA. Abschließend wurde das Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen und in H₂O_{dd} resuspendiert. Die DNA-Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.7 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Nach präparativen Agarose-Gelelektrophoresen wurden entsprechende Fragmente aus dem Gel isoliert und unter Verwendung des *GeneJET Gel Extraction Kit* (ThermoFisher Scientific) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Nach erfolgter Präparation wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

2.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden in einem molaren Verhältnis von Vektor zu DNA-Fragment von 1:5 in einem Volumen von 20 µL unter Verwendung von T4 DNA Ligase und Ligationspuffer durchgeführt (beides ThermoFisher Scientific, Bonn). den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt.

2.3.9 Phosphorylierung von DNA/RNA

Die 5'-Phosphorylierung von PCR-Produkten bzw. zur radioaktiven Markierung von RNAs erfolgte mittels T4-Polynukleotidkinase (ThermoFisher Scientific, Bonn) den Angaben des Herstellers entsprechend.

2.3.10 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kam analytisch und präparativ zum Einsatz. Es wurde die *Phusion*-Polymerase (Finnzymes, Vantaa, Finnland) verwendet. Der Standard-Ansatz für sämtliche PCRs setzte sich wie folgt zusammen (Primer s. Anhang 7.1):

	<u>Stammlösung</u>	<u>im Ansatz</u>
<i>Phusion</i> HF-Puffer	5x	1x
dNTPs (Roche)	je 10 mM	je 0.2 mM
Primer (<i>forward</i> und <i>reverse</i>)	je 10 μ M	0.5 μ M
Templat		x μ L
<i>Phusion</i> -Polymerase	2 U/ μ L	0.02 U/ μ L
H ₂ O _{dd}		<u>ad 50 μL</u>

Folgendes Temperaturprotokoll wurde verwendet:

1. initiale Denaturierung	98 °C	30 s
2. Denaturierung	98 °C	30 s
3. <i>annealing</i>	60 °C	30 s
4. <i>extension</i>	72 °C	10 s – 4 min
	Schritt 2 - 4: 30 Zyklen	
5. Nachsynthese	72 °C	5 min
Ende	4 °C	

Einzige Ausnahme der oben genannten Bedingungen stellte die Generierung der Genvariante NF90 Δ C46 dar. Aufgrund des hohen GC-Anteils der Primer wurde nur 0.1 μ M als Endkonzentration der Primer verwendet und ein modifiziertes Temperaturprotokoll mit kombinierter *annealing* und *extension* Phase angewandt.

1. initiale Denaturierung	98 °C	4 min
2. Denaturierung	98 °C	30 s
3. <i>annealing/extension</i>	72 °C	4 min
	Schritt 2 - 3: 30 Zyklen	
5. Nachsynthese	72 °C	5 min
Ende	4 °C	

2.3.11 Ortsgerichtete Mutagenese

Diese Methode diente der Mutagenese gewünschter Gensequenzen. Über Standard-PCR mittels mutagenen Primern, die ein oder mehrere definierte Nukleotidsubstitutionen trugen, wurden die Veränderungen in der Gensequenz realisiert (s. Anhang Tabelle A - 3). Als Templat fungierten Plasmide, die das entsprechende Zielgen (Insert) bereits enthielten. Somit erfolgte die Amplifikation des gesamten Plasmids mit den gezielten Substitutionen. Im Falle der Konstruktion der NF90-Genvarianten, die für NF90 Δ C46 und NF90 Δ C63 kodieren, wurde ein zusätzliches *amber*-Stopcodon an der gewünschten Stelle eingebaut, um eine vorzeitige Translationstermination zu erreichen. Nach der PCR erfolgte die Restriktion des parentalen Plasmids durch *DpnI* (ThermoFisher Scientific, Bonn). Das so generierte neue Plasmid konnte direkt für die Transformation eingesetzt werden.

2.3.12 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde spektrometrisch durch die Absorption bei 260 nm bestimmt (A_{260}). Als Spektrometer dienten das BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) oder V-550 *Spectrophotometer* (Jasco, Tokyo, Japan). Es wurde angenommen, dass eine A_{260} von 1 etwa 50 $\mu\text{g/mL}$ entspricht. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des Quotienten A_{260}/A_{280} , der eine Abschätzung über Verunreinigungen mit Proteinen ermöglicht. Quotienten < 1.7 deuten Verunreinigungen in der Präparation an.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Präparation der rekombinanten Proteine

Alle Säulenchromatographien wurden an dem FPLC (*fast protein liquid chromatography*) System ÄKTA Purifier (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Der Erfolg einzelner Reinigungsschritte wurde über SDS-PAGE analysiert. Die Identifikation der präparierten Proteine erfolgte mittels Massenspektrometrie und Western Blot.

2.4.1.1 Biomasseproduktion

Die entsprechenden Expressionsplasmide wurden in den *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus-RP transformiert und für die Anzucht verwendet. Die Produktion der Biomasse zur Herstellung der rekombinanten Proteine erfolgte über eine Anzucht im 6 x 800 mL Schüttelkolben-Maßstab oder über Fermentation.

Schüttelkolben

Es wurde eine Vorkultur von 100 mL in LB-Medium unter Zusatz entsprechender Antibiotika über Nacht bei 37 °C schüttelnd angezogen. Die 6 x 800 mL LB-Medium ohne Antibiotikum wurden mit der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0.1 inokuliert und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 erfolgte die IPTG-vermittelte (1 mM in der Kultur) Induktion der Genexpression und nach weiteren 3 – 4 h Inkubation die Zellernte per Zentrifugation (6000 g, 4 °C, 20 min). Erhaltene Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -40 °C gelagert.

Fermentation

Die *fed-batch*-Prozesse (10 L-Maßstab) erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Sebastian Schäpe (ehem. MLU Halle-Wittenberg) in einem Biostat ED Reaktor.

Das 6 L-Komplexmedium des Fermenters setzte sich aus 60 g/L Hefeextrakt, 0.06 M K₂HPO₄, 6 mM MgSO₄, 0.03 M Glukose und 0.01 M NH₄Cl zusammen und wurde direkt im Bioreaktor sterilisiert. Nachfolgend wurde das Medium auf die entsprechende Konzentration des Antibiotikums eingestellt. Als *feeding*-Lösung diente eine Mischung aus Glycerin und Hefeextrakt mit jeweils 300 g/L.

Es wurde eine Vorkultur von 2 L LB-Medium unter Zusatz entsprechender Antibiotika über Nacht bei 37 °C angezogen und anschließend die Bakterien über Zentrifugation (6000 rpm, 20 min) geerntet sowie in 20 mL frischem LB-Medium resuspendiert. Das im Fermenter vorbereitete Medium wurde mit der gesamten Vorkultur inokuliert und bei 37 °C mit min. 30 % Sauerstoffsättigung und bei pH 7.0 angezogen. Ab einer OD₆₀₀ von 10 startete die Software-gesteuerte Zugabe der *feeding*-Lösung mittels eines vorher definierten Protokolls. Nach ca. 10 h Inkubation wurde der Fermenter innerhalb von 1 h auf 30 °C abgekühlt, danach erfolgte die Induktion der Expression mittels 1 mM IPTG. Nach weiteren 9 – 12 h erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (4000 g, 4 °C, 30 min). Die erhaltenen Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -40 °C gelagert.

2.4.1.2 Rekombinante Herstellung von NF90 und Varianten

Das Protokoll zur Reinigung des rekombinanten NF90 konnte auf alle Protein-Varianten ohne Modifikation übertragen werden. Das Protein befand sich nach der Genexpression in der *inclusion-body*-Fraktion von *E. coli*. Die Isolation der *inclusion bodies* erfolgte modifiziert nach Rudolph *et al.* (105). Die eingefrorenen Zellen wurden in Tris/HCl pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF vollständig resuspendiert. Dabei wurden pro 5 g Feuchtmasse an Zellen 25 mL Resuspensionspuffer eingesetzt. Anschließend wurde die Suspension auf 1 mg/mL Lysozym eingestellt und für mindestens 1 h bei

Raumtemperatur rührend inkubiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels *french press* (Gaulin Homogenisator, APV Homogenisator GmbH, Lübeck). Nach Einstellen der Lösung auf 5 mM MgCl₂ folgte eine Behandlung mit 10 µg / mL DNaseI (Roche) bei Raumtemperatur rührend für 30 min. Die Lösung wurde anschließend mit 0.5 Volumen 6 % (v/v) Triton X-100, 60 mM EDTA, 1.5 M NaCl versetzt und 30 min bei 8 °C gerührt. Die *inclusion bodies* wurden durch Zentrifugation bei 31000 g, 10 min, 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Es schlossen sich Waschschriffe mit 0.1 M Tris/HCl pH 7.0, 20 mM und 0.1 M Tris/HCl pH 7.0 an. Dazu wurden die *inclusion bodies* in dem jeweiligen Waschpuffer mittels UltraTurrax vollständig resuspendiert und anschließend durch Zentrifugation (31000 g, 10 min, 4 °C) wieder pelletiert. Die gewaschenen *inclusion bodies* wurden in einem 1:20 Verhältnis (Feuchtmasse Zellen : Puffervolumen) in 30 mM Natriumphosphat pH 7.0, 100 mM NaCl, 8 M Harnstoff, 10 mM DTT mittels UltraTurrax resuspendiert und über Nacht unter Rühren resolubilisiert. Es folgte die Klärung der Lösung durch Ultrazentrifugation bei 40000 rpm und 10 °C (Rotor Ti45, Beckmann) für 1 h, bevor der Überstand über eine Kationenaustauschchromatographie (SP-Sepharose 16/10, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) gereinigt wurde. Die Säule wurde mit maximal 200 mL der Proteinlösung pro Lauf beladen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen linearen Ionenstärkegradienten (28 % Puffer-B / 6 Säulenvolumen). Die vereinigten NF90-Frakfionen wurden entweder direkt weiter

Puffer A	30 mM Natriumphosphat pH 7.0 100 mM NaCl 8 M Harnstoff 1 mM DTT	Puffer B	30 mM Natriumphosphat pH 7.0 1 M NaCl 8 M Harnstoff 1 mM DTT
----------	---	----------	--

verarbeitet oder zur Lagerung auf 6 M GuHCl eingestellt.

Die anschließende Renaturierung des Proteins erfolgte mittels *rapid-dilution-pulse refolding*-Technik. Dazu wurde die proteinhaltige Lösung (max. 30 mL) langsam in 350 mL stark rührenden (ohne Blasenbildung) Renaturierungspuffer [50 mM Natriumphosphat pH 7.2, 100 mM NaCl, 500 mM Arginin, 5 % (v/v) Glycerin, 10 mM DTT] mittels einer Peristaltik P1-Pumpe (1x Geschwindigkeit, Stufe 0.5; Pharmacia, Uppsala, Schweden) getropft. Die durch die Verdünnung erreichte Proteinkonzentration betrug maximal 0.1 mg/mL. Nach der Rückfaltung wurde die Lösung gegen 5 L Arginin-freien Renaturierungspuffer dialysiert und über eine Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie (HiTrap Heparin HP 5ml, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) konzentriert. Die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten (75 % Puffer B).

Puffer A	50 mM Natriumphosphat pH 7.2 100 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerin 1 mM DTT	Puffer B	50 mM Natriumphosphat pH 7.2 2 M NaCl 5 % (v/v) Glycerin 1 mM DTT
----------	--	----------	---

Die konzentrierte Proteinlösung wurde einer finalen Größenausschlusschromatographie (HiLoad 26/60 Superdex 200, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) unterzogen. Als Laufpuffer diente NF90-Puffer [50 mM Natriumphosphat pH 7.2, 100 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin, 1 mM TCEP]. Die entsprechenden Fraktionen wurden konzentriert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Konzentration wurde spektrometrisch über die Absorption bei 280 nm bestimmt.

2.4.1.3 Rekombinante Herstellung von NF45

Die Reinigung von NF45 erfolgte durch PD Dr. Ralph Golbik und Dipl.-Biochemiker Paul Knick nach einem von ihnen etablierten Protokoll.

2.4.1.4 Rekonstitution des Heterodimer NF90-NF45

Zur Herstellung des heterodimeren Komplexes NF90-NF45 bzw. deren Varianten wurden äquimolare Mengen (maximal 10 µM Endkonzentration) der denaturierten Proteine, NF90 nach Kationenaustauschchromatographie bzw. NF45 nach NiNTA-Affinitätschromatographie, in einem Gesamtvolumen von maximal 30 mL gemischt. Die Rückfaltung sowie nachfolgende Präparationsschritte des Komplexes erfolgten analog zur Herstellung des NF90. Die Konzentration wurde spektrometrisch ermittelt.

2.4.1.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der präparierten rekombinanten Proteine wurde spektrometrisch am UV/VIS Spektrometer V-550 (Jasco, Groß-Umstadt) ermittelt. Es wurden Absorptionsspektren im Bereich von 240 – 340 nm aufgezeichnet. Durch Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes und dem Extinktionskoeffizienten der Proteine (Tabelle 3) wurde die Konzentration berechnet.

Tabelle 3. Extinktionskoeffizienten der rekombinanten Proteine

Protein	ϵ_{280} ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Protein	ϵ_{280} ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
NF90wt und Varianten	44850	NF90wt-NF45 und Varianten	67850
NF90 Δ C46, NF90 Δ C63	33000	NF90 Δ C46-NF45, NF90 Δ C63-NF45	56000
NF45	23000		

2.4.1.6 Konzentrierung von Proteinen

Die Konzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mit Hilfe von VivaSpin-Röhrchen (Sartorius, Göttingen) mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa (NF90, NF45) oder 30 kDa (NF90-NF45) nach den Angaben des Herstellers.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Coomassie- und Silberfärbung

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen einer Lösung wurde ein diskontinuierliches und denaturierendes System nach Laemmli benutzt (106). Für die Elektrophorese bestimmte Proben wurden vor dem Beladen mit einem gleichen Teil 2x SDS-Ladepuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und 2 min auf Eis gestellt. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke von 40 mA.

Zur Visualisierung der durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennten Proteine wurde das Gel für 30 min in Färbelösung [0.5 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250, 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure] leicht schwenkend inkubiert und der Hintergrund anschließend durch Inkubation in Entfärber [30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure] ausreichend entfärbt.

Sammelgel	62.5 mM Tris/HCl pH 6.8 4 % (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid (37.5:1) 0.05 % (w/v) SDS
Trenngel	375 mM Tris/HCl pH 8.8 10 % (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid (37.5:1) 0.1 % (w/v) SDS
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris pH 8.3 0.19 M Glycin 0.1 % (w/v) SDS
SDS-Ladepuffer	10 mM Tris/HCl pH 6.8 20 % (v/v) Glycerin 6 % (w/v) SDS 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol 0.01 % (w/v) Bromphenolblau

Zur Detektion geringer Mengen an Proteinen ($< 3 \mu\text{g}$) im SDS-PA-Gel wurde eine Silberfärbung der Proteine angewandt. Das Gel wurde als erstes in 50 % (v/v) Aceton, 1.25 % (w/v) Trichloressigsäure für 5 min fixiert. Anschließend folgten drei Waschschrte mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ (5 s, 5 min, 5 s) und eine fünfminütige Inkubation in 50 % (v/v) Aceton. Das Gel wurde in 0.33 mg/mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ für 1 min vorbehandelt und anschließend für 8 min in [160 mg AgNO_3 , 600 μL 37% (v/v) Formaldehyd in 60 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$] imprägniert. Folgend wurde das Gel erneut dreimal kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gewaschen. Die Entwicklung des Gels erfolgte durch Behandlung mit [1.2 g Na_2CO_3 , 2 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 25 μL 37% (v/v) Formaldehyd in 60 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$] solange bis eine entsprechende Intensität der sichtbar werdenden Banden erreicht war. Als Stopplösung diente 5 % (v/v) Essigsäure.

2.4.3 Analytische Ultrazentrifugation

Sedimentationsgeschwindigkeits- sowie Sedimentationsgleichgewichtsanalysen (40000 bzw. 8000 rpm) wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge XL-A (Beckman Coulter, Brea, USA), die mit einem An50Ti Rotor und Doppelsektorzellen bestückt war, bei 20 °C in NF90-Puffer durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 4 – 6 µM. Als spezifisches Partikelvolumen wurde 0.73 mL/g angenommen. Die Durchführung und Auswertung erfolgte durch PD Dr. Hauke Lilie (MLU Halle-Wittenberg) mittels Software Sedfit (107).

2.4.4 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse erfolgte durch Dr. Angelika Schierhorn (MLU Halle-Wittenberg). Dazu wurde das zu analysierende Protein über eine SDS-PAGE aufgetrennt, die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten, vorbehandelt und im Gel tryptisch verdaut. Anschließend wurde die Probe an einem Ultraflex-II TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) mit einer MALDI-Quelle analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Software Flex Control 2.4, Flex Analysis 2.4 und Biotoools 3.0. Alle Arbeitsschritte der massenspektrometrischen Analyse der Proteine dieser Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Angelika Schierhorn durchgeführt.

2.5 Methoden zur strukturellen Analyse von NF90

2.5.1 Circular dichroismus

Trifft zirkulär polarisiertes Licht auf ein chirales Molekül mit Chromophor, kann die Änderung der Eigenschaften des Lichtes spektroskopisch verfolgt werden (Circular dichroismus, CD). Bei Proteinen wird der CD der Peptidbindung zu Strukturaufklärungszwecken ausgenutzt. Die verschiedenen Sekundärstrukturelemente von Proteinen zeigen einen charakteristischen CD im Bereich der Absorption der Peptidbindung von 190 – 250 nm, dem Fern-UV. Im Nah-UV (250 – 300 nm) können Informationen über die Tertiärstruktur des Proteins gewonnen werden.

Alle Messungen wurden am J-810 *Spectropolarimeter* (Jasco, Groß-Umstadt) in NF90-Puffer bei 20 °C durchgeführt. Der Fern-UV CD wurde in Küvetten (106-QS 0.1 mm, Hellma Analytics, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 0.1 mm und einer Proteinkonzentration von 10 µM durchgeführt. Im Falle der Binärkomplexe RNA-NF90 wurde die jeweilige RNA in äquimolarem Verhältnis zum Protein eingesetzt. Erhaltene Spektren wurden Puffer-korrigiert und ggf. mittels Spectra Manager I Software Jasco geglättet. Mit Ausnahme der Binärkomplexe wurden die erhaltenen Elliptizitäten nach folgender Gleichung normiert.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot F \cdot 3300 \cdot \frac{M}{N}}{c \cdot d} \quad (\text{Gleichung 1})$$

$[\Theta]_{\text{MRW}}$	<i>mean residue weight ellipticity</i>
Θ	gemessene Elliptizität (mdeg)
F	Eichgröße des Geräts (142.5 / 5610051)
M	Molekulargewicht des Proteins
N	Anzahl der Aminosäuren des Proteins
c	Proteinkonzentration (mg / mL)
d	Schichtdicke der Küvette (cm)

2.5.2 Intrinsische Fluoreszenz

Die aromatischen Aminosäuren (Phe, Tyr, Trp) besitzen charakteristische Fluoreszenzeigenschaften. Dabei wird in intrinsische (Apoprotein, Proteinkomponente) und extrinsische (Holoprotein, Cofaktoren) Fluoreszenz von Proteinen unterschieden. Durch Anregung des Proteins bei 280 oder 295 nm wird die Tyrosin- bzw. Tryptophan-Fluoreszenz angeregt, die im Bereich von 290 bis 400 nm detektiert werden kann. Da die Fluoreszenz von einigen Parametern wie der Mikroumgebung (Polarität) und der Temperatur abhängt, kann diese photochemische Eigenschaft der Proteine als analytische Größe einer Reaktion dienen und strukturelle Informationen liefern.

Alle intrinsischen Fluoreszenzspektren der in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden am Fluoromax-4 *Spectrofluorometer* (HORIBA Jobin Yvon, Bensheim) in NF90-Puffer mit der im Text bestimmten Konzentration an Natriumchlorid und bei 20 °C aufgezeichnet. Alle Spektren wurden Puffer-korrigiert und ggf. auf die Fluoreszenz bei 343 nm oder die Proteinkonzentration normiert.

2.5.3 Chemische De- und Renaturierung von NF90

Die thermodynamische Stabilität der Proteine dieser Arbeit wurde mittels chemischer De- bzw. Renaturierung ermittelt. Die Denaturierung wurde durch Inkubation von je 3 µM des zu analysierenden nativen Proteins in verschiedenen Konzentrationen eines Denaturansgemisches (äquimolares Gemischs aus je 5 M GuHCl bzw. Harnstoff) in NF90-Puffer für 24 h bei 8 °C induziert (finales Volumen 250 µL). Die einzelnen Pufferbedingungen wurden mit einem *Diluter* (Hamilton) präpariert. Als Messsignal diente der CD bei 225 nm bei 20 °C, der am Jasco J-810 *Spectropolarimeter* (Jasco, Groß-Umstadt) verfolgt wurde. Jeder Messpunkt wurde für 120 s gemessen und gemittelt. Die erhaltenen Daten wurden in den Anteil entfaltenes Protein konvertiert und gegen die Denaturanskonzentration aufgetragen. Zur Quantifizierung wurde ein Drei-Zustandsmodell $U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$ (U – denaturierter Zustand, I - Intermediat, N-

nativer Zustand) angewendet, das die Akkumulation eines Intermediats im Gleichgewicht berücksichtigt (108). Für die Renaturierung wurde das native Protein zunächst in 10 M Denaturansgemisch zur vollständigen Entfaltung inkubiert. Anschließend wurde analog der Denaturierung verfahren.

$$F_{\text{obs}} = \frac{F_N + F_I \cdot e^{-\frac{\Delta G_{N-I}^0 - m_{N-I}[D]}{RT}} + F_U \cdot e^{-\frac{\Delta G_{N-I}^0 - m_{N-I}[D]}{RT}} \cdot e^{-\frac{\Delta G_{I-U}^0 - m_{I-U}[D]}{RT}}}{1 + e^{-\frac{\Delta G_{N-I}^0 - m_{N-I}[D]}{RT}} + e^{-\frac{\Delta G_{N-I}^0 - m_{N-I}[D]}{RT}} \cdot e^{-\frac{\Delta G_{I-U}^0 - m_{I-U}[D]}{RT}}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

U, I, N Indizes des denaturierten (U), intermediären (I) und nativen (N) Zustands

F_x Amplitude des Zustands x

f_x Anteil des Proteins in Zustand x

m Anstieg des Übergangs am Transitionspunkt x - y

R Gaskonstante

T Temperatur

ΔG_{x-y}^D Änderung der freien Enthalpie des Übergangs x - y

2.6 Bestimmung thermodynamischer Parameter der Nukleinsäure-Bindung von NF90

2.6.1 Fluorophor-markierte Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Fluorophor-markierten Oligonukleotide wurden von IBA (Göttingen) bezogen (Tabelle 4).

Tabelle 4. Oligonukleotide zur funktionalen Charakterisierung von NF90

Name*	5' -> 3' Sequenz**	5'-Fluorophor
ssRNA-1	CUA AGA UGC UCG CUG C	FAM-EX
dsRNA-1	5' CUA AGA UGC UCG CUG C 3' 3' UCU ACG AGC GAC G 5'	FAM-EX
dsRNA-2	5' CUA AGA UGC UCG CUG CCA AUG AAC GAC CCU CCC UAA 3' 3' UCU ACG AGC GAC GGU UAC UUG CUG GGA GGG AUU 5'	FAM-EX
HsR	5' AUA UAU AUA UUA UAU AUA UAU AAA AAU AAA UAU CUC UAU UUU AUA UAU AUA AAA UAU AUA UAU 3'	FAM-EX
HCV-SL3(+)*	UGU UGG CUC CAU CUU	Cy5
HCV-SL3(-)*	AAG AUG GAG CCA ACA	Cy3
HCV-SL3- <i>bubble</i> (-)*	AAG <u>AUA</u> <u>ACA</u> CCA ACA	Cy3
HCV-SL3- <i>fork</i> (-)*	<u>UUA</u> <u>CUG</u> GAG CCA ACA	Cy3
RaSc(+)*	AAG UGU AAA AUC UCU AGU AGU	Cy5
RaSc(-)*	ACU ACU AGA GAU UUU ACA CUU	Cy3
RaSc- <i>bubble</i> (-)*	ACU ACU <u>AGC</u> <u>ACC</u> <u>CCU</u> ACA CUU	Cy3
RaSc- <i>fork</i> (-)*	<u>CAC</u> <u>CAC</u> AGA GAU UUU ACA CUU	Cy3

* (+) und (-) Stränge einer Gruppe können einen Doppelstrang bilden. Entsprechend nicht-komplementäre Bereiche sind unterstrichen.

2.6.2 Fluorimetrische Quantifizierung der RNA-Protein-Interaktion

Alle fluorimetrischen Gleichgewichtstitrationen der synthetischen Fluorophor-markierten RNAs (Tabelle 4) wurden am Fluoromax-4 (HORIBA Jobin Yvon, Bensheim) durchgeführt. Die Messungen erfolgten in NF90-Puffer und bei 20 °C. Die Anregung des Fluorophors (FAM-EX) erfolgte bei 491 nm und die Emission wurde bei 515 nm detektiert. Steigende Mengen des Proteins wurden zur vorgelegten RNA titriert und nach Einstellen des Gleichgewichts die Fluoreszenz gemessen. Erhaltene Intensitäten wurden

um die Volumenänderung korrigiert und auf die Ausgangsfluoreszenz der freien RNA normiert.

2.6.2.1 Aktive Zentren-Titration

Steigende Konzentrationen an NF90 bzw. NF90-NF45 wurden zu 1 μM vorgelegter RNA titriert. Die Stöchiometrie wurde graphisch aus dem Schnittpunkt der Geraden, die den maximalen Anstieg der Fluoreszenzänderung darstellt, mit der x-Achse bestimmt.

2.6.2.2 Bestimmung der Dissoziationskonstante von RNA-Protein-Komplexen

Steigende Konzentrationen des Proteins wurden zu 25 – 300 nM vorgelegter RNA titriert. Korrigierte und normierte Fluoreszenzintensitäten wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und mittels folgender Gleichung ausgewertet.

$$\Delta F = 1 + \gamma \cdot \frac{\left([\text{RNA}]_0 + [\text{Protein}]_0 + K_D\right) - \sqrt{\left([\text{RNA}]_0 + [\text{Protein}]_0 + K_D\right)^2 - 4 \cdot [\text{RNA}]_0 \cdot [\text{Protein}]_0}}{2 \cdot [\text{RNA}]_0} \quad (\text{Gleichung 3})$$

ΔF	Änderung der Fluoreszenz
γ	Amplitude des Fluoreszenzsignals
$[\text{RNA}]_0$	totale RNA - Konzentration
$[\text{Protein}]_0$	totale Proteinkonzentration
K_D	Dissoziationskonstante

2.6.2.3 Analyse der Protein-RNA-Interaktion nach einer linearen-freien-Enthalpie-Beziehung

Die Dissoziationskonstanten der Protein-RNA-Komplexe wurden bei verschiedenen Ionenstärken bzw. Harnstoffkonzentrationen quantifiziert. Dafür wurden die Proteinlösungen und der NF90-Puffer auf angegebene Konzentrationen an NaCl bzw. Harnstoff eingestellt und anschließend die Titration begonnen. Die Abhängigkeit der Assoziation zwischen RNA und Protein von der NaCl- bzw. Harnstoff-Konzentration wurde anhand folgender Gleichungen bezüglich einer linearen freien Enthalpie-Beziehung evaluiert (109,110). Der m -Wert wird in dieser Arbeit als Bindungsmodus interpretiert.

$$\Delta G_p^0 = -RT \cdot \ln K_A$$

$$\Delta G_p^0 = \Delta G^0 - m \cdot [P]$$

$$\ln K_A = \frac{m}{RT} \cdot [P] - \frac{\Delta G^0}{RT} \quad (\text{Gleichung 4})$$

ΔG_p^0 Änderung in der freien Enthalpie im Gleichgewicht in Anwesenheit einer Konzentration von [P] Perturbans (NaCl oder Hamstoff)

ΔG^0 Änderung in der freien Enthalpie im Gleichgewicht in Abwesenheit von Perturbans (NaCl oder Hamstoff)

P Konzentration an Perturbans (NaCl oder Hamstoff)

R Gaskonstante

T Temperatur (K)

m Korrelationskoeffizient der LFER

K_A Assoziationskonstante zwischen RNA und Protein

2.6.2.4 Temperaturabhängigkeit der Protein-RNA-Interaktion

Die Temperaturabhängigkeit der RNA-Protein-Interaktion wurde analog der Gleichgewichtstitrationen analysiert. Die Messzelle des Fluoromax-4 wurde auf eine definierte Temperatur eingestellt bevor die Messungen durchgeführt wurden. Die dabei verwendeten RNA-Konzentrationen betragen 50 nM (NF90-NF45) bzw. 100 nM (NF90). Die Dissoziationskonstante bei den verschiedenen Temperaturen wurden nach Gleichung 3 bestimmt (s. 2.6.2.2). Die Temperaturabhängigkeit der Assoziation zwischen RNA und Protein wurde weiterführend anhand folgender Gleichungen nach van't Hoff analysiert.

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K_A$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (\text{Gleichung 5})$$

$$\ln K_A = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (\text{Gleichung 6})$$

ΔG^0 Änderung der freien Enthalpie im Gleichgewicht

ΔH^0 Änderung der Enthalpie im Gleichgewicht

ΔS^0 Änderung der Entropie im Gleichgewicht

K_A Assoziationskonstante zwischen RNA und Protein

2.7 Bestimmung kinetischer Parameter der RNA-Bindung von NF90

Kinetische Analysen der RNA-Bindung von NF90 und Varianten wurden an einer *stopped-flow*-Apparatur mit Fluoreszenz-Detektor (SX.20 MV, Applied Photophysics) bei 20 °C in NF90-Puffer durchgeführt. Die Anregung des Fluorophors erfolgte bei 491 nm und die Emission von $\lambda > 515$ nm wurde unter Verwendung eines *cut-off*-Filters gemessen. Gleiche Volumina Fluorophor-markierter RNA und Protein wurden durch die Apparatur gemischt und die Assoziation nach einer Totzeit von 1 ms verfolgt. Die Konzentration der RNA in der Messzelle betrug konstant 100 nM. Die erhaltenen Progresskurven wurden mittels mitgelieferter Software nach einfach-exponentieller oder doppelt-exponentieller Reaktionen 1. Ordnung angepasst. Die erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Aus der Abhängigkeit dieser Konstanten von der Proteinkonzentration ergibt sich die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung. Gleichung 10 beschreibt ein *conformational-selection*-Mechanismus (110).

$$\Delta F = -a \cdot e^{-k_r \cdot t} + c \quad (\text{Gleichung 7})$$

$$\Delta F = -a \cdot e^{-k_a \cdot t} - b \cdot e^{-k_b \cdot t} + c \quad (\text{Gleichung 8})$$

$$k_a = k_{\text{on}} \cdot [\text{Protein}]_0 + k_{\text{off}} \quad (\text{Gleichung 9})$$

$$k_{\text{obs}} = k_r + k_{-r} \frac{K_D}{K_D + [\text{Protein}]_0} \quad (\text{Gleichung 10})$$

ΔF Änderung der Fluoreszenz

a, b Amplitude der Phase a / b

c *offset*

t Zeit

k_a, k_b apparente Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung der Phase a / b

k_{on} Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung der Assoziation des Proteins an die RNA

k_{off} Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung der Dissoziation des Binärkomplexes Protein - RNA

$[\text{Protein}]_0$ totale Proteinkonzentration

k_{obs} beobachtete Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung der Bindungsreaktion

k_r, k_{-r} mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten der konformationellen Isomerisierung

K_D Dissoziationskonstante des Binärkomplexes Protein - RNA*, wobei RNA * für eine spezifische Konformation der RNA steht

2.8 RNA-annealing-Assay

Die Hybridisierung (*annealing*) zweier komplementärer ssRNAs wurde über einen Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) in einem Fluoromax-4 (HORIBA Jobin Yvon) verfolgt. Die RNAs wurden so konstruiert, dass jeweils ein Einzelstrang eines RNA-Paares mit Cy3 und der andere mit Cy5 am 5'-Ende der Nukleinsäure markiert war und somit einen FRET ermöglichten. Die Messungen erfolgten in NF90-Puffer mit der angegebenen Konzentration an NaCl oder Harnstoff bei 20 °C. Die Anregung des Cy3 erfolgte bei 535 nm und die Emission des Cy5 wurde bei 680 nm detektiert.

Für das RNA-*annealing* wurden 10 nM des Cy3-markierten Stranges in NF90-Puffer vorgelegt und die *annealing*-Reaktion durch die Zugabe von 10 nM des Cy5-markierten Stranges gestartet. Zur Analyse der RNA-*annealing*-Aktivität eines Proteins wurden steigende Proteinkonzentrationen mit 10 nM der Cy3-markierten RNA für 5 min präinkubiert und anschließend die Reaktion wie oben gestartet. Zur Analyse des Austauschs des Cy3-markierten Strangs in der produzierten dsRNA (*strand displacement*) wurde die RNA-*annealing*-Reaktion zunächst für 300 s inkubiert. Anschließend wurde das *strand displacement* durch Zugabe von 100 nM eines nicht-markierten, komplementären Strangs induziert und die Abnahme des FRET für 300 s aufgezeichnet.

Kinetische Daten wurden auf die Intensität zum Zeitpunkt $t = 220$ s normiert und nach einer Reaktion 2. Ordnung analysiert (Gleichung 11a). Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und nach Gleichung 9 bzw. Gleichung 11b (*induced fit*-Modell (111)), ausgewertet.

$$F = c + \gamma \cdot \left(1 - \frac{1}{k_{\text{obs}} \cdot t + 1} \right) \quad (\text{Gleichung 11a})$$

F	normalisierte Fluoreszenz
c	offset
k_{obs}	apparente Geschwindigkeitskonstante
γ	Amplitude

$$k_{\text{obs}} = k_1 + \frac{k_{\text{max}} \cdot [S]_0}{K_M + [S]_0}$$

(Gleichung 11b)

k_{obs}	apparente Geschwindigkeitskonstante
k_1, k_{max}	intramolekulare bzw. maximale Geschwindigkeitskonstante
K_M	Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeitskonstante
$[S]_0$	totale Substratkonzentration

2.8.1 Temperaturabhängigkeit des RNA-annealing

Für die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit des RNA-annealing wurden jeweils 10 nM der Fluorophor-markierten RNAs in Ab- und Anwesenheit von 35 nM NF90-NF45, 150 nM NF90^{S651E}-NF45 oder 500 nM NF90 in NF90-Puffer bei der entsprechenden Temperatur zur Reaktion gebracht und der FRET gemessen. Die Konzentrationen der Proteine wurden so gewählt, dass bei 20 °C eine identische Aktivität vorlag. Die Progresskurven wurden mit Gleichung 111a ausgewertet (s. 2.8) und erhaltene apparente Geschwindigkeitskonstanten auf die RNA- bzw. Protein-Konzentration normiert. Die so generierten Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung wurden nach der Arrhenius-Gleichung ausgewertet.

$$\ln k_{\text{obs}} = -\frac{E_A}{RT} + C \quad (\text{Gleichung 12})$$

$$\Delta G^\ddagger = -RT \cdot \ln \left(\frac{k \cdot h}{k_B \cdot T} \right) \quad (\text{Gleichung 13})$$

$$\Delta H^\ddagger = E_A - RT \quad (\text{Gleichung 14})$$

$$\Delta S^\ddagger = -\frac{1}{T} \cdot (\Delta G^\ddagger - \Delta H^\ddagger) \quad (\text{Gleichung 15})$$

E_A	Arrhenius - Aktivierungsenergie
C	Konstante
k_B	Boltzmann - Konstante
h	Planck Konstante
R	Gaskonstante
T	Temperatur
k	Geschwindigkeitskonstante
ΔG^\ddagger	Änderung der freien Aktivierungsenthalpie
ΔH^\ddagger	Änderung der Aktivierungsenthalpie
ΔS^\ddagger	Änderung der Aktivierungsentropie

2.9 *in-vitro* RNA-abhängiger RNA-Polymerase-Assay

Der *in vitro* RNA-abhängiger RNA-Polymerase-Assay (RdRP-Assay) wurde in einem Gesamtvolumen von 40 µL in Polymerase-Assay-Puffer PAP (20 mM HEPES-NaOH pH 7.2, 50 mM NaCl, 20 % (v/v) Glycerin, 6.5 mM MgCl₂, 0.5 mM MnCl₂, 1 mM DTT) durchgeführt. Außerdem waren je 0.5 mM ATP, UTP, GTP und 20 µCi [α -³²P]-CTP enthalten. Für die Reaktion wurden 30 nM 5BSL3.1_3'UTR bzw. X-tail-RNA oder 1 µg poly(C) und 100 nM rekombinante RdRP (NS5B von HCV-1b, Dr. Stefan Reich) im Ansatz inkubiert (112). Um den Einfluss durch NF90 und Varianten auf die Reaktion zu analysieren, wurden 5 – 200 nM der rekombinanten Proteine mit der RNA für 10 min präinkubiert und danach die Reaktion gestartet. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz wie unter 2.2.1 aufgearbeitet. Die Produkte wurden für 30 min bei -20 °C gefällt und nach dem Trocknen die Radioaktivität mittels Szintillation ermittelt.

2.10 Bestimmung der thermodynamischen Stabilität von Nukleinsäuren

Die thermodynamische Stabilität der in dieser Arbeit verwendeten Nukleinsäuren wurde mittels thermischer De- bzw. Renaturierung spektrometrisch in NF90-Puffer und unter Stickstoffatmosphäre ermittelt. Es wurden zwischen 0.5 – 3 μM der RNAs in einem Gesamtvolumen von 300 μL eingesetzt. Um ein Verdampfen zu vermeiden, wurde der Gasraum der Küvette mit Mineralöl (Roth) aufgefüllt. Die Messung der Transitionskurven erfolgte im Bereich 10 – 90 $^{\circ}\text{C}$ bei einer konstanten Wellenlänge am Jasco V-550 Spektrometer (Jasco, Groß-Umstadt), das mit einer externen Temperaturreguleinheit ETC-505T ausgerüstet war. Der eingesetzte Temperaturgradient betrug 0.4 K min^{-1} . Zur Ermittlung einer geeigneten Wellenlänge wurden im Vorfeld Differenzspektren jeder RNA bei 10 und 90 $^{\circ}\text{C}$ von 230 nm bis 400 nm aufgezeichnet und anschließend nach der größten Signaländerung analysiert. Die gemessenen Signale wurden anschließend nach Riechmann *et al.* in die „Fraktion gefaltet“ umgerechnet (113). Die thermodynamischen Parameter wurden durch Annäherung der Gleichung 16a, 16b (Re-/Denaturierung eines *stem-loop*) oder Gleichung 17a, 17b (Re-/Denaturierung einer dsRNA) an die normalisierten Schmelzkurven nach Riechmann *et al.* erhalten (113).

$$A = \frac{(A_N + m_N T) - [A_N + m_N T - (A_U + m_U T)] \cdot e^{\frac{-\Delta G^0}{RT}}}{1 + e^{\frac{-\Delta G^0}{RT}}} \quad (\text{Gleichung 16a})$$

$$\Delta G^0 = \Delta H \cdot \left(1 - \frac{T}{T_M}\right) + \Delta C_p \left(T - T_M - T \cdot \ln \frac{T}{T_M}\right) \quad (\text{Gleichung 16b})$$

$$A = (A_N + m_N T) - \frac{[A_N + m_N T - (A_U + m_U T)] \cdot e^{-\frac{\Delta G^0}{RT}} \cdot \left(\sqrt{1 + \frac{8 \cdot [\text{RNA}]_0}{e^{-\frac{\Delta G^0}{RT}}} - 1} \right)}{4 \cdot [\text{RNA}]_0} \quad (\text{Gleichung 17a})$$

$$\Delta G^0 = \Delta H \cdot \left(1 - \frac{T}{T_M} \right) + \Delta C_p \left(T - T_M - T \cdot \ln \frac{T}{T_M} \right) - RT \cdot \ln [\text{RNA}]_0 \quad \text{Gleichung 17b)}$$

- A_N, A_U Signalamplituden des nativen bzw. denaturierten Zustands auf 0 K extrapoliert
- m_N, m_U Anstieg der Grundlinie des nativen bzw. denaturierten Zustands in den Transitionen
- T Temperatur
- T_M Transitionsmittelpunkt (Schmelztemperatur)
- R Gaskonstante
- ΔC_p Differenz der Wärmekapazität des nativen und denaturierten Zustands
- ΔG^0 Änderung in der freien Enthalpie im Gleichgewicht
- ΔH^0 Änderung in der Enthalpie im Gleichgewicht
- $[\text{RNA}]_0$ totale RNA - Konzentration

2.11 Statistische Auswertung

In allen Tabellen ist zur statistischen Auswertung, wenn nicht anders gekennzeichnet, der Fehler der Regression nach der Methode der kleinsten Quadrate angegeben. Bei kinetischen Messungen ist aufgrund der interexperimentellen Variabilität ein Fehler von 10% anzusetzen und wird nicht weiter in den entsprechenden Tabellen spezifiziert. Bei kombinierter Fehlerrechnung wurden die statistischen Gesetzmäßigkeiten der Kombination von Fehlern angewandt.

Daten, die in Balkendiagrammen dargestellt sind, repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$). Aufgrund der interexperimentellen Variabilität wurde die Datennormierung so durchgeführt, dass die Werte der Kontrolle und der zu untersuchenden Probe auf den Wert der Kontrolle bezogen wurden. Eine statistische Auswertung dieser Daten kann durch dieses Verfahren nicht erfolgen, da die Kontrollwerte somit keine Varianz zeigten. Daten die eine statistische Auswertung erlaubten, wurden mit *Student's t-Test* auf Signifikanzen geprüft.

III. ERGEBNISSE

Erste Aufgabe war es, die Proteine NF90 und NF45 rekombinant herzustellen und zu präparieren. Nach der Reinigung der rekombinanten Proteine sollten funktionale und strukturelle Eigenschaften von NF90 betrachtet werden. Auf dieser Basis sollte anschließend die Interaktion von NF90 mit NF45 charakterisiert werden. Dabei stellten drei Hauptpunkte ein Grundgerüst der vergleichenden Charakterisierung dar: i) die thermodynamische Stabilität der Proteine, ii) die Eigenschaften der RNA-Bindung und iii) die Ausprägung einer enzymatischen Aktivität. Abschließend sollte iv) ein *in vitro* RNA-abhängige RNA-Polymerase-Assay (RdRP-Assay) etabliert werden, der zur Analyse und Definition der Funktion von NF90 als Wirtsfaktor der Replikation des Hepatitis-C-Virus dienen sollte. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die Reinigung von NF90, die Rekonstitution von NF90-NF45 sowie initiale Analysen der RNA-Bindung der Proteine zusammen mit Dipl.-Biochemiker Paul Knick (ehem. MLU Halle-Wittenberg) erarbeitet wurden.

3.1 Charakterisierung von NF90

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der Isoform NF90_b (nachfolgend „NF90“) gearbeitet (**Abb. 1**). NF90 wurde mittels heterologer Genexpression in *Escherichia coli* mit Verzicht auf *tags* hergestellt. Die Biomasse wurde über Fermentation von *E. coli* produziert. Das Protein fiel ausschließlich als *inclusion bodies* an und wurde aus der unlöslichen Fraktion isoliert und unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Im Rahmen meiner Diplomarbeit („Reinigung und Charakterisierung des NFAR-Proteins NF90 und einiger pseudophosphorylierter Varianten“, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2011) wurde bereits ein Reinigungsprotokoll etabliert. Dieses wurde nun in einigen Schritten optimiert (s. 2.4.1.2), sodass eine höhere Ausbeute an rekombinanten NF90 erreicht wurde. Das Protokoll konnte auf alle in dieser Arbeit verwendeten NF90-Varianten ohne Einschränkungen übertragen werden, auf deren individuelle Reinigung folglich nicht weiter eingegangen wird.

An dieser Stelle soll noch einmal auf die Spezifika der Reinigungsprozedur von NF90 eingegangen werden, die für die nachfolgende Datenerhebung von wichtiger Bedeutung waren. Für mechanistische Analysen des renaturierten NF90 musste gewährleistet werden, dass jede Präparation in einem definierten homogenen, funktionalen Zustand und zudem frei von kontaminierenden Nukleinsäuren bzw. Nukleotiden ist. Dieses Herangehen sollte die Qualität der späteren Analysen der Nukleinsäure-Bindung verbessern. Ein zentraler und kritischer Punkt der Reinigung war die Rückfaltung von NF90. Im Unterschied zum ursprünglich etablierten Protokoll wurde NF90 anstatt per

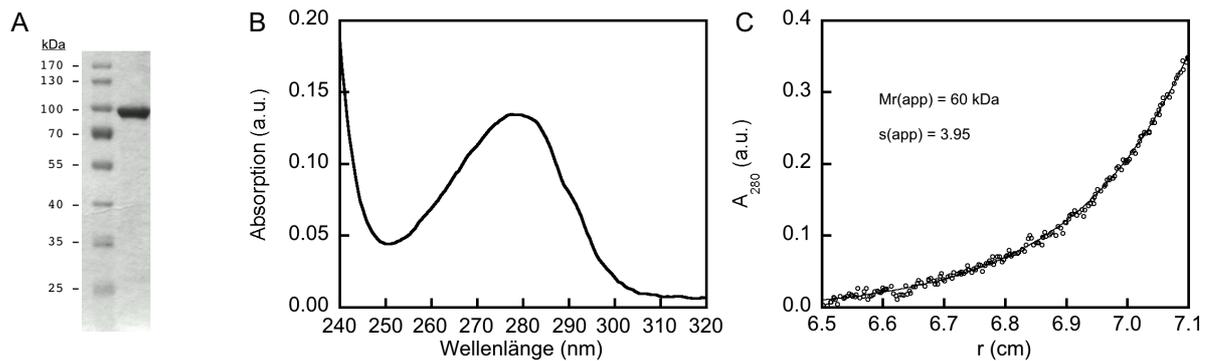


Abbildung 5: Reinigung von rekombinantem NF90. (A) Das gereinigte NF90 wurde in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt. Das Molekulargewicht der Markerbanden ist indiziert. (B) UV-Absorptionsspektrum des gereinigten NF90 in NF90-Puffer. (C) Analytische Ultrazentrifugation von NF90. Das Sedimentationsgleichgewicht des gereinigten NF90 wurde in NF90-Puffer verfolgt. Die lokale Proteinkonzentration wurde bei 280 nm in Abhängigkeit vom Radius (r) bestimmt. Die Auswertung erfolgte nach der Svedberg-Gleichung. Der ermittelte Sedimentationskoeffizient und das damit korrespondierende Molekulargewicht sind in der Abbildung angegeben.

Dialyse nun durch eine kombinierte schnelle Verdünnung-Pulsrenaturierung in den nativen Zustand überführt (Proteinkonzentration nach Verdünnung maximal 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Aufgrund des resultierenden großen Probenvolumens wurde die Proteinlösung anschließend über eine Heparin-Affinitätschromatographie konzentriert und abschließend einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Das so erhaltene NF90 wurde in einer 10%igen SDS-PAGE analysiert und war nach Coomassie- sowie Silberfärbung frei von Verunreinigungen (**Abb. 5A**). Die Identität des Proteins wurde über Massenspektrometrie bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Proteinkonzentration wurde spektroskopisch bestimmt. Der Quotient der Absorptionen bei 280 bzw. 260 nm betrug 1.8 und zeigte somit vernachlässigbare Kontamination durch Nukleinsäuren (**Abb. 5B**). Die analytische Ultrazentrifugation von NF90 in NF90-Puffer [50 mM Natriumphosphat pH 7.2, 100 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin, 1 mM TCEP] stellte das Protein als Monomer dar (**Abb. 5C**, durchgeführt von PD Dr. Hauke Lilie, MLU Halle-Wittenberg).

3.1.1 Strukturelle Integrität und Reversibilität der Faltung von NF90

Über NF90 sind kaum strukturelle Informationen verfügbar. Die einzigen Strukturdaten sind einer Kristallstruktur eines verkürzten NF90-NF45-Komplexes (NF90¹⁻³⁸⁰ und NF45²⁹⁻³⁹⁰) zu entnehmen (4). Dieser NF90-Variante fehlt der gesamte C-terminale Bereich (Aminosäuren 381-706), der sämtliche RNA-bindende Motive enthält. Daher wurden zunächst grundlegende strukturelle Aspekte von NF90 analysiert, die weiteren Aufschluss über die Homogenität und strukturelle Integrität des *in vitro* renaturierten Proteins geben sollten. Dafür wurden der Circular dichroismus (CD), die thermodynamische Stabilität und die intrinsische Fluoreszenz von NF90 analysiert.

Um einen Anhaltspunkt über die Verteilung der Sekundärstrukturelemente zu erhalten, wurde der PredictProtein-Server (<http://predictprotein.org>, (114)) verwendet. In

Übereinstimmung mit der Kristallstruktur wird der N-terminale Bereich von NF90 (Aminosäuren 1 - 390) stark strukturiert und vor allem aus α -Helices bestehend vorhergesagt (**Abb. 6A**). Der C-terminale Teil von NF90 (Aminosäuren 391 - 706) weist nur die dsRBMs als Strukturbereich auf.

NF90 zeigte im Fern-UV ein charakteristisches CD-Spektrum auf, das mit den vorhergesagten Sekundärstrukturelementen korrelierte (**Abb. 6B**). Das Spektrum ist durch ein maximalen positiven CD bei 190 nm, einen maximalen negativen CD bei 208 nm und eine Bande um 225 nm charakterisiert. Dass der maximale Betrag des Circular dichroismus bei 208 nm nur etwa $10^4 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ erreicht, lässt auf einen größeren Anteil an nicht definierten Konformationen (*intrinsically disordered regions*) schließen. Solche Elemente besitzen in der Regel eine hohe konformationelle Flexibilität. In Übereinstimmung mit der Vorhersage der Sekundärstrukturelemente von NF90 (PredictProtein-Server) deutet sich somit eine ausgeprägte konformationelle Dynamik von NF90 an. Neben dem Fern-UV zeigte NF90 auch einen Nah-UV Circular dichroismus (**Abb. 6B**). Hier weist NF90 besonders in den Region um 280 nm bzw. 295 nm einen negativen CD auf, der vermutlich durch exponierte Tyrosine bzw. Tryptophane verursacht wird (115).

In anschließenden Experimenten wurden die Fluoreszenzeigenschaften von NF90 analysiert. Die Primärstruktur von NF90 enthält 15 Tyrosine und 4 Tryptophane (s. Anhang 7.5), die zur intrinsischen Fluoreszenz beitragen. Diese war durch eine typische Tryptophan-Fluoreszenz bei 345 nm und eine Bande bei 303 nm charakterisiert. Letztere wird durch das Fluoreszenz-Maximum von Tyrosinen verursacht (**Abb. 6C** (116)). Üblicherweise tritt ein intrinsischer Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) von Tyrosin zu Tryptophan in Proteinen auf, der von der Distanz zwischen beiden Resten abhängig ist. Somit zeigte sich für NF90, dass einige der Tyrosine FRET-entkoppelt von den Tryptophanen vorliegen und entsprechend eine höhere Distanz zwischen diesen Aminosäuren vorliegt.

Als letzten grundlegenden Aspekt, der die strukturelle Integrität des Proteins beweisen sollte, wurde die thermodynamische Stabilität gegenüber chemischer De- bzw. Renaturierung analysiert. Da sich in Vorversuchen andeutete, dass 8 M Harnstoff möglicherweise nicht den vollständig denaturierten Zustand induziert, erfolgte die Denaturierung für die Stabilitätsanalyse von NF90 durch Inkubation des Proteins in einer äquimolaren Mischung aus GuHCl und Harnstoff (je 5 M). Der Faltungsprozess wurde durch den Fern-UV CD bei 225 nm verfolgt und ergab einen zweistufigen kooperativen Übergang, der die Anwesenheit eines Intermediats im Gleichgewicht zwischen 1.5 und 3 M Denaturans anzeigte (**Abb. 6D, Tabelle 5**). Es wurde keine Hysterese beobachtet, d.h., die aufgezeichnete Transition der Entfaltung war mit der gemessenen Transition der Rückfaltung deckungsgleich. Daher konnte eine quantitative Auswertung nach einem

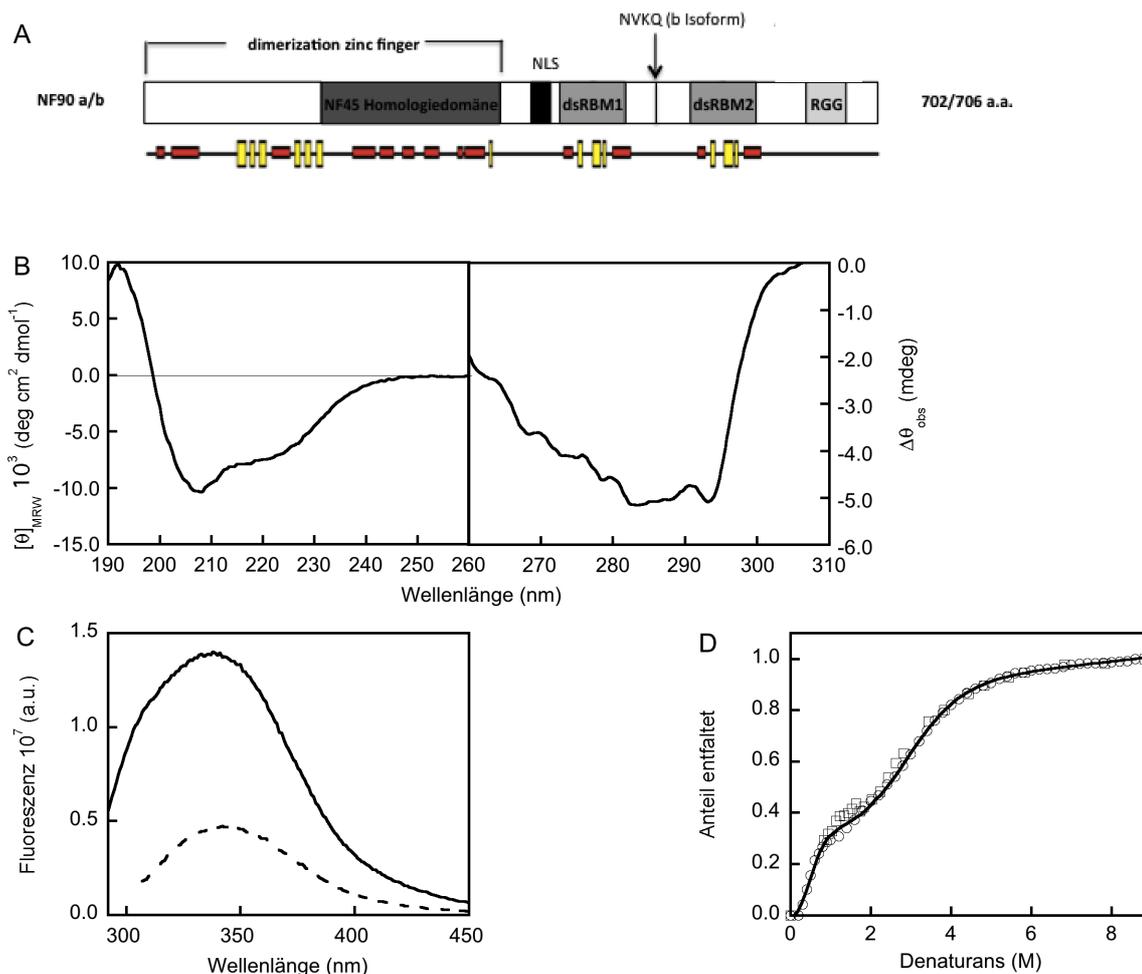


Abbildung 6: Strukturelle Charakteristika von NF90. (A) Schematische Darstellung der Domänenorganisation der Isoformen NF90a und NF90b. Die dsRBMs, das RGG-Motiv und die DZF-Domäne sowie isoformspezifische Sequenzen sind gekennzeichnet. Das zweite Schema zeigt die Vorhersage der Sekundärstruktur für NF90 (PredictProtein-Server, <http://www.predictprotein.org>, 114). α -Helices sind rot und β -Faltblätter gelb dargestellt. (B) Der Fern-UV und Nah-UV Circular dichroismus von NF90 wurde bei 20 °C in NF90-Puffer aufgezeichnet. Gemessene Elliptizitäten im Fern-UV wurden in die *mean-residue-weight*-Elliptizitäten umgerechnet. (C) Die intrinsische Fluoreszenz von NF90 wurde bei Anregung von 280 nm (voller Graph) und 295 nm (gestrichelter Graph) bei 20 °C in NF90-Puffer aufgenommen. (D) Chemische Denaturierung (Kreis) bzw. Renaturierung (Quadrat) von NF90 mittels eines Denaturansgemisches aus äquimolaren Anteilen GuHCl und Harnstoff. Das Protein wurde in steigenden Denaturanskonzentrationen in NF90-Puffer für 24 h inkubiert und anschließend der CD bei 225 nm gemessen. Gemessene Elliptizitäten wurden in den Anteil des entfaltenen Proteins umgerechnet und gegen die Denaturanskonzentration aufgetragen. Zur Auswertung wurde die Gleichung 2 (s. 2.5.3) den Daten angenähert. Berechnete thermodynamische Parameter sind in **Tabelle 5** zusammengefasst.

Tabelle 5. Thermodynamische Parameter der Faltung von NF90

Übergang	$[D]_{50\%}$ (M)	m (kcal L mol ⁻²)	ΔG^0 (kcal mol ⁻¹)
N → I	0.48 ± 0.07	3.06 ± 0.26	1.46 ± 0.18
I → U	2.85 ± 0.12	0.87 ± 0.03	2.48 ± 0.06

N – native, I – Intermediat, U – denaturierter Zustand

Dreizustandsmodell erfolgen (s. 2.5.3). Die erste Stufe der Denaturierung ergab einen Transitionsunkt bei $D_{50\%}^{N-I} = 0.48$ M Denaturans. In diesen Übergang involvierte Strukturelemente weisen eine thermodynamische Stabilität von $\Delta G_{N-I}^0 = 1.46 \pm 0.18$ kcal mol⁻¹ auf (**Tabelle 5**). Die zweite Stufe ist weniger kooperativ und es wurde eine hohe Denaturanskonzentration für die vollständige Entfaltung benötigt. Dementsprechend ergibt sich ein kleiner Betrag für den m -Wert dieses Übergangs ($m = 0.87$ kcal L mol⁻²). Der m -Wert kann als Maß für die Änderung der Lösungsmittel-zugängliche Oberfläche des Proteins interpretiert werden. Hier zeigt der kleine Betrag des m -Werts, dass sich diese beim Übergang vom nativen zum entfalteten Zustand kaum ändert. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass NF90 ein flexibles Protein darstellt. Aus der Addition der thermodynamischen Stabilitäten beider Übergänge ergibt sich die Gesamtstabilität des Proteins zu $\Delta G_{N-U}^0 = 3.94 \pm 0.19$ kcal mol⁻¹. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass das renaturierte NF90 eine strukturelle Integrität mit einer moderaten thermodynamischen Stabilität besitzt, einige Strukturelemente sind durch eine hohe konformationelle Dynamik charakterisiert sind.

3.1.2 NF90 bindet mit hoher Affinität an dsRNA

Nach dem Beweis der strukturellen Integrität des gereinigten Proteins wurde nun die RNA-Bindung mit synthetischen Fluorophor-markierten RNAs (5'-Fluoresceinaminomethyl, FAM-EX) analysiert. FAM-EX diente als Sonde zur Detektion der NF90-Bindung an die Nukleinsäure. Die Bindung des Proteins an die freie RNA führte zur Verringerung der FAM-EX-Fluoreszenzintensität (Quenching). Mit steigenden Proteinkonzentrationen kann entsprechend eine Bindungsisotherme aufgenommen und quantifiziert werden (**Abb. 7A**). Als RNAs wurden für die Analysen eingesetzt: eine 16 nt ssRNA (zufällige Sequenz, ssRNA-1), eine von ssRNA-1 abgeleitete dsRNA mit 13 bp (dsRNA-1) und eine 33 bp dsRNA mit erweiterter Sequenz der dsRNA-1 (dsRNA-2). Es wurden damit RNAs verschiedener Länge als Einzel- oder Doppelstrang auf NF90-Bindung getestet. In der Diskussion wird weiter auf die Wahl dieser Modell-RNAs eingegangen (s. 4.1).

Wie oben aufgeführt, enthält NF90 mehrere RNA-bindende Motive, die eine multiple Ligandenbindung ermöglichen könnten. Aus diesem Grund wurde zunächst die Stöchiometrie der Bindung von NF90 an RNA mittels einer aktive-Zentren-Titration (*active-site-titration*) analysiert. *Active-site titrations* werden unter stark verschobenen Gleichgewichtsbedingungen, d.h. unter Substratsättigung durchgeführt. Folglich kann diejenige Quantität an NF90 bestimmt werden, die 100% der vorgelegten RNA assoziiert. Das stöchiometrische Verhältnis (n) kann graphisch bestimmt werden. Die *active-site-titration* von NF90 belegte eine von der Länge der Nukleinsäure unabhängige

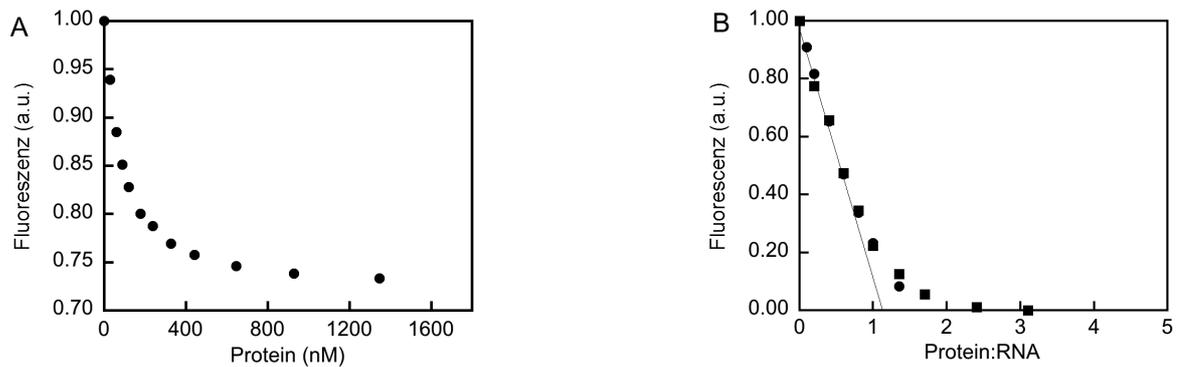


Abbildung 7: Nukleinsäure-Bindung von NF90 und die Stöchiometrie der RNA-NF90-Assoziation. (A) Repräsentativer fluorimetrischer, auf FAM-EX-Quenching basierender Assay zur Quantifizierung der RNA-Protein-Interaktion am Beispiel der Bindung von NF90 an dsRNA-2. Steigende Proteinkonzentrationen führen zum Quenching der Intensität der FAM-EX-RNA (Kreis), das mit der RNA-Bindung des Proteins korreliert. **(B)** *Active-site-titration* der NF90-Bindung von 1 μ M dsRNA-1 (Kreis) bzw. dsRNA-2 (Quadrat) bei 20 °C in NF90-Puffer. Die Stöchiometrie (n) der Bindung wurde durch die eingezeichnete Gerade graphisch zu $n = 1.1$ bestimmt.

äquimolare Bindung von dsRNA-1 bzw. dsRNA-2 an NF90 mit einer Stöchiometrie von $n = 1.1$ (**Abb. 7B**). Folglich kann von einer Bindung eines Moleküls RNA pro Molekül NF90 ausgegangen und somit die Gleichgewichtstitrationen der RNA-Bindung von NF90 mittels Gleichung 3 (s. 2.6.2.2) ausgewertet werden.

Unter Verwendung der oben eingeführten RNAs sollte als Nächstes eine systematische Analyse der RNA-Bindungseigenschaften von NF90 erfolgen. Dazu wurden die Affinitäten von NF90 zu jeder der oben genannten RNAs in NF90-Puffer bei 20 °C (= Standardbedingungen) ermittelt (**Tabelle 6**). Sofern nicht anders angegeben, sind die in allen folgenden Tabellen gelisteten Dissoziationskonstanten unter diesen Standardbedingungen gültig. NF90 wies die höchste Affinität zu dsRNA-2 ($K_D = 3$ nM) auf, gefolgt von dsRNA-1 ($K_D = 160$ nM). Die 33 bp dsRNA-2 wurde mit einer ~ 100 fachen größeren Affinität als die 13 bp dsRNA-1 gebunden. Darüber hinaus konnte ein Unterschied der Affinitäten von NF90 zu dsRNA-1 und zur gleichlangen ssRNA-1 von etwa einer Größenordnung ermittelt werden. Die Bindungskonstante zu ssRNA-1 betrug $K_D(\text{ssRNA-1}) = 1200$ nM.

Diese Ergebnisse belegen, dass NF90 mit hoher Affinität an RNA assoziiert. Dabei zeigt das Protein bei gleichlangen RNAs eine Bindungspräferenz zu dsRNA. Es wurden zusätzlich Hinweise erhalten, dass die RNA-Affinität von NF90 mit zunehmender Größe der Nukleinsäure zunimmt.

3.1.3 NF90 interagiert in unterschiedlicher Weise mit unterschiedlichen RNAs

Es wurde bereits belegt, dass die NF90-RNA-Assoziation äquimolar und mit unterschiedlichen Affinitäten zu den unterschiedlichen RNAs erfolgt. Eine Ursache, die diese unterschiedlichen Affinitäten erklären kann, stellt eine unterschiedliche Beteiligung der RNA-bindenden Motive von NF90 am Prozess der RNA-Bindung dar. In

Abhängigkeit vom RNA-Substrat können somit unterschiedliche Interaktionen (z.B. ionische und nicht-ionische Wechselwirkungen) zwischen den Bindungspartnern auftreten. Das heißt, es kann je nach Substratstruktur ein anderer Bindungsmodus von NF90 an die RNA vorliegen. Um über diese Spezifität der NF90-RNA-Assoziation Informationen zu erhalten, wurde eine Analysestrategie angewandt, bei der die für die Ausbildung des Binärkomplexes maßgebenden ionischen Wechselwirkungen beeinflusst wurden. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit dem NF90-Puffer unterschiedliche Konzentrationen an Natriumchlorid zugesetzt. Allgemein ist anzunehmen, dass mit zunehmender Ionenstärke hydrophobe Wechselwirkungen durch Konkurrenz der zusätzlichen Ionen mit der Wasserhülle der Biopolymere verstärkt werden.

Dieser Strategie folgend, wurden zunächst die Affinitäten von NF90 zu den unterschiedlichen RNA-Substraten bei verschiedenen Konzentrationen an NaCl quantifiziert (**Abb. 8A**). Die logarithmische Darstellung der ermittelten Assoziationskonstanten gegen die Konzentration an NaCl spiegelt eine sogenannte lineare freie Enthalpiebeziehung wider (**Abb. 8B**) (109,110). Gleichung 4 beschreibt dabei diesen linearen Zusammenhang (LFER) zwischen $\ln K_A$ und $[\text{NaCl}]$ (s. 2.6.2.3). Der darin enthaltene m -Wert (Komponente des Anstiegs der Geraden) reflektiert die Abhängigkeit der NF90-RNA-Bindung von der Ionenstärke und wird im Folgenden als der „Bindungsmodus“ von NF90 an die RNA interpretiert. Um nun Aussagen über Unterschiede im Bindungsmodus der verschiedenen Binärkomplexe zu erhalten, wurden deren m -Werte miteinander verglichen. Dabei indiziert eine Abnahme des m -Werts (stärker negativer Wert) eine Zunahme der Sensitivität der RNA-Protein-Interaktion gegenüber den ionischen Bedingungen und daher eine im Vergleich größere Bedeutung ionischer Wechselwirkungen während des Bindungsprozesses. Dagegen indiziert ein Anstieg von m (weniger negativer Wert) eine geringere Sensitivität gegenüber der Ionenstärke und somit eine im Vergleich größere Relevanz hydrophober Wechselwirkungen während des Bindungsprozesses.

Interessanterweise wurde so zu jeder getesteten RNA ein anderer Bindungsmodus bestimmt und eine Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen RNAs und NF90 offengelegt (**Abb. 8C, Tabelle 6**). Die Bindung von NF90 an ssRNA-1 wies die größte Sensitivität gegenüber der Ionenstärke auf. Der m -Wert der Assoziation von NF90 an ssRNA-1 betrug $m = -24.8 \text{ kcal L mol}^{-2}$ und der an dsRNA-1 $m = -12.8 \text{ kcal L mol}^{-2}$ (**Tabelle 6**). Damit wird ein Bindungsmodus der NF90-ssRNA-1-Interaktion angezeigt, der durch einen höheren Anteil ionischer Wechselwirkungen im Vergleich zur Interaktion von NF90 mit dsRNA-1 charakterisiert ist. Der m -Wert der Assoziation von NF90 an dsRNA-2 war hingegen größer als der m -Wert der Wechselwirkung von NF90 mit dsRNA-1 ($m_{\text{dsRNA-2}} = -8.1 \text{ kcal L mol}^{-2}$ vs. $m_{\text{dsRNA-1}} = -12.8 \text{ kcal L mol}^{-2}$, **Tabelle 6**). Somit wird im Fall der Interaktionen im Komplex dsRNA-2-NF90 nun ein Bindungsmodus

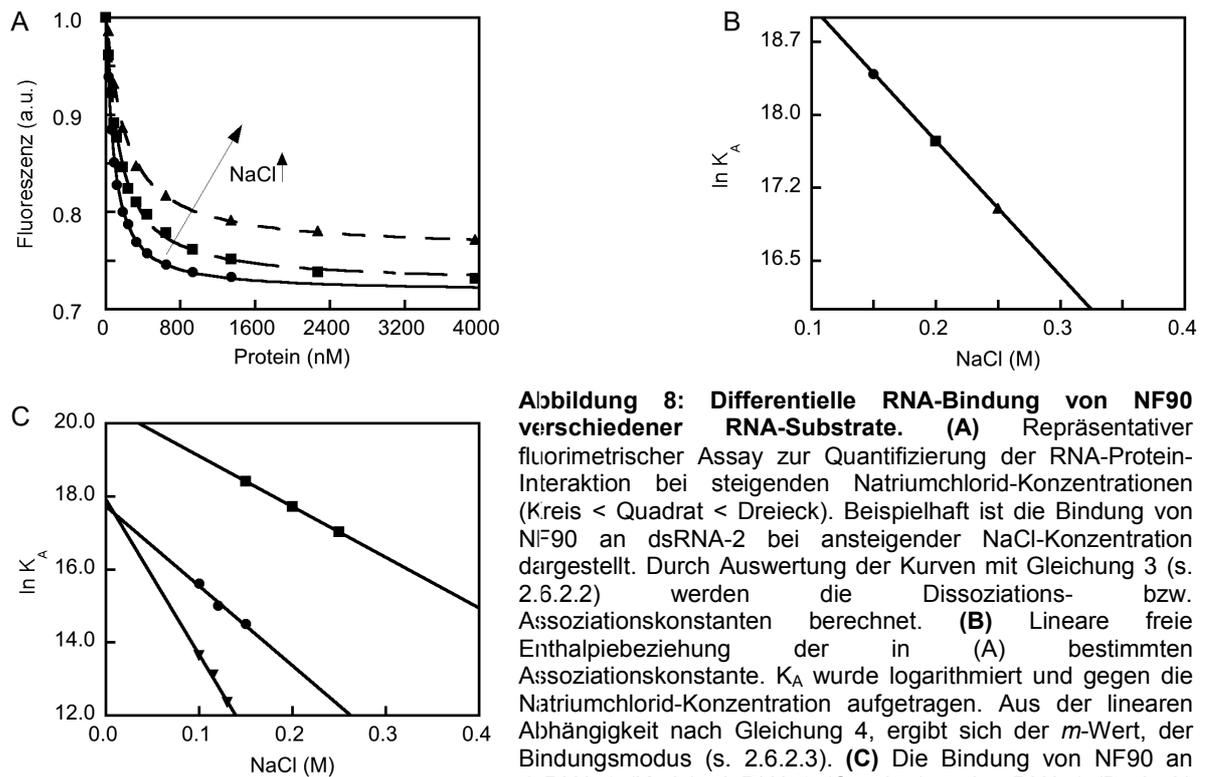


Abbildung 8: Differentielle RNA-Bindung von NF90 verschiedener RNA-Substrate. (A) Repräsentativer fluorimetrischer Assay zur Quantifizierung der RNA-Protein-Interaktion bei steigenden Natriumchlorid-Konzentrationen (Kreis < Quadrat < Dreieck). Beispielhaft ist die Bindung von NF90 an dsRNA-2 bei ansteigender NaCl-Konzentration dargestellt. Durch Auswertung der Kurven mit Gleichung 3 (s. 2.6.2.2) werden die Dissoziations- bzw. Assoziationskonstanten berechnet. (B) Lineare freie Enthalpiebeziehung der in (A) bestimmten Assoziationskonstante. K_A wurde logarithmiert und gegen die Natriumchlorid-Konzentration aufgetragen. Aus der linearen Abhängigkeit nach Gleichung 4, ergibt sich der m -Wert, der Bindungsmodus (s. 2.6.2.3). (C) Die Bindung von NF90 an dsRNA-1 (Kreis), dsRNA-2 (Quadrat) und ssRNA-1 (Dreieck) wurde als Funktion der Natriumchlorid-Konzentration bei 20 °C in NF90-Puffer quantifiziert. Fluoreszenz-Daten wurden mittels Gleichung 3 ausgewertet. K_A wurde logarithmiert, gegen die Natriumchlorid-Konzentration aufgetragen und anhand Gleichung 4 nach einer LFER ausgewertet. Die ermittelten Parameter sind in **Tabelle 6** zusammengefasst.

Tabelle 6. RNA-Bindungsparameter von NF90 zu verschiedenen RNAs

	ssRNA-1 (nM)	m (kcal L mol ⁻²)	dsRNA-1 (nM)	m (kcal L mol ⁻²)	dsRNA-2 (nM)	m (kcal L mol ⁻²)
NF90	1200 ± 49	-24.8 ± 2.5	160 ± 19	-12.8 ± 2.0	3 ^a	-8.1 ± 0

^a Extrapolation auf 100 mM NaCl

indiziert, der einen stärkeren Anteil an hydrophoben Wechselwirkungen als im Komplex dsRNA-1-NF90 involviert.

Diese Ergebnisse belegen, dass NF90 unterschiedliche RNA-Bindungsmodi ausprägt, die von der Art des RNA-Substrates abhängig sind. Es wurde somit deutlich, dass NF90 in der Lage ist, zwischen strukturellen Eigenschaften und Größe der Nukleinsäure zu diskriminieren. Diese Situation deutet an, dass die verschiedenen RNA-bindenden Motive von NF90 unterschiedlich zur RNA-Bindung beitragen.

3.1.4 Beide dsRBMs von NF90 sind für eine effektive RNA-Bindung essentiell

Um im Folgenden die spezifische Rolle der dsRBMs von NF90 im Prozess der RNA-Bindung detailliert zu analysieren, wurden NF90-Varianten mit modifizierten Motiven generiert: NF90^{F432A} (mutiertes dsRBM1) und NF90^{F559A} (mutiertes dsRBM2, **Abb. 9A**). In diesen Varianten wurde jeweils das zentrale hochkonservierte Phenylalanin der Konsensussequenz des dsRBM gegen Alanin ausgetauscht (F32 in **Abb. 4A**). Für diese Substitution konnte gezeigt werden, dass die RNA-Bindung des betroffenen dsRBMs nahezu vollständig aufgehoben wird (49,82,89). Folglich sollte der Beitrag des jeweils intakt gebliebenen dsRBMs zur RNA-Bindung analysiert werden können. Die Herstellung der mutierten Gene erfolgte über ortsgerichtete Mutagenese. Die Reinigung der NF90-Varianten wurde analog der des Wildtyp-Proteins durchgeführt. Die strukturelle Integrität der Proteine wurde mittels Fern-UV Circular dichroismus adressiert. So konnte gezeigt werden, dass keine der Substitutionen in den dsRBMs zu einer signifikanten Veränderung der Struktureigenschaften von NF90 führt (**Abb. 9B**). Die Quantifizierung der RNA-Bindungsaffinitäten sowie die Berechnung der Bindungsmodi zu den verschiedenen RNAs erfolgte analog zu den Experimenten mit dem Wildtyp NF90 (NF90wt, **Tabelle 7**).

Die Bindung der Variante NF90^{F432A} (modifiziertes dsRBM1) an dsRNA-1 zeigte unter Standardbedingungen im Vergleich zu NF90wt eine leicht geringere Affinität ($K_D = 300$ nM vs. 160 nM von NF90wt). Ein ähnliches Ergebnis wurden bei der Affinität dieser Variante an die ssRNA-1 erhalten ($K_D = 1600$ nM vs. 1200 nM von NF90wt). Die Bindungsaffinität der Variante an die dsRNA-2 war im Vergleich zu NF90wt nicht verändert ($K_D = 2$ nM, **Tabelle 7**). Insgesamt hatte damit die Mutation des dsRBM1 von NF90 unter diesen Bedingungen keine bzw. nur geringfügige Auswirkungen auf die Affinität von NF90 zu den verschiedenen RNAs.

Die Analyse der Bindungsmodi dieser Variante (NF90^{F432A}) zu den verschiedenen RNAs zeigte jedoch größere Veränderungen gegenüber NF90wt. Die Mutation des dsRBM1 in NF90^{F432A} führte im Vergleich zu einer Abnahme des m -Wertes in der Bindung zu dsRNA-1 und dsRNA-2 (**Tabelle 7**). Folglich ergibt sich durch diese Mutation ein ähnlicher Bindungsmodus zu beiden dsRNAs, bei dem ionische Wechselwirkungen stärker als in NF90wt ausgeprägt sind. Im Fall der Bindung von ssRNA-1 von NF90^{F432A} konnte im Vergleich zu NF90wt eine Zunahme des m -Wertes festgestellt werden (**Tabelle 7**). Hier resultiert nun ein Bindungsmodus von NF90^{F432A}, bei dem hydrophobe Wechselwirkungen stärker als im Fall von NF90wt ausgeprägt sind. In Abhängigkeit vom RNA-Substrat führte die Mutation des dsRBM1 in NF90 demnach zu unterschiedlich veränderten RNA-Bindungsbeiträgen bei der Bindung an ssRNA-1 bzw. dsRNA-1.

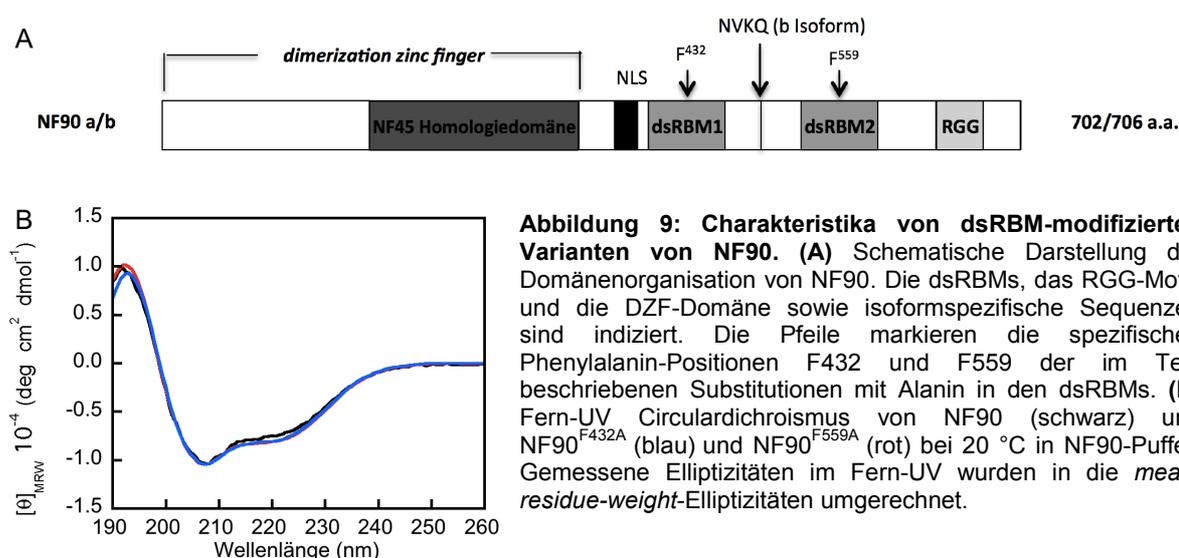


Abbildung 9: Charakteristika von dsRBM-modifizierten Varianten von NF90. (A) Schematische Darstellung der Domänenorganisation von NF90. Die dsRBMs, das RGG-Motiv und die DZF-Domäne sowie isoformspezifische Sequenzen sind indiziert. Die Pfeile markieren die spezifischen Phenylalanin-Positionen F432 und F559 der im Text beschriebenen Substitutionen mit Alanin in den dsRBMs. (B) Fern-UV Circular dichroismus von NF90 (schwarz) und NF90^{F432A} (blau) und NF90^{F559A} (rot) bei 20 °C in NF90-Puffer. Gemessene Elliptizitäten im Fern-UV wurden in die *mean-residue-weight*-Elliptizitäten umgerechnet.

Tabelle 7. RNA-Bindungsparameter der dsRBM-mutierten NF90-Varianten

	ssRNA-1 (nM)	<i>m</i> (kcal L mol ⁻²)	dsRNA-1 (nM)	<i>m</i> (kcal L mol ⁻²)	dsRNA-2 (nM)	<i>m</i> (kcal L mol ⁻²)
NF90	1200 ± 49	-24.8 ± 2.5	160 ± 19	-12.8 ± 2.0	3 ^a	-8.1 ± 0
NF90 ^{F432A}	1600 ± 131	-14.9 ± 0.5	300 ± 13	-19.2 ± 0.7	2 ^a	-20.8 ± 0.1
NF90 ^{F559A}	900 ± 66	-24.3 ± 0.8	1100 ± 41	-15.1 ± 0.3	13 ± 2.2	-28.1 ± 2.5

^a Extrapolation auf 100 mM NaCl

Die Mutation des dsRBM2 in NF90^{F559A} reduzierte die Affinität des Proteins zu dsRNA-1 und dsRNA-2 im Vergleich zu NF90wt um etwa eine Größenordnung ($K_{D, \text{dsRNA-1}}$ 1100 nM vs. 160 nM NF90wt bzw. $K_{D, \text{dsRNA-2}} = 13$ nM vs. 3 nM NF90wt, **Tabelle 7**). Somit wird belegt, dass dsRBM2 von NF90 unter diesen Bedingungen signifikant zur NF90-Bindung an dsRNA beiträgt. Die Affinität dieser Variante zu ssRNA-1 war im Vergleich zu NF90wt nur leicht verändert.

Bei der Analyse des Bindungsmodus von NF90^{F559A} zu dsRNA-1 und dsRNA-2 wurden ähnliche Veränderungen wie bei NF90^{F432A} deutlich. Im Vergleich zu NF90wt führte die dsRBM2-Mutation zu einer Abnahme des *m*-Werts der Bindung von dsRNA-1 und dsRNA-2 (**Tabelle 7**). Damit wird eine größere Ausprägung ionischer Wechselwirkungen bei der Bindung der Variante an die dsRNAs als bei NF90wt angezeigt. Daher kann vermutet werden, dass beide dsRBMs in NF90wt vorwiegend über hydrophobe Interaktionen mit dsRNA interagieren. Der Bindungsmodus von NF90^{F559A} an ssRNA-1 entsprach etwa dem Wildtyp und war nicht verändert (vgl. **Tabelle 6**).

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass das NF90-dsRBM2 eine wichtige funktionale Determinante der Bindung an dsRNA darstellt. Der Einfluss von NF90-dsRBM1 ist dagegen geringer ausgeprägt und weist damit auf unterschiedliche individuelle Bindungsaktivitäten beider dsRBMs hin. Der Bindungsbeitrag der dsRBMs zu

ssRNA-1 ist eher gering. Die Situation, dass jede der dsRBM-Mutationen den NF90-Bindungsmodus an die verschiedenen RNAs unterschiedlich verändert, macht deutlich, dass ein konzertierter Bindungsmodus der beiden dsRBMs von NF90 bei der Assoziation an dsRNA vorliegt.

3.1.5 Der C-Terminus von NF90 ist essentiell an der Bindung von ssRNA beteiligt

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass der Beitrag der dsRBMs zur ssRNA-Bindung von NF90 gering ist. Somit wurde eine Rolle des C-Terminus von NF90 in diesem Prozess angedeutet. Anschließende Experimente sollten daher diese Region von NF90 untersuchen. Dazu wurden zwei C-terminal verkürzte NF90-Varianten generiert (**Abb. 10A, B**): NF90 Δ C63, bei der die C-terminalen 63 Aminosäuren inklusive des RGG-Motivs entfernt wurden und folglich nur die dsRBMs als RNA-Bindemotive verblieben, und NF90 Δ C46, welche das RGG-Motiv noch enthielt. Die strukturelle Integrität der gereinigten Varianten wurde analysiert und bestätigt (**Abb. 10C**). Zur Bestimmung der Affinitäten sowie Bindungsmodi der Varianten zu den verschiedenen RNAs wurde dieselbe Strategie wie zuvor angewandt.

Interessanterweise ließ sich keine Bindung von ssRNA-1 an NF90 Δ C63 feststellen (**Tabelle 8**). Des Weiteren war bei dieser Variante unter Standardbedingungen die Affinität zu dsRNA-1 und dsRNA-2 im Vergleich zu NF90wt signifikant reduziert ($K_{D, dsRNA-1} = 750 \text{ nM}$ vs. 160 nM von NF90wt bzw. $K_{D, dsRNA-2} = 22 \text{ nM}$ vs. 3 nM von NF90wt). Darüber hinaus hatte die C-terminale Deletion in NF90 Δ C63 eine Zunahme des m -Wertes bei der Assoziation an dsRNA-1 im Vergleich zu NF90wt zur Folge (**Tabelle 8**). Damit weist der Bindungsmodus der Variante NF90 Δ C63 an dsRNA-1, bei dem im Wesentlichen nur noch die dsRBMs zur RNA-Bindung beitragen sollten, einen hohen Anteil hydrophober Interaktionen auf. Der Bindungsmodus dieser Variante an dsRNA-2 ist im Vergleich zu NF90wt nicht verändert (**Tabelle 8**).

Mit der Variante NF90 Δ C46, die das RGG-Motiv enthält, konnte eine Bindung an ssRNA-1 gemessen werden ($K_D = 3400 \text{ nM}$), jedoch war die Affinität geringer als die des Wildtyp-Proteins und zeigte zudem eine sehr hohe Abhängigkeit gegenüber der Ionenstärke (**Tabelle 8**). Daher konnte der Bindungsmodus nur mit $m < -25 \text{ kcal L mol}^{-2}$ abgeschätzt werden. Dieser wird folglich nur durch das RGG-Motiv vermittelt.

Diese Ergebnisse belegen, dass die 63 C-terminalen Aminosäuren und vor allem das RGG-Motiv von NF90 essentiell für die Bindung von ssRNA-1 sind. Die Bindungsmodi der beiden Varianten zeigen dabei, dass das RGG-Motiv und die dsRBMs auf sehr unterschiedliche Weise zur RNA-Bindung beitragen. Der Bindungsmodus für dsRNA-1 an NF90 Δ C63 zeigt, dass die dsRBMs von NF90 hauptsächlich über hydrophobe Interaktionen an dsRNA assoziieren. Der eher ionische Bindungsmodus von NF90 Δ C46

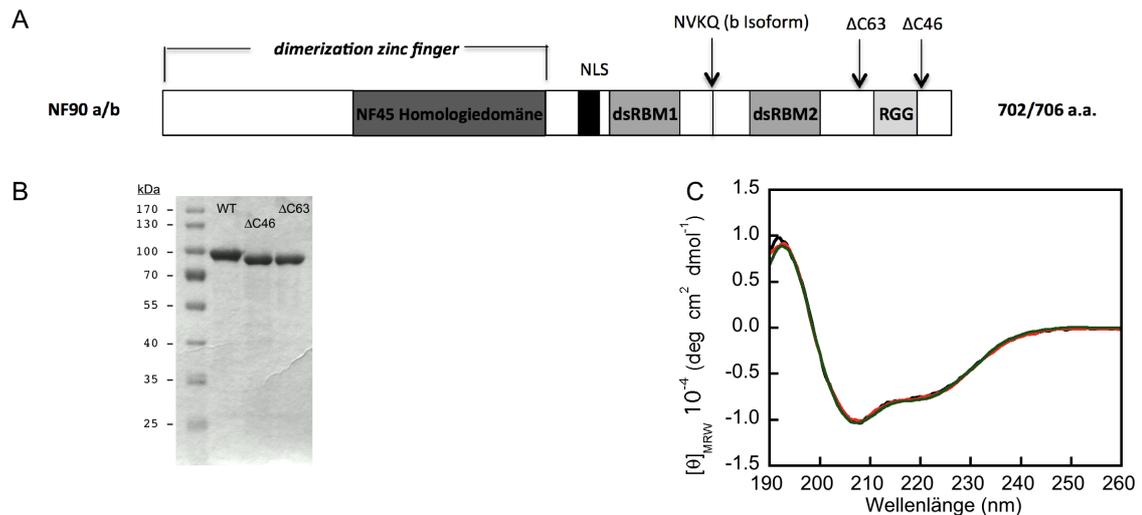


Abbildung 10: Charakteristika der in dieser Studie verwendeten C-terminal verkürzten NF90-Varianten. (A) Schematische Darstellung der Domänenorganisation von NF90. Die dsRBMs, das RGG-Motiv und die DZF-Domäne sowie isoformspezifische Sequenzen sind indiziert. Die Pfeile markieren die Positionen der im Text beschriebenen eingeführten Mutationen von NF90. (B) Die gereinigten Varianten von NF90 wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung visualisiert. (C) Fern-UV Circular dichroismus von NF90, NF90ΔC63 (rot) und NF90ΔC46 (grün) bei 20 °C in NF90-Puffer. Gemessene Elliptizitäten im Fern-UV wurden in die *mean-residue-weight*-Elliptizitäten umgerechnet.

Tabelle 8. RNA-Bindungsparameter C-terminal verkürzter NF90-Varianten

	ssRNA-1 (nM)	<i>m</i> (kcal L mol ⁻²)	dsRNA-1 (nM)	<i>m</i> (kcal L mol ⁻²)	dsRNA-2 (nM)	<i>m</i> (kcal L mol ⁻²)
NF90	1200 ± 49	-24.8 ± 2.5	160 ± 19	-12.8 ± 2.0	3 ^a	-8.1 ± 0
NF90ΔC63	keine Bindung		750 ± 210	-4.9 ± 0.3	22 ± 4.1	-9.5 ± 1.3
NF90ΔC46	3400 ± 1000	< -25	----- nicht ermittelt -----			

^a Extrapolation auf 100 mM NaCl

belegt, dass das RGG-Motiv vor allem über ionische Wechselwirkungen zur Bindung von RNA beiträgt. Darüber hinaus wurde ein signifikanter Beitrag des C-Terminus von NF90 zur dsRNA-Bindung festgestellt. Alle RNA-bindenden Motive von NF90 tragen folglich mit unterschiedlichen individuellen Bindungsaktivitäten und vermutlich kooperativ zur dsRNA-Assoziation bei.

3.1.6 Die RNA-bindenden Motive von NF90 assoziieren kooperativ an RNA.

Als Nächstes wurde die Hypothese der Kooperativität der RNA-bindenden Motive von NF90 bei der Substratbindung weiter überprüft. Dazu wurde zunächst eine NF90-Variante NF90^{F432, 559A} hergestellt, bei der jedes dsRBM in der oben beschriebenen Weise mutiert war (**Abb. 11A**). Die Mutationen beider dsRBMs in NF90^{F432, 559A} sollte die Aktivität des C-Terminus des vollständigen Proteins herausstellen. Wie bei den anderen generierten NF90-Varianten, konnten durch die Mutationen keine signifikanten

Veränderungen in der Struktur von NF90 festgestellt werden (**Abb. 11C**). Zur Analyse der RNA-Bindung wurde dieselbe Strategie wie zuvor angewandt.

Die Variante NF90^{F432, 559A} zeigte im Vergleich zu NF90wt eine leicht geringere Affinität zu ssRNA-1 ($K_D = 1800$ nM vs. 1200 nM von NF90wt, **Tabelle 9**), zu dsRNA-1 und dsRNA-2 wurde hingegen eine jeweils 10fach geringere Affinität bestimmt ($K_{D,dsRNA-1} = 1800$ nM vs. 160 nM von NF90wt; $K_{D,dsRNA-2} = 27$ nM vs. 3 nM von NF90wt). Somit konnte zunächst die wichtige Rolle beider funktionaler dsRBMs für die dsRNA-Bindung bestätigt werden.

Der Bindungsmodus (m -Wert) von NF90^{F432, 559A} an ssRNA-1 war im Vergleich zu NF90wt kaum verändert (**Tabelle 9**). Die Mutation beider dsRBMs induzierte im Vergleich zu NF90wt jedoch eine deutliche Abnahme des m -Werts bei der Assoziation der dsRNAs. Daher weist der Bindungsmodus dieser Variante an dsRNA-1 und dsRNA-2 im Vergleich zu NF90wt einen höheren Anteil an ionischen Wechselwirkungen auf (**Tabelle 9**). Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die dsRBMs kaum zur ssRNA-1-Bindung beitragen und folglich diese Art der RNA-Assoziation von

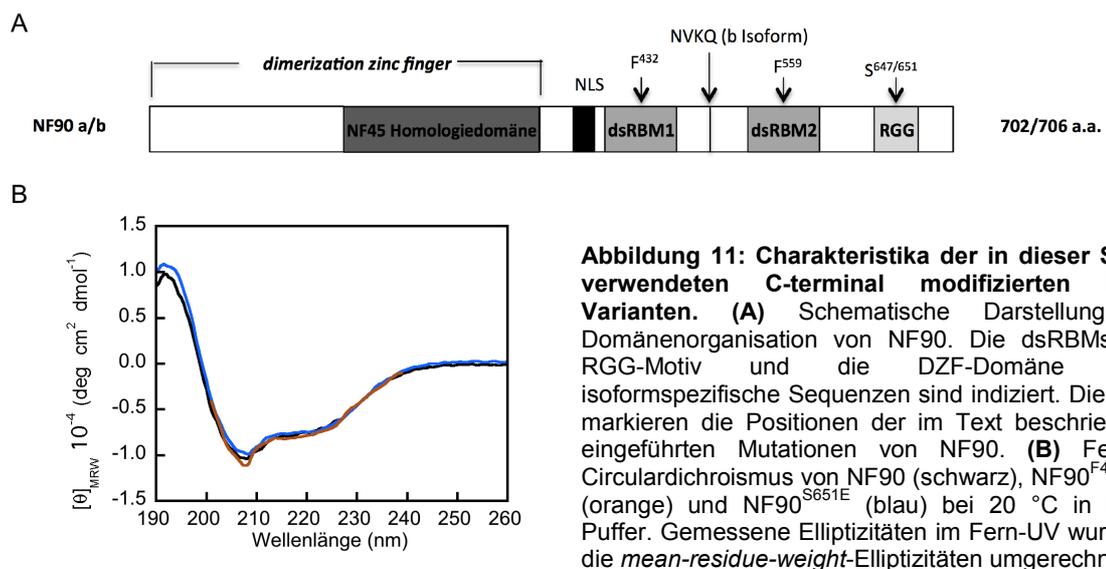


Tabelle 9. RNA-Bindungsparameter C-terminal modifizierter NF90-Varianten

	ssRNA-1 (nM)	m (kcal L mol ⁻²)	dsRNA-1 (nM)	m (kcal L mol ⁻²)	dsRNA-2 (nM)	m (kcal L mol ⁻²)
NF90	1200 ± 49	-24.8 ± 2.5	160 ± 19	-12.8 ± 2.0	3 ^a	-8.1 ± 0
NF90 ^{F432, 559A}	1800 ± 130	-22.1 ± 3.7	1800 ± 170	-15.9 ± 0.1	27 ± 1.5	-23.8 ± 3.6
NF90 ^{S651E}	1100 ± 78	-16.5 ± 1.7	500 ± 22	-20.3 ± 2.3	170 ± 21	2.1 ± 1.1 ^b -13.7 ± 1.5 ^c

^a Extrapolation auf 100 mM NaCl

^{b,c} Hier wurden zwei Bindungsmodi in Abhängigkeit der Ionenstärke festgestellt (siehe Text).

NF90^{F432, 559A} durch den C-Terminus des Proteins realisiert wird. Der beobachtete Bindungsmodus der Variante an dsRNA korreliert dabei mit den oben ermittelten Beiträgen ionischer Art des RGG-Motivs zur RNA-Bindung.

An dieser Stelle kann festgehalten werden, dass die Mutation der dsRBMs und die Deletion des C-Terminus von NF90 die dsRNA-Bindung des Proteins beeinträchtigt. Somit prägen die RNA-bindenden Motive von NF90 individuelle Bindungsaktivitäten aus und tragen in konzertierter Weise zur RNA-Bindung bei.

3.1.7 Die Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs von NF90 moduliert den gesamten RNA-Bindungsprozess

Zur weiteren Untersuchung einer Kooperativität der RNA-bindenden Motive von NF90 wurde eine pseudophosphorylierte Variante NF90^{S651E} hergestellt (**Abb. 11A**), die im RGG-Motiv an Serin-651 nach Pei *et al.* modifiziert wurde (28). Die Autoren konnten zeigen, dass die Phosphorylierung von Ser651 zur cytoplasmatischen Anreicherung von NF90 führt und für die Stabilisierung der Interleukin-2 mRNA essentiell war (**Tabelle 1**). Dabei induzierte die Pseudophosphorylierung von Ser651 dieselben Effekte *in cellulo*. Im Rahmen des vollständigen NF90 wurde daher erwartet, dass diese Modifikation die Funktion des RGG-Motivs verändert und somit weitere Hinweise auf eine Kooperativität der RNA-bindenden Motive des Proteins liefert. Wie bei den anderen generierten NF90-Varianten, konnte durch die Mutationen keine signifikante Veränderung in der Struktur von NF90 festgestellt werden (**Abb. 11C**).

Interessanterweise war die Affinität von NF90^{S651E} zu ssRNA-1 unter Standardbedingungen im Vergleich zu NF90wt kaum verändert (**Tabelle 9**). Im Gegensatz dazu konnte eine geringere Affinität der Bindung von NF90^{S651E} an dsRNA-1 im Vergleich zu NF90wt festgestellt werden ($K_D = 500 \text{ nM}$ vs. 160 nM NF90wt). Somit wirkte sich die Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs ähnlich wie die Deletion dieser Region (NF90 Δ C63) negativ auf die Bindung von dsRNA-1 an NF90 aus und bestätigt, dass das RGG-Motiv zusammen mit den dsRBMs zur Bindung beiträgt.

Die Analyse der Bindungsmodi der pseudophosphorylierten Variante NF90^{S651E} ergab weitere Erkenntnisse zur Bindung von RNA an NF90. So führte die Modifikation im Vergleich zu NF90wt zu einer Zunahme des m -Werts der Assoziation an ssRNA-1 (**Tabelle 9**). Daraus ergibt sich ein Bindungsmodus dieser Variante an ssRNA-1, der im Vergleich zu NF90wt durch einen größeren Anteil an hydrophoben Interaktionen charakterisiert ist. Dagegen konnte eine Abnahme des m -Werts bei der Bindung der Variante an dsRNA-1 im Vergleich zu NF90wt festgestellt werden (**Tabelle 9**). Daraus konnte ein größerer Beitrag ionischer Wechselwirkungen für die Variante bei Bindung von dsRNA-1 als in NF90wt abgeleitet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die

Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs von NF90 zu einem deutlich veränderten Bindungsmodus des Proteins zu ssRNA-1 und dsRNA-1 führte.

Die größten Veränderungen wurden bei der Bindung von NF90^{S651E} an dsRNA-2 deutlich. Hier wurde im Vergleich zu NF90wt die größte Verminderung von ca. Faktor 50 der Affinität zu dsRNA-2 gemessen ($K_D = 170$ nM vs. 3 nM von NF90wt, **Tabelle 9**). Darüber hinaus folgte die Abhängigkeit der Affinität der Variante an dsRNA-2 von der NaCl-Konzentration keiner Linearität. Vielmehr konnten zwei von der Ionenstärke abhängige Bindungsmodi ermittelt werden, die auf eine sich ändernde Zusammensetzung der individuellen Beiträge der RNA-bindenden Motive von NF90 zur RNA-Bindung hinweisen. Bei NaCl-Konzentrationen unterhalb von 200 mM führte die Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs im Vergleich zu NF90wt zu einer deutliche Zunahme des m -Werts (**Tabelle 9**). Der Bindungsmodus an dsRNA-2 umfasste unter diesen Bedingungen somit einen sehr hohen Anteil an hydrophoben Interaktionen. Bei NaCl-Konzentrationen größer als 200 mM war der m -Wert der Assoziation von NF90^{S651E} an dsRNA-2 geringer als bei NF90wt (**Tabelle 9**). Hier ergab sich ein Bindungsmodus, der im Vergleich zu NF90wt und zur Situation bei geringeren Konzentrationen an NaCl einen deutlich stärkeren Anteil an ionischen Wechselwirkungen beinhaltete.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs den gesamten RNA-Bindungsmodus von NF90 deutlich verändert. Dieses Ergebnis untermauert eine zentrale Bedeutung des C-Terminus bzw. des RGG-Motivs von NF90 im Prozess der RNA-Bindung. Damit wird auch belegt, dass ein kooperativer RNA-Bindungsmodus der RNA-bindenden Motive in NF90 vorliegt.

3.1.8 Die Pseudophosphorylierung von Ser651 verändert die Konformationseigenschaften der RGG-Region

Im vorangegangenen Experiment wurden bei der Assoziation der pseudophosphorylierten Variante NF90^{S651E} an dsRNA-2 zwei von der Ionenstärke abhängige Bindungsmodi ermittelt. Eine Erklärung dafür können Konformationsänderungen der Variante unter diesen Bedingungen darstellen.

Um diesen Aspekt zu prüfen, wurden der Circular dichroismus und die intrinsische Fluoreszenz der Variante NF90^{S651E} bei den Konzentrationen an NaCl untersucht, die auch während der RNA-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Im Spektrum der intrinsischen Fluoreszenz der Variante NF90^{S651E} wurde unter Standardbedingungen eine leicht stärkere Bande der Tyrosin-Fluoreszenz um 303 nm als in NF90wt sichtbar (**Abb. 12A**). Aus der Primärstruktur von NF90 geht hervor, dass vier Tryptophane im N-terminalen Teil des Proteins und sieben der 15 Tyrosine C-terminal des RGG-Motivs lokalisiert sind (s. Anhang 7.5). Diese C-terminale Region inklusive des RGG-Motivs fehlt in der Variante NF90 Δ C63. Interessanterweise konnte

mit dieser Variante im Vergleich zu NF90wt und NF90^{S651E} keine derart ausgeprägte Tyrosinbande im Fluoreszenzspektrum beobachtet werden (**Abb. 12A**). Somit ist die gesamte Bande um 303 nm auf die Präsenz der C-terminalen Tyrosine zurückzuführen. Für die pseudophosphorylierte Variante NF90^{S651E}, wo diese Bande stärker ausgeprägt war, kann daraus geschlossen werden, dass im Vergleich zu NF90wt ein schwächerer FRET zwischen den C-terminalen Tyrosinen und den N-terminalen Tryptophanen ausgeprägt ist. Daraus kann gefolgert werden, dass in NF90^{S651E} eine größere Distanz zwischen diesen Resten oder eine andere Orientierung als in NF90wt vorliegt. Interessanterweise konnte mit der pseudophosphorylierten Variante auch eine zunehmende Ausprägung der Tyrosinbande mit steigender Ionenstärke des Puffers festgestellt werden (**Abb. 12B**). Daraus kann geschlossen werden, dass die erhöhte Ionenstärke den Abstand zwischen den N-terminalen Tryptophanen und den C-terminalen Tyrosinen vergrößert. Darüber hinaus zeigten auch die Analysen des Circular Dichroismus dieser Variante, dass Konformationsänderungen in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration eintraten. Bei NF90wt konnten diese nicht beobachtet werden (**Abb. 12C, D**).

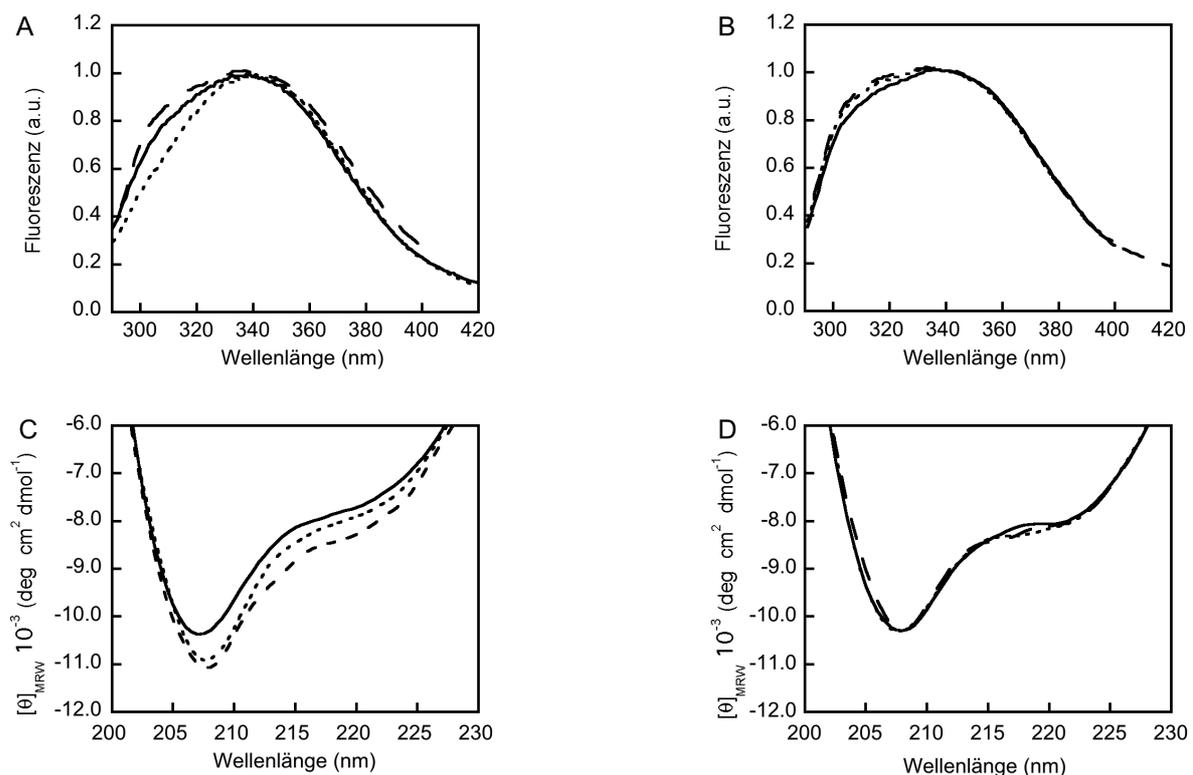


Abbildung 12: Die Pseudophosphorylierung des C-terminalen RGG-Motivs von NF90 verändert die Konformationseigenschaften des Proteins. (A) Intrinsische Fluoreszenz bei Anregung 280 nm (schwarz) von NF90 (voll), NF90^{S651E} (gestrichelt) und NF90ΔC63 (gepunktet) in NF90-Puffer. Spektren wurden auf die Fluoreszenzintensität bei 343 nm normiert. **(B)** Intrinsische Fluoreszenz von NF90^{S651E} in NF90-Puffer, der 100 mM (voll), 200 mM (gepunktet) oder 300 mM NaCl (gestrichelt) enthielt. Die Anregung wurde bei 280 nm durchgeführt und die erhaltenen Spektren auf die Fluoreszenzintensität bei 343 nm normiert. **(C)** Fern-UV Circular Dichroismus von NF90^{S651E} und **(D)** NF90wt in NF90-Puffer, der 100 mM (voll), 200 mM (gepunktet) und 300 mM NaCl (gestrichelt) enthielt. Die gemessenen Elliptizitäten wurden in die MRW-Elliptizitäten umgerechnet. Alle Messungen erfolgten bei 20 °C.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs die Konformationseigenschaften der C-terminalen Region verändert. Da die Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs auch mit deutlich veränderten RNA-Bindungseigenschaften korrelierte, kann geschlussfolgert werden, dass zwischen den Konformationseigenschaften des C-Terminus und der RNA-Bindung des Proteins ein Zusammenhang besteht.

3.1.9 Die Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs blockiert Konformationsänderungen von NF90, die durch RNA-Bindung induziert werden

Oft führt die Interaktion eines Proteins mit einem Liganden zu strukturellen Transitionen der Bindungspartner. In nachfolgenden Experimenten wurde daher der Einfluss der Bindung von dsRNA-1 bzw. ssRNA-1 auf die Sekundärstruktur von NF90wt sowie der Variante NF90^{S651E} mittels Circular dichroismus analysiert.

In diesem Fall ist für eine Aussage über Strukturveränderungen der Proteinkomponente durch die RNA-Bindung essentiell, dass die Nukleinsäure im Bereich der Absorption der Peptidbindung keinen eigenen CD induziert. Um dies zu überprüfen, wurden zunächst CD-Spektren der Proteine und der RNAs im ungebundenen Zustand aufgenommen. Anschließend wurde das Summenspektrum aus den individuellen NF90-Varianten und den RNA-Substraten (**Abb. 13**, rot und blau gepunktet) mit dem Spektrum des ungebundenen Proteins (schwarz) verglichen (z.B. NF90wt + ssRNA-1 im Vergleich zu NF90wt). Es zeigte sich, dass die entsprechenden Spektren nur im Wellenlängenbereich $\lambda > 200$ nm deckungsgleich waren. Daher konnte ausgeschlossen werden, dass die eingesetzten RNAs in diesem Wellenlängenbereich einen CD aufweisen (**Abb. 13**). Somit konnte dieser Wellenlängenbereich zur Strukturanalyse der Protein-RNA-Interaktion herangezogen werden.

Für die folgenden Analysen wurde nun der gemessene Binärkomplex Protein-RNA mit dem entsprechenden Spektrum aus der Summe der Einzelkomponenten verglichen. Dabei auftretende Signalunterschiede waren aus oben genannten Gründen unmittelbar auf Strukturveränderungen in der Proteinkomponente zurückzuführen.

Die Bindung der ssRNA-1 an NF90wt führte zur Abnahme des Signals im Wellenlängenbereich 200 – 230 nm (**Abb. 13A**). Noch deutlicher war die Abnahme der Signalintensität in diesem Bereich durch die Assoziation von dsRNA-1 an NF90wt. Im Gegensatz dazu führte die Assoziation von ssRNA-1 und dsRNA-1 an die pseudophosphorylierte Variante NF90^{S651E} nur zu marginalen Veränderungen der Signalintensitäten (**Abb. 13B**). Damit weisen die CD-Spektren der Binärkomplexe von NF90^{S651E} mit ssRNA-1 und dsRNA-1 hohe Übereinstimmung zum Spektrum des ungebundenen NF90^{S651E} und somit auch zu NF90wt auf. Das lässt vermuten, dass die

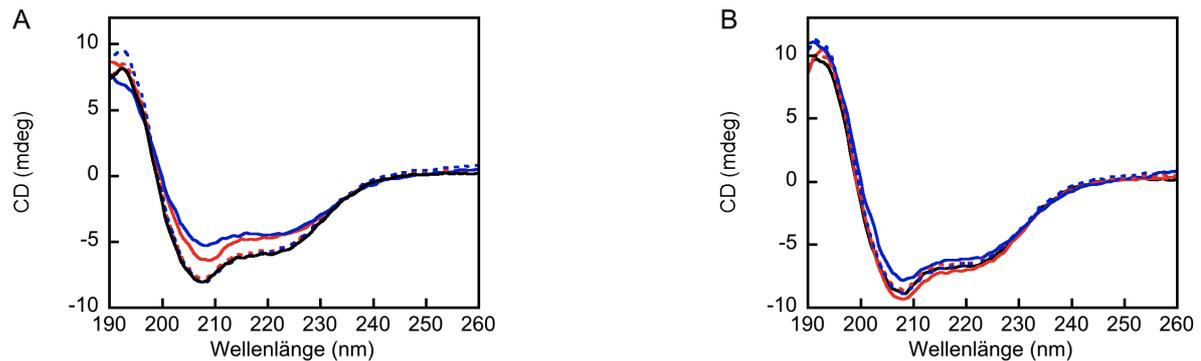


Abbildung 13: RNA-Bindung induziert Konformationsänderungen in NF90. Fern-UV Circular Dichroismus von (A) NF90 und (B) NF90^{S651E} (schwarz) sowie der Binärkomplexe mit ssRNA-1 (rot) und dsRNA-1 (blau). Die Summe aus den individuellen Komponenten NF90wt bzw. NF90^{S651E} und ssRNA-1 (rot) bzw. dsRNA-1 (blau) sind gepunktet dargestellt. Die Binärkomplexe wurden durch Inkubation der RNA mit dem Protein in äquimolarem Verhältnis generiert (10 – 13 μ M). Alle Messungen erfolgten bei 20 °C in NF90-Puffer.

Pseudophosphorylierung des C-Terminus von NF90 die Region in einer Konformation fixiert, die dem ungebundenen Zustand entspricht.

Die Ergebnisse zeigen, dass Konformationsänderungen von NF90, die durch eine RNA-Bindung induziert werden, durch die Pseudophosphorylierung des Ser651 des RGG-Motivs von NF90 blockiert werden. Somit wird die wichtige Rolle des RGG-Motivs im Prozess der RNA-Bindung von NF90 weiter herausgestellt. Weiterhin wird bestätigt, dass sich allgemein diese Pseudophosphorylierung deutlich auf die RNA-Bindungseigenschaften von NF90 auswirkt.

3.1.10 NF90^{S651E} bindet selektiv an RNA-Konformationen

Um die Rolle des C-Terminus von NF90 sowie die Auswirkungen von dessen Pseudophosphorylierung weiter zu analysieren, wurde die Kinetik der Bindung von ssRNA-1 und dsRNA-1 von NF90wt und NF90^{S651E} untersucht. Für diesen Zweck wurde eine *stopped-flow*-Technik mit Fluoreszenz angewandt. Dabei wurden die 5'-FAM-EX-markierten RNAs schnell mit verschiedenen Konzentrationen des Proteins vermischt und die zeitabhängige Änderung der FAM-EX-Fluoreszenz aufgezeichnet.

Bei der Reaktion von NF90wt mit beiden RNA-Substraten konnte die zeitabhängige Veränderung des Fluoreszenzsignals nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Abnahme der Fluoreszenz nach der Mischung der Komponenten erfolgte hier innerhalb der Totzeit des Gerätes (1 ms). Die Amplitude dieser Phase nahm mit zunehmender Konzentration von NF90wt zu, was auf eine sehr schnelle RNA-Bindung durch NF90wt hinwies. Die Reaktion konnte weder durch geringere Temperaturen, noch durch Variationen der Substratkonzentration so verlangsamt werden, dass eine Messung der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz erfolgen konnte. Das gleiche Experiment wurde nun mit der C-terminal pseudophosphorylierten Variante NF90^{S651E} durchgeführt. In diesem Fall war eine Messung der zeitabhängigen Änderung des Fluoreszenzsignals möglich (**Abb. 14A**).

I) Bei Verwendung der **dsRNA-1** verlief der Bindungsprozess über zwei Phasen. Aus diesem Grund erfolgte der Fit der Progresskurven nach einer doppelt-exponentiellen Kinetik (Gleichung 8, s. 2.7), um die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Phasen zu quantifizieren. Die ermittelten Konstanten der ersten Phase folgten einer linearen Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (**Abb. 14B**). Mittels Gleichung 9 (s. 2.7) konnte eine Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung von $k_{on} = 1.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden (**Tabelle 10**). Die Konstanten der zweiten Phase der Reaktion zeigten keine Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration. Diese Phase verlief mit einer Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung von $k_1 = 0.025 \text{ s}^{-1}$. Zusammenfassend kann auf ein Reaktionsmodell geschlossen werden, bei dem im ersten Schritt der Reaktion die Bindung der dsRNA-1 durch NF90^{S651E} über die Bildung des initialen Binärkomplexes (dsRNA-1:NF90^{S651E}) erfolgt. Daran schließt sich im zweiten Schritt ein intramolekulares Ereignis an.

II) Der Bindungsprozess der **ssRNA-1** durch NF90^{S651E} wird dagegen durch zwei verschiedene Reaktionsmodelle beschrieben, die von der Proteinkonzentration abhängig waren (**Abb. 14B,D**). Bei Proteinkonzentrationen geringer als 200 nM folgten die Progresskurven einer einfach-exponentiellen Kinetik (Gleichung 7, s. 2.7, Modell I). Bei größeren Proteinkonzentrationen zeigte der Prozess hingegen eine doppelt-exponentielle Kinetik (Gleichung 8, Modell II). Das Modell II beschreibt dabei dieselbe Situation wie die Bindung der dsRNA-1 durch NF90^{S651E}. Es erfolgt zuerst die Assoziation der ssRNA-1 an das Protein, danach findet ein intramolekularer Reaktionsschritt statt. Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen nach diesem Modell waren in der gleichen Größenordnung wie die Konstanten der dsRNA-1-Bindung ($k_{on} = 5.4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_1 = 0.031 \text{ s}^{-1}$, **Tabelle 10**).

Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten im Modell I (NF90^{S651E}-Konzentrationen < 200 nM) zeigten eine hyperbole Abnahme mit zunehmender Proteinkonzentration (**Abb. 14C**). Dieses Phänomen kann eindeutig auf einen Reaktionsmechanismus zurückgeführt werden, der als *conformational selection* bezeichnet wird (**Abb. 14C**) (111). Nach Modell I der Aktivität von NF90^{S651E} wurde dieser Mechanismus angenommen und zur weiteren Untersuchung von k_{obs} verwendet (Gleichung 10, s. 2.7, (111)). Der *conformational-selection*-Mechanismus beschreibt allgemein, dass ein Bindungspartner selektiv eine spezifische, bereits in der Lösung vorliegende Konformation des Liganden assoziiert. Im Fall der Bindung von NF90^{S651E} an ssRNA-1 konnte aufgrund des experimentellen Ansatzes ausgeschlossen werden, dass ssRNA-1 an eine spezifische Konformation des Proteins bindet (s. Diskussion 4.1.5). Folglich assoziierte NF90^{S651E} selektiv an eine bestimmte Konformation der ssRNA-1. Unter Verwendung dieses Modells approximiert k_{obs} asymptotisch mit zunehmender Proteinkonzentration zu $k_{obs} < 0.01 \text{ s}^{-1}$ (k_r , **Abb. 14C,D, Tabelle 9**). Entsprechend des *conformational-selection*-

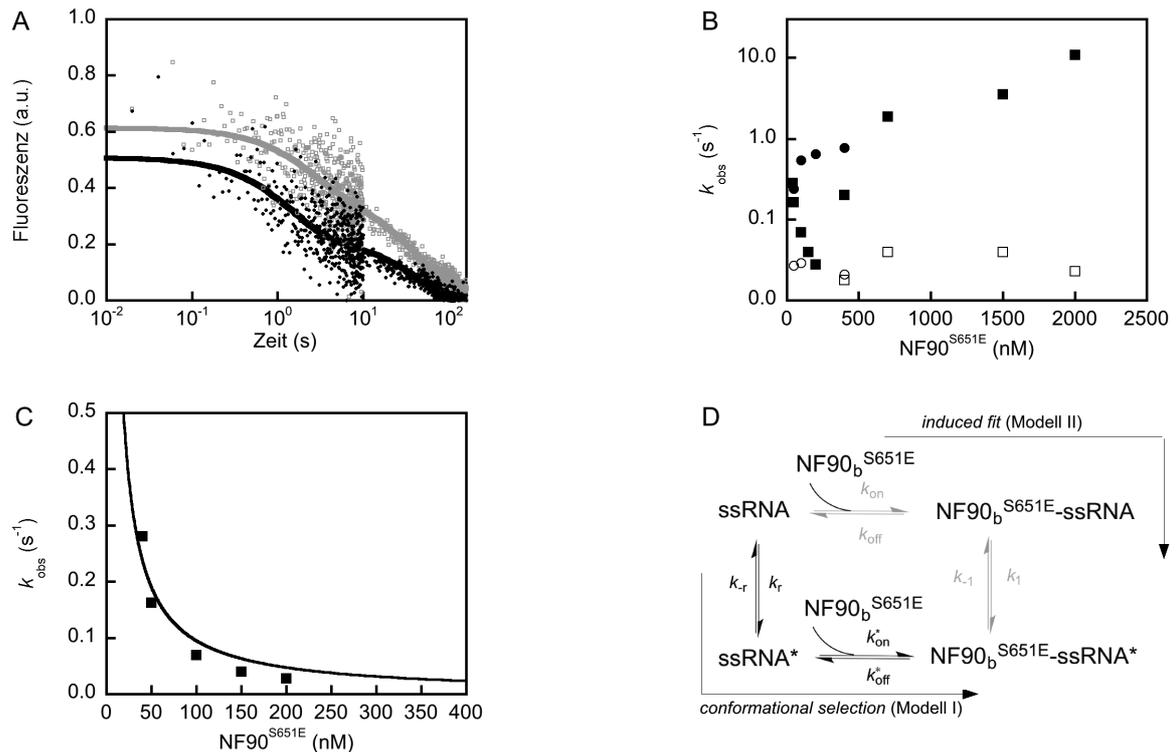


Abbildung 14: Kinetik der RNA-Bindung von NF90^{S651E}. (A) Progresskurven der Bindung von 100 nM (grau) und 400 nM (schwarz) NF90^{S651E} an dsRNA-1. Die Kurven wurden normalisiert und der Gleichung 8 angepasst. Alle Messungen erfolgten bei 20 °C in NF90-Puffer. (B) Kinetische Analyse der Bindung von ssRNA-1 (k_1 , k_2 volle bzw. offene Quadrate) und dsRNA-1 (k_1 , k_2 volle bzw. offene Kreise) an NF90^{S651E}. Die Phase 1 der Kinetik der Bindung von ssRNA-1 wurde nach einer einfach-exponentiellen und die Phase 2 nach einer doppelt-exponentiellen Reaktion 1. Ordnung analysiert (Gleichungen 7 und 8, s. 2.7). Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. (C) Das gleiche Experiment wie Bild (A) mit Fokus auf Phase I der Bindung von ssRNA-1. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten wurden über einen *conformational-selection*-Mechanismus analysiert (Gleichung 10, s. 2.7). Die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten sind in **Tabelle 10** zusammengefasst. (D) Reaktionsschema der Bindung von NF90^{S651E} an ssRNA über einen *conformational-selection* und *induced-fit* Mechanismus. Sterne (*) markieren eine bestimmte Konformation der RNA. Reaktionswege in grau sind sensitiv gegenüber der Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs von NF90.

Tabelle 10. Kinetik der RNA-Bindung von NF90^{S651E}

	k_r (s ⁻¹)	$k_r + k_{-r}$ oder k_{off}^* (s ⁻¹)	k_{on} (10 ⁶ M ⁻¹ s ⁻¹)	k_1 (s ⁻¹)	K_D (nM)
ssRNA-1	< 10 ⁻²	> 10 ¹	5.4 ± 1.3	0.031 ± 0.005	-
dsRNA-1	-	0.31 ± 0.07	1.2 ± 0.3	0.025 ± 0.002	258 ± 87

* Für ssRNA-1 keine Zuordnung möglich

Mechanismus ist dieser Wert die Geschwindigkeitskonstante der Umwandlung von ssRNA-1 in diejenige spezifische Konformation, die von NF90^{S651E} selektiv gebunden wird. Aufgrund der wenigen Datenpunkte konnte den verbleibenden Parametern des Modells (k_{off} und $k_r + k_{-r}$) kein präziser Wert zugeordnet werden.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Bindung von ssRNA-1 und dsRNA-1 an NF90^{S651E} über unterschiedliche Mechanismen, aber mit mindestens einer

intramolekularen Umwandlung und ähnlichen Geschwindigkeitskonstanten verläuft. Das Verhalten der ssRNA-1-Bindung durch NF90^{S651E} kann durch eine Partitionierung von Reaktionsmechanismen beschrieben werden (**Abb. 14D**, s. Diskussion 4.1.5). Der *conformational-selection*-Mechanismus zeigt, dass NF90^{S651E} selektiv an eine bestimmte RNA-Konformation bindet und somit Konformationsgleichgewichte der ssRNA beeinflusst.

3.2 Charakterisierung von NF90-NF45

Vor der Herstellung des Komplexes NF90-NF45 wurde zunächst NF45 präpariert. Das Protein fiel ebenso wie NF90 in der *inclusion body*-Fraktion von *E. coli* an und wurde dementsprechend unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Die Reinigung des Proteins erfolgte über mehrere chromatographische Schritte und wurde von PD Dr. Ralph Peter Golbik (MLU Halle-Wittenberg) und Dipl.-Biochemiker Paul Knick (ehem. MLU Halle-Wittenberg) etabliert. Für die Rückfaltung von NF45 konnte dieselbe Strategie wie für NF90 angewandt werden. Auf die initiale Charakterisierung des renaturierten NF45 wird ausführlicher im Anhang 7.2.1 eingegangen. An dieser Stelle soll nur darauf hingewiesen werden, dass das renaturierte NF45 im NF90-Puffer als Monomer vorlag, und in Übereinstimmung mit Literaturdaten (4) NF45 keine RNA-Bindung zeigte.

3.2.1 Rekonstitution des Komplexes NF90-NF45

In ersten Ansätzen erfolgte die Komplexbildung von NF90-NF45 durch Inkubation beider renaturierter Monomere in NF90-Puffer. Überschüssige Monomere wurden durch eine Größenausschlusschromatographie abgetrennt. Eine Steigerung der Ausbeute konnte erreicht werden, indem die Proteine im denaturierten Zustand gemischt und anschließend über die bereits bei den Monomeren erfolgreich eingesetzte *rapid-dilution-pulse-refolding*-Technik zusammen renaturiert wurden. Die Präparation des Komplexes erfolgte dann analog der Reinigung der Einzelkomponenten und wurde über eine 10%ige SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert und war frei von Verunreinigungen (**Abb. 15A**). Die Proteinkonzentration wurde spektroskopisch bestimmt. Der Quotient der Absorptionen bei 280 bzw. 260 nm betrug mindestens 1.8 und indizierte somit keine Kontamination durch Nukleinsäuren (**Abb. 15B**). Der Oligomierzustand des Komplexes wurde durch analytische Ultrazentrifugation im NF90-Puffer untersucht und mit dem Komplex verglichen, der durch Inkubation der renaturierten Monomere erhalten wurde. In beiden Fällen wurde der Komplex als Heterodimer identifiziert (**Abb. 15C**, durchgeführt von PD Dr. Hauke Lilie, MLU Halle-Wittenberg).

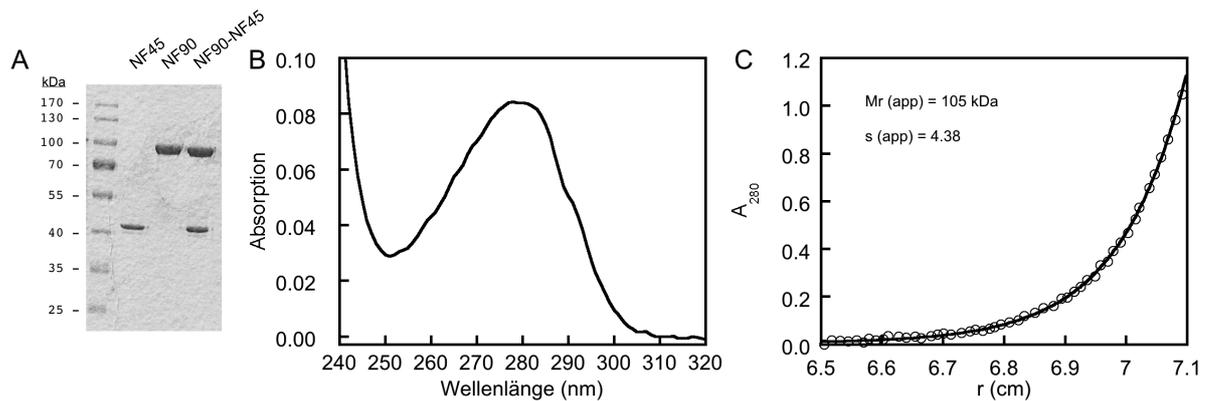


Abbildung 15: Rekonstitution von NF90-NF45. (A) Das gereinigte NF90, NF45 und der rekonstituierte Komplex NF90-NF45 wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend Coomassie gefärbt. Das Molekulargewicht der Markerbanden ist gekennzeichnet. (B) UV-Absorptionsspektrum des Komplexes NF90-NF45. (C) Analytische Ultrazentrifugation von rekonstituiertem NF90-NF45. Das Sedimentationsgleichgewicht von NF90-NF45 wurde in NF90-Puffer verfolgt. Die lokale Proteinkonzentration wurde bei 280 nm in Abhängigkeit vom Radius (r) bestimmt. Die Auswertung erfolgte nach der Svedberg-Gleichung.

3.2.2 Die Heterodimerisierung von NF90-NF45 führt zu Sekundärstrukturänderungen in den Proteinen

Nach der erfolgreichen Rekonstitution des Komplexes NF90-NF45 wurde das Heterodimer auf strukturelle und funktionale Veränderungen gegenüber dem NF90-Monomer untersucht. Zunächst sollten die strukturellen Eigenschaften über Circular dichroismus und die intrinsische Fluoreszenz des Komplexes analysiert werden. Im Allgemeinen wies der Fern-UV CD des Komplexes die gleichen Charakteristika wie NF90 bzw. NF45 auf (**Abb. 16A**). Berechnungen mit dem Programm K2D2 (117) ergaben einen α -helikalen und β -Faltblatt-Anteil von jeweils 18 %, die aber einen großen Fehler in der Abschätzung enthielten (Daten nicht gezeigt). Um nun mögliche Konformationsänderungen von NF90 und NF45 durch die Komplexbildung zu identifizieren, wurden der Nah- bzw. der Fern-UV Circular dichroismus des Heterodimers mit berechneten Spektren verglichen, die dem Circular dichroismus einer äquimolaren Mischung der Monomere (ohne Komplexbildung) im Nah- bzw. Fern-UV Circular dichroismus entsprachen (**Abb. 16A**). Differenzen zwischen den gemessenen und berechneten Spektren waren dann auf Sekundärstrukturänderungen in den individuellen Proteinen durch die Komplexbildung zurückzuführen. Im Wellenlängenbereich $\lambda > 200$ nm war der berechnete Circular dichroismus der Mischung mit dem Spektrum des Komplexes nahezu identisch (**Abb. 16A**). Im Wellenlängenbereich < 200 nm zeigte der Komplex dagegen einen schwächeren und bathochrom verschobenen CD im Vergleich zum Signal der (berechneten) Mischung. Entsprechend der obigen Betrachtung gehen diese Differenzen auf Strukturänderungen in NF90 oder NF45 infolge der Heterodimerisierung beider Proteine zurück.

Weiteren Aufschluss über Strukturänderungen sollte die intrinsische Fluoreszenz des Komplexes ergeben. Dazu wurden ebenfalls berechnete Referenzspektren erstellt, die einer äquimolaren Mischung der Monomere (ohne Komplexbildung) entsprachen (**Abb. 16B, C**, violett). Sowohl die Fluoreszenzanregung bei 280 nm als auch bei 295 nm ergab ein Spektrum mit deutlich geringeren die Fluoreszenzintensitäten des Komplexes im Vergleich zum Referenzspektrum. Die Position des Maximums der Trp-Fluoreszenz des Komplexes war im Vergleich zum berechneten Spektrum hypsochrom um 3 nm verschoben (**Abb. 16C**). Aus diesen Aspekten konnte geschlossen werden, dass sich die Mikroumgebung bestimmter Tryptophane durch die Komplexbildung so geändert hatte, dass sie in einem Quenching von Tryptophanen resultiert. Die Bande der für NF90 beschriebenen FRET-entkoppelten, C-terminalen Tyrosine um 303 nm war im Spektrum des Komplexes enthalten.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass die Komplexbildung von NF90 mit NF45 zu Strukturveränderungen in den Proteinen führt. Dabei wird die Mikroumgebung bestimmter Tryptophane verändert.

3.2.3 Die Heterodimerisierung von NF90-NF45 induziert eine thermodynamische Stabilisierung beider Proteine gegenüber den jeweiligen Monomeren

Als Nächstes sollte die Frage geklärt werden, ob sich die beobachteten Strukturveränderungen von NF90 und NF45 durch deren Heterodimerisierung auf die thermodynamische Stabilität der Proteine auswirken. Dazu wurden nun zusätzlich zu NF90 die chemische Denaturierung von NF45 und NF90-NF45 analysiert und alle miteinander verglichen. Wie bei NF90 wurde die Denaturierung der Proteine mit einem Denaturansgemisch aus GuHCl/Harnstoff induziert und optisch über den Circular dichroismus bei 225 nm verfolgt.

Wie NF90 wiesen auch NF45 und NF90-NF45 eine zweistufige Transitionskurve auf, welche jeweils die Akkumulation eines Intermediats im Gleichgewicht andeutete (**Abb. 16D, Tabelle 11**). NF90 und NF45 zeigten einen identischen Verlauf des ersten Übergangs mit $D_{50\%}^{N-I} = 0.46$ M Denaturans. Für NF45 wurde eine thermodynamische Stabilität der beteiligten Strukturelemente von $\Delta G_{N-I}^0 = 1.59 \pm 0.27$ kcal mol⁻¹ ermittelt. Die zweite Transition von NF45 war im Vergleich zu NF90 deutlich zu höheren Denaturanskonzentrationen verschoben ($D_{50\%}^{I-U} = 5.73$ M Denaturans). Die in diesem Übergang involvierten Strukturelemente von NF45 wiesen eine um ca. 0.5 kcal mol⁻¹ höhere Stabilität als die von NF90 auf ($\Delta G_{I-U}^0 = 2.92 \pm 0.06$ kcal mol⁻¹). Die gesamte thermodynamische Stabilität von NF45 betrug damit $\Delta G_{U-N}^0 = 4.51 \pm 0.27$ kcal mol⁻¹.

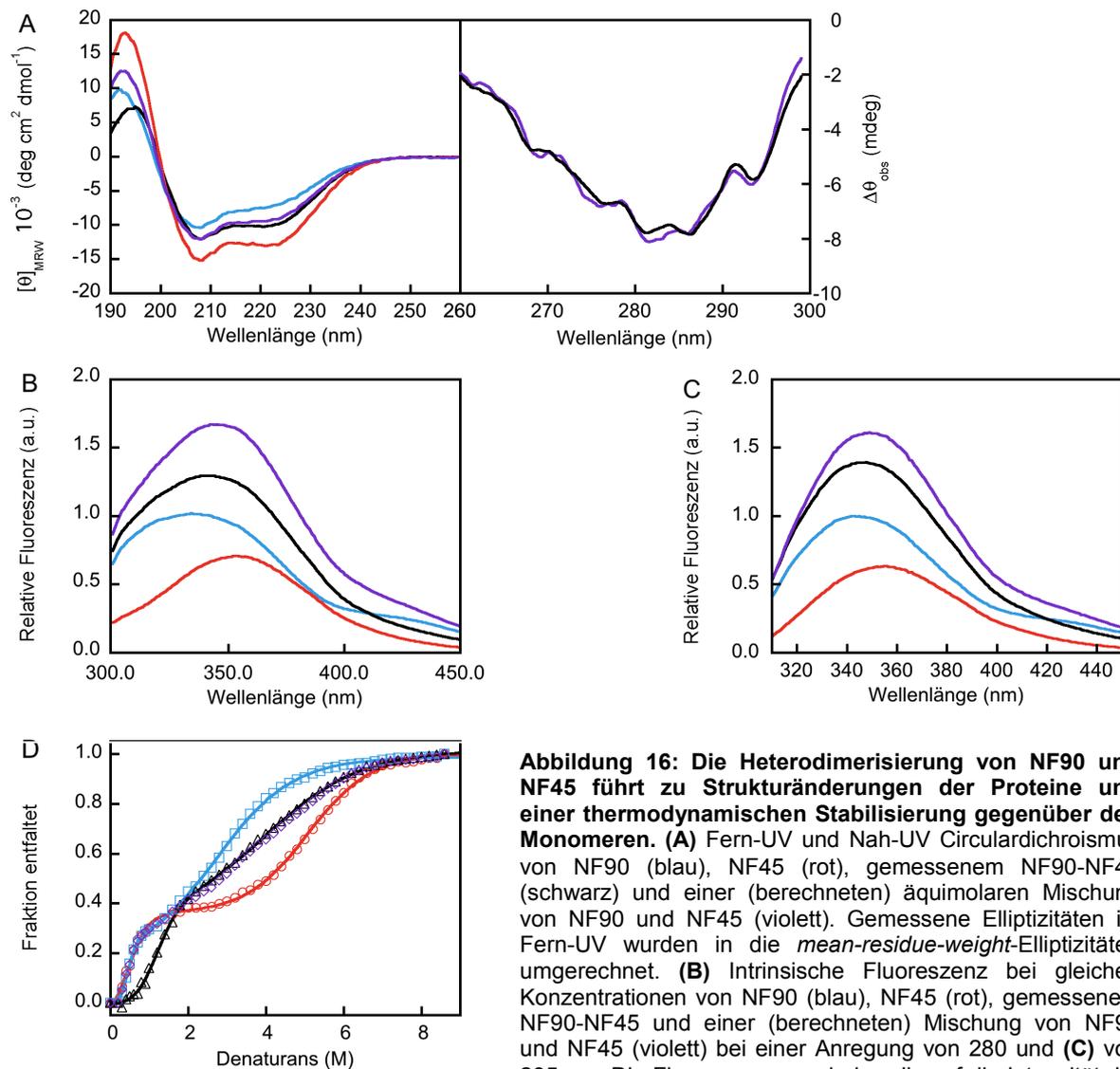


Abbildung 16: Die Heterodimerisierung von NF90 und NF45 führt zu Strukturänderungen der Proteine und einer thermodynamischen Stabilisierung gegenüber den Monomeren. (A) Fern-UV und Nah-UV Circular dichroismus von NF90 (blau), NF45 (rot), gemessenem NF90-NF45 (schwarz) und einer (berechneten) äquimolaren Mischung von NF90 und NF45 (violett). Gemessene Elliptizitäten im Fern-UV wurden in die *mean-residue-weight*-Elliptizitäten umgerechnet. **(B)** Intrinsische Fluoreszenz bei gleichen Konzentrationen von NF90 (blau), NF45 (rot), gemessenem NF90-NF45 und einer (berechneten) Mischung von NF90 und NF45 (violett) bei einer Anregung von 280 und **(C)** von 295 nm. Die Fluoreszenz wurde jeweils auf die Intensität der Emission bei 343 nm von NF90 normiert. **(D)** Chemische Denaturierung von NF90 (blau), NF45 (rot), gemessenem

NF90-NF45 (schwarz) und von einer (berechneten) Mischung von NF90 und NF45 (violett) mittels eines Denaturansgemisches aus GuHCl und Harnstoff. Die Proteine wurden in ansteigenden Denaturanskonzentrationen in NF90-Puffer für 24 h inkubiert und anschließend der Circular dichroismus bei 225 nm gemessen. Gemessene Elliptizitäten wurden in den Anteil des entfalten Proteins umgerechnet und gegen die Denaturanskonzentration aufgetragen. Zur Auswertung wurde Gleichung 2 den Daten angenähert (s. 2.5.3). Berechnete thermodynamische Parameter sind in **Tabelle 11** zusammengefasst. Alle Messungen erfolgten bei 20°C in NF90-Puffer.

Somit war NF45 um etwa 0.6 kcal mol⁻¹ stabiler als NF90. Interessanterweise war die Intermediat-Population bei NF45 über einen Bereich von etwa 2 M Denaturans deutlich signifikanter als bei NF90 ausgeprägt.

Der erste Übergang des Komplexes NF90-NF45 war im Vergleich zu NF90 und NF45 zu höheren Denaturanskonzentrationen verschoben ($D_{50}^{\text{N-I}} = 1.19$ M Denaturans, **Abb. 16D**, **Tabelle 11**). Außerdem entsprach der Verlauf auch nicht dem Übergang einer (berechneten) Mischung der beiden monomeren Proteine, bei der diese Proteine unabhängig von einander entfalten (**Abb. 16D**, violett). Zur Quantifizierung der

thermodynamischen Stabilität war es wichtig, den Oligomerzustand des Heterodimers während dieses Übergangs zu untersuchen. Hierzu wurden analytische Ultrazentrifugationen sowie Gelfiltrationen des Komplexes NF90-NF45 bei ansteigenden Harnstoff-Konzentrationen durchgeführt. Bei diesen Analysen musste auf GuHCl im Puffer verzichtet werden, da die Signalqualität GuHCl-haltiger Proben nicht ausreichend war. In Voruntersuchungen konnte festgestellt werden, dass die thermodynamischen Parameter der chemischen Denaturierung in Harnstoff zu denen in GuHCl/Harnstoff äquivalent waren (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde ermittelt, dass 1 M GuHCl/Harnstoff etwa 1.5 M Harnstoff entsprachen.

Tabelle 11. Thermodynamische Parameter der chemischen Denaturierung von NF90, NF45 und NF90-NF45

	Übergang	[D] _{50%} (M)	<i>m</i> (kcal L mol ⁻²)	$\Delta G_{a,b}^0$ (kcal mol ⁻¹)	ΔG_{U-N}^0 (kcal mol ⁻¹)
NF90	N-I	0.48 ± 0.07	3.06 ± 0.26	1.46 ± 0.18	3.94 ± 0.19
	I-U	2.85 ± 0.12	0.87 ± 0.03	2.48 ± 0.06	
NF45	N-I	0.46 ± 0.21	3.43 ± 0.40	1.59 ± 0.27	4.51 ± 0.27
	I-U	5.73 ± 0.04	0.51 ± 0.02	2.92 ± 0.06	
NF90-NF45	N-I	1.19 ± 0.07	2.05 ± 0.09	2.44 ± 0.12	

N, I, U – native, intermediärer, denaturierter Zustand

Die analytische Ultrazentrifugation und Gelfiltration des Komplexes belegten, dass bis 4 M Harnstoff (= 2.66 M GuHCl/Harnstoff in **Abb. 16D**) keine Dissoziation des Komplexes eintrat (**Abb. 17**). Daher wurde zur anschließenden Quantifizierung der thermodynamischen Stabilität des Heterodimers kein Modell verwendet, das die Konzentrationen der Proteine berücksichtigte.

Die thermodynamische Stabilität der an der ersten Transition des Komplexes involvierten Strukturelemente betrug somit $\Delta G_{N-I}^0 = 2.44 \pm 0.12 \text{ kcal mol}^{-1}$ (**Tabelle 11**). Damit war der Komplex NF90-NF45 um etwa $\Delta \Delta G_{N-I}^0 = 1.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ stabiler als die individuellen Monomere NF90 und NF45. Das belegte eine Stabilisierung von Strukturelementen von NF90 und NF45 durch deren Komplexbildung.

Der Verlauf der Denaturierung des Komplexes ab ca. 2 M Denaturans entsprach einer Mischung der Monomere (**Abb. 16D**, violett vs. schwarz). Dieser Befund indizierte, dass beide Proteine nach dem ersten Übergang unabhängig voneinander entfalteten und der Komplex möglicherweise dissoziiert vorlag. Daher kann an dieser Stelle keine Gesamtstabilität des Komplexes angegeben werden, da der reversible Assoziationsschritt von den Proteinkonzentrationen abhängig ist.

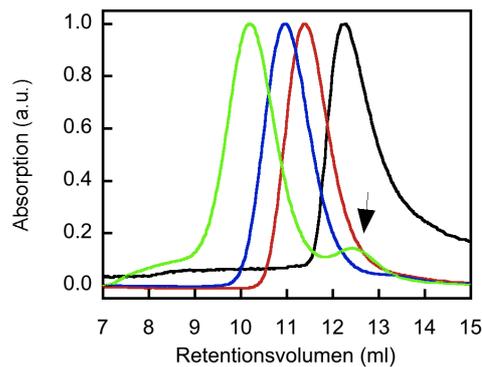


Abbildung 17: Strukturelle Integrität des NF90-NF45 Komplexes gegenüber Harnstoff. Analytische Gelfiltrationen von NF90-NF45 in 0 (schwarz), 1 (rot), 2 (blau) und 4 M Harnstoff (grün). Es wurde die Absorption bei 280 nm aufgezeichnet. Der Pfeil markiert ein bei 4 M Harnstoff auftretendes Dissoziationsprodukt des Komplexes.

Die erhaltenen Daten belegen somit, dass die Komplexbildung von NF90 mit NF45 zu einer thermodynamischen Stabilisierung bestimmter Strukturelemente beider Proteine um ca. 1 kcal mol^{-1} führt. Diese Tatsache zeigt die strukturelle Integrität des Komplexes. Es soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass zur Ermittlung der thermodynamischen Stabilität der Proteine nur für das NF90-Monomer die Rückfaltungstransition aufgezeichnet wurde. Dennoch wurde hier eine Quantifizierung der Daten von NF45 sowie NF90-Varianten unter Berücksichtigung folgender Aspekte als zulässig bewertet. I) Die grundlegende Reversibilität des Faltungsprozesses wurde bereits während der Präparation der Proteine demonstriert. Die Proteine wurden aus gereinigtem *inclusion-body*-Material in definierte homogene Zustände renaturiert. II) Zur Aufzeichnung der Faltungsübergänge betrug die Inkubationszeit der Proteine im Denaturans 24 h. Daher konnte ein Gleichgewichtszustand der Lösung zum Zeitpunkt der Messung angenommen werden. III) Die Messdaten des Komplexes im zweiten Übergang der Denaturierung entsprachen der Summe der Messdaten der individuellen Proteine (**Abb. 16D**). Diese Tatsache bestätigt den Gleichgewichtszustand aller Proteine in den Ansätzen.

3.2.4 Die Heterodimerisierung von NF90-NF45 verbessert die RNA-Bindungseigenschaften von NF90

Als Nächstes wurden funktionale Veränderungen in der RNA-Bindung analysiert, die infolge der NF90-NF45-Interaktion auftreten. Dazu wurden zunächst aktive-Zentren-Titrations des Komplexes mit dsRNA-1 und dsRNA-2 durchgeführt, um eine möglicherweise veränderte Stöchiometrie der Bindung zu analysieren. Ein Beitrag von NF45 zur RNA-Bindung konnte bereits ausgeschlossen werden (s. Anhang 7.2.1 und Referenz 5). Die Titrations wurden analog zu 3.1.2 durchgeführt und zeigten, dass der Komplex in einem äquimolaren Verhältnis mit den Nukleinsäuren assoziierte ($n = 1$, **Abb. 18A**). Eine höhere Stöchiometrie der RNA-Bindung des Komplexes im Vergleich zu monomerem NF90 konnte demnach ausgeschlossen werden. Anschließend wurde die RNA-Bindung von NF90-NF45 untersucht, indem die Affinitäten sowie der

Bindungsmodus des Komplexes zu den verschiedenen RNAs quantifiziert wurden. Dabei wurde dieselbe Strategie wie bereits bei den Untersuchungen des NF90-Monomer verfolgt (s. 3.1.3).

Interessanterweise zeigte der Komplex dabei im Vergleich zum Monomer im NF90-Puffer eine etwa 10fach stärkere Assoziation zu ssRNA-1 und dsRNA-1 (**Abb. 18B**, **Tabelle 12**). Somit führte die Heterodimerisierung von NF90-NF45 zu einer Steigerung der Affinität von NF90 zu diesen RNAs. Dagegen stimmte die Affinität des Komplexes zu dsRNA-2 mit der von NF90 überein.

Die Analyse der Bindungsmodi des Komplexes legte weitere Veränderungen in den Eigenschaften der RNA-Bindung von NF90 durch die Heterodimerisierung mit NF45 offen. Wie bei NF90 konnte zunächst zu jedem RNA-Substrat ein anderer Bindungsmodus des Komplexes bestimmt werden. Es wurde ermittelt, dass der m -Wert der Bindung (Bindungsmodus) an dsRNA-1 kleiner als der bei ssRNA-1 ($m = -23.1 \text{ kcal L mol}^{-2}$ vs. $-14.4 \text{ kcal L mol}^{-2}$ von ssRNA-1, **Tabelle 12**) war. Das indizierte somit einen größeren Anteil an ionischen Wechselwirkungen bei der Interaktion des Komplexes mit dsRNA-1 als bei der Bindung an ssRNA-1.

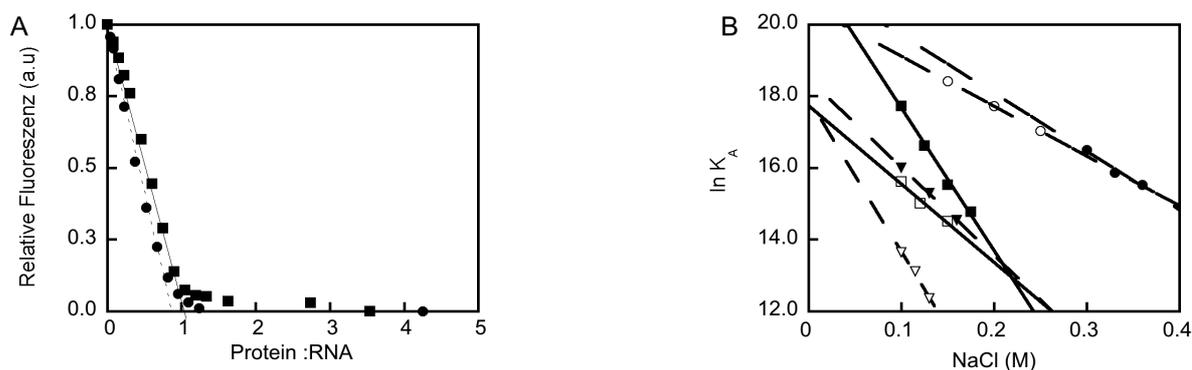


Abbildung 18: Die Heterodimerisierung von NF90-NF45 verbessert die RNA-Bindungs-eigenschaften von NF90. (A) Aktive Zentren-Titration der Bindung von NF90-NF45 von $1 \mu\text{M}$ dsRNA-1 (Kreis) bzw. dsRNA-2 (Quadrat). Die Molarität n der Bindung wurde durch die eingezeichneten Geraden graphisch zu $n = 1.0$ bestimmt. **(B)** Die Bindung von NF90 (leere Symbole) und NF90-NF45 (volle Symbole) an dsRNA-1 (Quadrat), dsRNA-2 (Kreis) und ssRNA-1 (Dreieck) wurde in NF90-Puffer bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ als Funktion der Natriumchlorid-Konzentration quantifiziert. Fluoreszenz-Daten wurden mittels Gleichung 3 ausgewertet (s. 2.6.2.2). K_A wurde logarithmiert, gegen die Natriumchlorid-Konzentration aufgetragen und anhand Gleichung 4 nach einer LFER beurteilt (s. 2.6.2.3). Die ermittelten Parameter sind in **Tabelle 12** zusammengefasst. Der m -Wert spiegelt den Bindungsmodus wider.

Tabelle 12. RNA-Bindungsparameter von NF90 und NF90-NF45

	ssRNA-1 (nM)	m (kcal L mol ⁻²)	dsRNA-1 (nM)	m (kcal L mol ⁻²)	dsRNA-2 (nM)	m (kcal L mol ⁻²)
NF90	1200 ± 49	-24.8 ± 2.5	160 ± 19	-12.8 ± 2.0	3 ^a	-8.1 ± 0
NF90-NF45	110 ± 9	-14.4 ± 0.4	20 ± 2	-23.1 ± 1.4	2 ^a	-9.4 ± 1.6

^a Extrapolation auf 100 mM NaCl

Der Vergleich der Bindungsmodi zwischen NF90 und NF90-NF45 zu dsRNA-1 bzw. ssRNA-1 zeigte eine Veränderung durch die Heterodimerisierung an. Die Komplexbildung von NF90 mit NF45 resultierte in einer Abnahme des m -Werts bei der Bindung an dsRNA-1 (höhere Sensitivität gegenüber der Ionenstärke, **Tabelle 12**). Daraus folgt, dass bei der Interaktion des Komplexes mit dsRNA-1 ein höherer Anteil ionischer Wechselwirkungen als bei der von NF90 involviert ist. Gegenteilig führte die Heterodimerisierung von NF90 mit NF45 aber zu einer Zunahme des m -Wertes der Bindung an ssRNA-1 (**Tabelle 12**). So ist bei der Bindung des Komplexes an ssRNA-1 im Vergleich zum Monomer ein größerer Anteil an hydrophoben Interaktionen beteiligt. Interessanterweise unterschieden sich die Bindungsmodi von NF90 und NF90-NF45 an dsRNA-2 nicht voneinander. Damit zeigten NF90 und NF90-NF45 an dsRNA-2 fast identische RNA-Bindungseigenschaften.

Diese Resultate verdeutlichen, dass die Heterodimerisierung von NF90 mit NF45 zu einer Veränderung der RNA-Bindungseigenschaften von NF90 führt. Das Heterodimer weist im Vergleich zum Monomer eine 10fach gesteigerte Affinität zu ssRNA-1 und dsRNA-1 auf. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Heterodimerisierung die Bindungsmodi von NF90 zu diesen RNAs signifikant verändert. Die zu den verschiedenen RNAs unterschiedlichen Bindungsmodi weisen darauf hin, dass der Komplex ebenso wie das Monomer in der Lage ist, strukturelle Eigenschaften der RNA-Substrate zu diskriminieren.

3.2.5 Etablierung eines RNA-Chaperon-Aktivitätsassay

Die bisher erhaltenen Ergebnisse demonstrieren zum einen, dass NF90 als Monomer und auch im Komplex mit NF45 unterschiedliche RNA-Moleküle unterschiedlich bindet. Zum anderen konnte bei NF90 festgestellt werden, dass es eine Konformationsänderung der RNA induziert. Somit wurde neben einer Bindung an die RNA eine putative RNA-Chaperon-Aktivität (RCA) des Proteins, eine Beeinflussung von RNA-Strukturen, vermutet. Ob NF90 bzw. NF90-NF45 tatsächlich diese Aktivität zeigen, sollte nun im Folgenden überprüft werden.

Zur Etablierung eines RCA-Assays wurden Methoden von Rajkowitsch und Schroeder angewandt (118,119). Die Autoren definierten zwei elementare Reaktionen einer RCA: *RNA-annealing*, die Hybridisierung zweier ssRNAs, und *strand displacement*, der Strangaustausch in einer dsRNA (**Abb. 19A** und s. 4.2.4.1). Sie entwickelten eine fluorimetrische Methode, mit der die genannten Reaktionen mittels FRET von Cyanin 3 (Cy3) zu Cyanin 5 (Cy5) verfolgt werden können (**Abb. 19A**). Dazu wird ein RNA-Einzelstrang am 5'-Ende mit Cy3 und ein dazu komplementärer Strang am 5'-Ende mit Cy5 gekoppelt. Eine Interaktion dieser zwei Stränge bringt die Fluorophore in räumliche Nähe und erzeugt einen FRET.

Zur Analyse einer entsprechenden Aktivität von NF90 wurden zwei vollständig komplementäre 15 nt lange ssRNAs aus dem SL3-Strukturelement des HCV-Genoms abgeleitet. Wie bereits erwähnt, stellt dieses Strukturelement eine Bindestelle von NF90 im HCV-Genom dar (Abb. 2, (58)). Die Einzelstränge werden im Folgenden als HCV-SL3(+), HCV-SL3(-) und dieses RNA-Paar allgemein als HCV-SL3 bezeichnet. Zusätzlich wurden die 21 nt langen ssRNAs aus dem Assay von Rajkowitsch und Schroeder (119) zum Vergleich eingesetzt. Diese werden im Folgenden als RaSc(+), RaSc(-) bzw. RaSc bezeichnet.

Durch Anregung des Cy3 des (-)-Stranges konnte nach der Zugabe des (+)-Stranges ein zeitabhängiger Anstieg der Cy5-Fluoreszenz aufgezeichnet werden (je 10 nM Einzelstränge, **Abb. 19B**). Aus technischen Gründen war es nicht möglich einen FRET direkt zu messen, daher wurde zunächst abgesichert, dass ein Signal aufgezeichnet wurde, das proportional zur Interaktion der ssRNAs war. Als Kontrolle diente die Reaktion zweier nicht-komplementärer ssRNAs. Diese induzierten keinen Anstieg der Cy5-Fluoreszenz und belegten damit, dass das Cy5-Signal eine zur Hybridisierung (*annealing*) proportionale Größe darstellte (**Abb. 19B**).

In anschließenden Experimenten wurde zunächst die Interaktion der (+)- und (-)-Stränge der HCV-SL3 bzw. der RaSc charakterisiert. Dafür wurden 10 nM (+)-Strang mit steigenden Konzentrationen des (-)-Strangs versetzt und das *annealing* über die Cy5-Fluoreszenz verfolgt (**Abb. 19C, D**). Die so aufgezeichneten Progresskurven wurden analog Rajkowitsch und Schroeder mittels Gleichung 11a (s. 2.8) entsprechend einer Reaktion 2. Ordnung analysiert. So ergab sich unter Standardbedingungen (jeder Strang 10 nM, NF90-Puffer, 20 °C) eine apparente Geschwindigkeitskonstante k_{obs} von 0.01 s^{-1} für HCV-SL3 und $k_{\text{obs}} = 0.006 \text{ s}^{-1}$ für RaSc (restl. k_{obs} siehe **Tabelle A - 6**). Da der Wert der RaSc mit den publizierten Daten von Rajkowitsch und Schroeder $k_{\text{obs}} = 0.005 \text{ s}^{-1}$ übereinstimmte (119), wurde der etablierte RCA-Assay validiert.

Interessanterweise folgte die beobachtete Geschwindigkeitskonstante einer hyperbolen Abhängigkeit von der eingesetzten RNA-Konzentration (**Abb. 19E**). Folglich wurde unter hohen RNA-Konzentrationen eine Limitierung der RNA-*annealing*-Reaktion deutlich. Dieses Verhalten weist auf mindestens einen weiteren intramolekularen Reaktionsschritt als der reinen Assoziation der ssRNAs hin (s. Diskussion 4.3.1). Die Analyse von k_{obs} nach einem entsprechenden Modell (Gleichung 11b, s. 2.8, (111)) definierte die Parameter k_{max} , welcher der maximalen, unter RNA-Sättigung erzielten apparenten Geschwindigkeitskonstante entspricht, und K_M , der die Substratkonzentration zum Erreichen der halbmaximalen Geschwindigkeitskonstante angibt. Zum Vergleich der beiden RNA-Systeme wurden k_{max} und die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung, welche aus dem linearen Teil der Hyperbel ermittelt wurde (k_{on} , Gleichung 9, s. 2.7), herangezogen. Dabei ist k_{on} ein Maß für die reine Assoziation der RNAs. Demnach

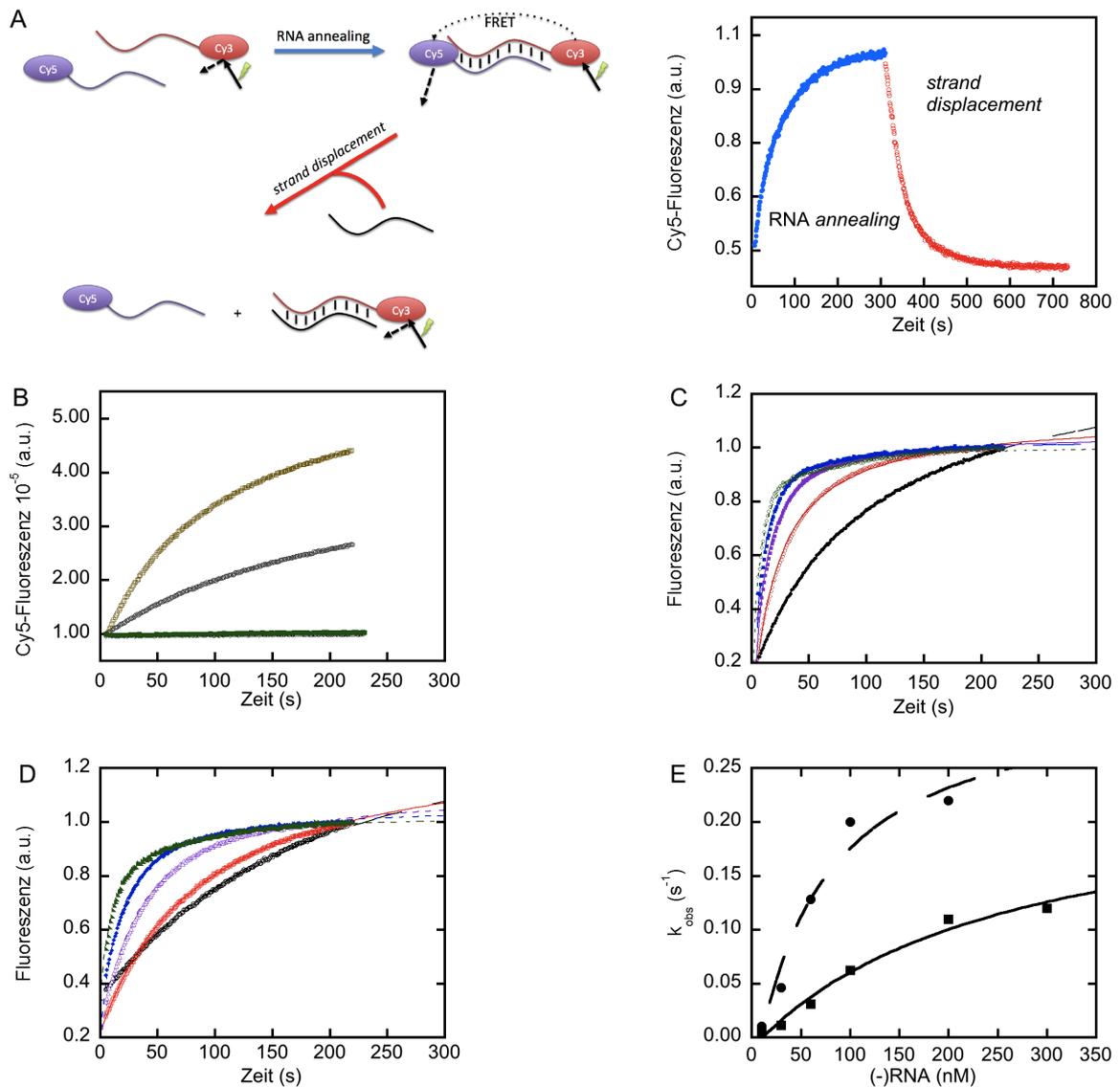


Abbildung 19: Etablierung eines RNA-Chaperon-Aktivitätsassays (RCA-Assay). (A) Schematische Darstellung der zwei grundlegenden Prozesse einer RCA: RNA-annealing und strand displacement. Zwei komplementäre ssRNA werden zur Reaktion gebracht. Ein Strang ist mit dem Fluorophor Cy3 und der andere mit Cy5 gekoppelt. Durch die Hybridisierung entsteht eine räumliche Nähe der Fluorophore, die einen FRET induziert (annealing, blau). Unter Umständen kann nach der Reaktion durch Zugabe eines unmarkierten Stranges im Überschuss eine Abnahme der Cy5-Fluoreszenz gemessen werden, die einen Austausch der Stränge indiziert (strand displacement, rot). (B) Zeitverlauf der Cy5-Fluoreszenz bei Mischung äquimolarer Mengen (10 nM) der HCV-SL3 (gelb) und RaSc ssRNAs (grau) bzw. nicht-komplementärer ssRNAs (grün) (C) Progresskurven des RNA-annealing der HCV-SL3 und (D) der RaSc ssRNAs mit steigenden Konzentrationen des (-)-Stranges (10 nM schwarz, 30 nM rot, 60 nM violett, 100 nM blau, 200 nM grün). Die Regression erfolgte mittels Gleichung 11a (s. 2.8). (E) Auftragung der aus (C) und (D) ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) des annealing von HCV-SL3 (Quadrat) und RaSc (Kreis) gegen die (-)-Strangkonzentration. Gleichung 11b wurde den Daten angenähert. Ermittelte Parameter sind in **Tabelle 13** zusammengefasst. Alle Messungen erfolgten bei 20 °C in NF90-Puffer.

Tabelle 13. Kinetik des RNA-annealing von HCV-SL3 und RaSc

	k_{on} ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_{max} (s^{-1})	K_M (nM)	k_{max}/K_M ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
HCV-SL3	2	0.4	150	$3 \cdot 10^6$
RaSc	0.4	0.2	255	$8 \cdot 10^5$

erfolgte die Interaktion der 15 nt langen HCV-SL3 ssRNAs um eine Größenordnung schneller als die der 6 nt längeren RaSc ($k_{\text{on}} = 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ vs. $4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ von RaSc, **Tabelle 13**). Darüber hinaus konnte aus k_{max} geschlossen werden, dass der intramolekulare Schritt innerhalb der Reaktion von HCV-SL3 schneller als der im RNA-*annealing* von RaSc ablief ($k_{\text{max}} = 0.4 \text{ s}^{-1}$ versus 0.2 s^{-1} von RaSc, **Tabelle 13**).

Mit keinem der beiden RNA-Paare konnte ein *strand displacement* induziert werden. Diese Beobachtung war in Übereinstimmung mit den von Rajkowitsch und Schroeder erhaltenen Daten zu RaSc.

Anhand dieser Ergebnisse konnte der RCA-Assay in der vorliegenden Arbeit erfolgreich etabliert werden. Nur komplementäre ssRNAs führen zu einem Signalanstieg und es konnten Literaturdaten reproduziert werden. Es kann festgehalten werden, dass das RNA-*annealing* von HCV-SL3 und RaSc über mindestens zwei Reaktionschritte erfolgt. Beim Vergleich der Kinetik des RNA-*annealing* wurden Unterschiede zwischen RaSc und HCV-SL3 deutlich.

3.2.6 NF90 und das Heterodimer NF90-NF45 sind RNA-*annealer*

Nach der Etablierung des RCA-Assays wurden nun NF90 und NF90-NF45 bezüglich ihres Einflusses auf das RNA-*annealing* bzw. *strand displacement* analysiert. Dazu wurden 10 nM (-)-Strang mit steigenden Proteinkonzentrationen 5 min prä-inkubiert bevor die Reaktionen dann durch Zugabe des (+)-Stranges gestartet wurden. Interessanterweise beschleunigten NF90 und NF90-NF45 konzentrationsabhängig den Progress der RNA-*annealing*-Reaktion von HCV-SL3 bzw. RaSc (**Abb. 20A-D**). Als Kontrolle wurden verschiedene Mengen des monomeren NF45 oder des RNA-bindenden Proteins hnRNP H1 (bereitgestellt von Dr. Susann Friedrich, MLU Halle-Wittenberg) den RNA-*annealing*-Reaktionen zugesetzt. Bei keinem dieser Proteine konnte eine Veränderung gegenüber der unkatalysierten Reaktion beobachtet werden (**Abb. 20E**). Da der FRET allein durch die räumliche Nähe von Cy3 und Cy5 induziert wird, musste analysiert werden, ob NF90 bzw. NF90-NF45 tatsächlich eine Hybridisierung der RNAs durchführen. Dazu wurden die Proteine mit nicht-komplementären RNAs zur Reaktion gebracht (**Abb. 20A**, grau). In diesen Ansätzen konnte kein zeitabhängiger Anstieg der Fluoreszenz beobachtet werden. Somit wurde eindeutig belegt, dass NF90 bzw. NF90-NF45 das RNA-*annealing* von HCV-SL3 bzw. RaSc beschleunigten. Bei höheren Konzentrationen an NF90-NF45 konnte beim RNA-*annealing* der HCV-SL3 ssRNAs ein *overshoot* der Reaktion beobachtet werden. Dieses Charakteristikum war nicht beim NF90-NF45-katalysierten RNA-*annealing* von RaSc zu beobachten (**Abb. 20A,B**; s. Diskussion).

Die aufgezeichneten Progresskurven des RNA-*annealing* von HCV-SL3 (**Abb. 20A, C**) bzw. RaSc (**Abb. 20B, D**) in Anwesenheit der Proteine wurden entsprechend einer

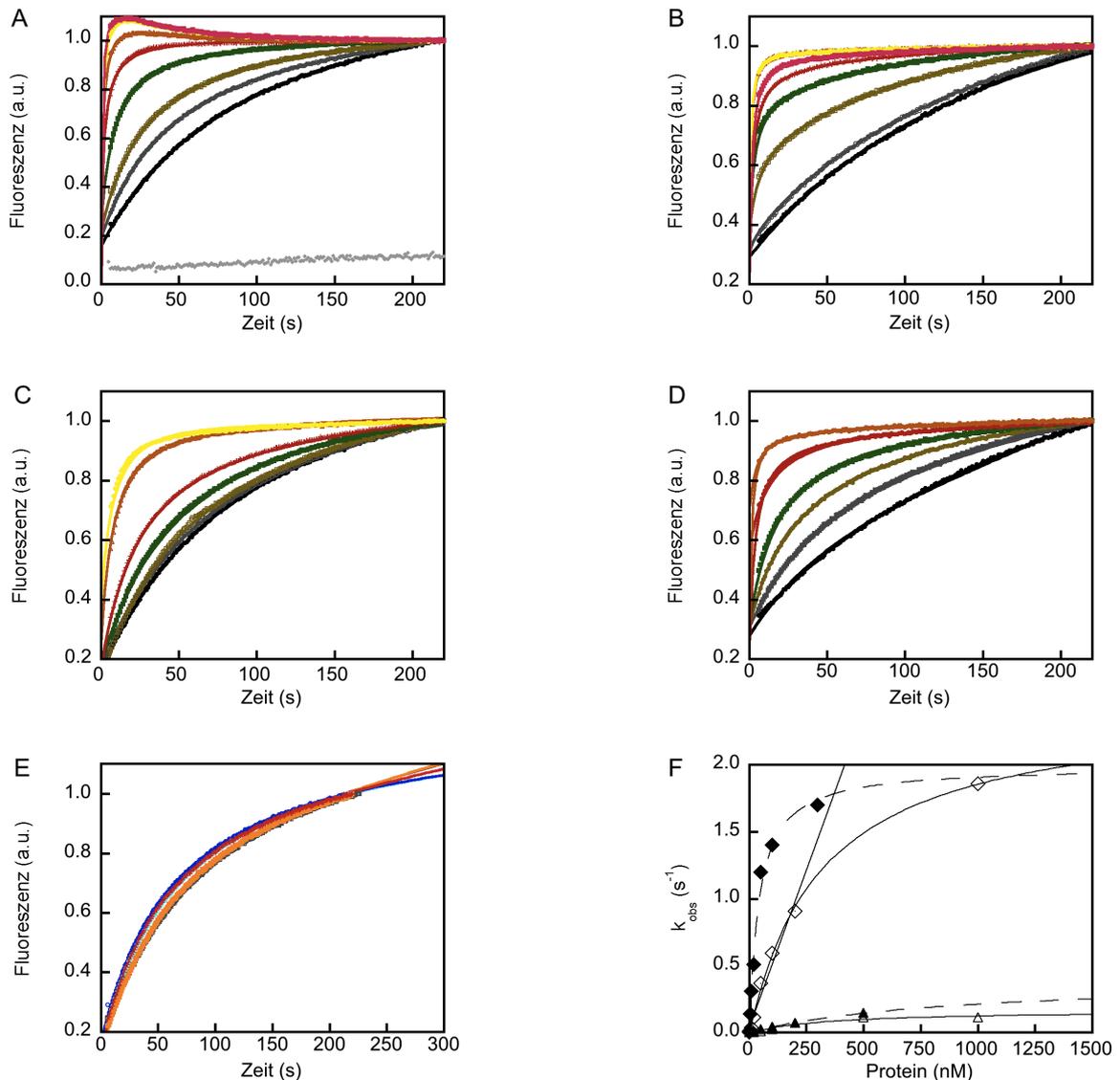


Abbildung 20: NF90 und NF90-NF45 sind RNA *annealer*. Progresskurven des RNA-*annealing* von 10 nM (je Einzelstrang) HCV-SL3 (A, C) bzw. RaSc (B, D) bei ansteigenden Konzentrationen (0 – 1000 nM, Tabelle A - 6) von NF90-NF45 (A, B) bzw. NF90 (C, D) in NF90-Puffer bei 20 °C. Der (-)-Strang wurde mit dem Protein für 5 min prä-inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe des (+)-Strangs gestartet wurde. (E) Progresskurven des RNA-*annealing* der HCV-SL3 in Anwesenheit von 100 nM (orange) und 600 nM NF45 (rot) bzw. 100 nM (blau) und 600 nM hnRNP H1 (violett) in NF90-Puffer bei 20 °C. (F) Die aus den Progresskurven von NF90 (Dreieck) und NF90-NF45 (Raute) ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs} , Gleichung 11a, s. 2.8) des RNA-*annealing* von RaSc (volle Symbole) und HCV-SL3 (leere Symbole) wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mittels Gleichung 11b. Ermittelte Parameter sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Reaktion 2. Ordnung ausgewertet (Gleichung 11a, s. 2.8) und k_{obs} gegen die Proteinkonzentration aufgetragen (Abb. 20F, Tabelle 14, k_{obs} s. Tabelle A - 6). Auch bei diesen Reaktionen beschrieb die Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten eine Hyperbel. Damit wird auch bei der Protein-katalysierten RNA-*annealing*-Reaktion eine Limitierung des Prozesses, in diesem Fall unter hohen Proteinkonzentrationen, angezeigt. Unter diesen Bedingungen zeigte NF90-NF45 eine Aktivität, die um mindestens Faktor 10 größer als die von NF90 ist ($k_{max} = 0.2 \text{ s}^{-1}$ vs. 2.1 bzw. 2.5 s^{-1} des Komplexes). Darüber hinaus konnte anhand der kinetischen Parameter

ein der enzymologischen „katalytischen Effizienz“ ($k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$) analoger Quotient ($k_{\text{max}} / K_{\text{M}}$) berechnet werden, der als Effizienz des RNA-*annealing* für das jeweilige Substrat verstanden werden konnte. Demnach war der Komplex im RNA-*annealing* von HCV-SL3 und RaSc 13- bzw. 70-fach effizienter als das Monomer ($k_{\text{max}}/K_{\text{M}}$ (HCV-SL3) = $6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ von NF90 vs. $8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ des Komplexes). Dies spiegelte sich auch in der Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung wider. Das Heterodimer wies bei HCV-SL3 und RaSc eine 50-fach größere Konstante als das Monomer auf (k_{on} (HCV-SL3) = $5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ vs. $0.1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ des Monomers, **Tabelle 14**).

Tabelle 14. Kinetik des RNA-*annealing* durch NF90 bzw. durch NF90-NF45

		k_{on} ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_{max} (s^{-1})	K_{M} (nM)	$k_{\text{max}}/K_{\text{M}}$ ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
RNA	HCV-SL3	2	0.4	150	$3 \cdot 10^6$
	RaSc	0.4	0.2	255	$8 \cdot 10^5$
NF90	HCV-SL3	0.1	0.2	330	$6 \cdot 10^5$
	RaSc	0.3	0.2	270	$7 \cdot 10^5$
NF90-NF45	HCV-SL3	5	2.5	320	$8 \cdot 10^6$
	RaSc	15	2.1	41	$5 \cdot 10^7$

Bei der Relation der katalysierten zum unkatalysierten RNA-*annealing* fiel auf, dass der Komplex unterschiedliche Aktivitäten auf den verwendeten RNA-Substraten zeigte. So verbesserte der Komplex die Effizienz des Hybridisierens der HCV-SL3 um Faktor 2.5, während die Effizienz der RaSc um Faktor 62 gesteigert wurde. Mit NF90 konnte hingegen keine Effizienzsteigerung der RNA-*annealing*-Reaktionen festgestellt werden. Die Effizienz des NF90-katalysierten RNA-*annealing* von HCV-SL3 war im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion sogar um Faktor 5 reduziert ($k_{\text{max}}/K_{\text{M}} = 0.6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ von NF90wt vs. $3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ der HCV-SL3 RNAs, **Tabelle 14**). Ein *strand displacement* konnte weder mit NF90 noch mit NF90-NF45 induziert werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Resultate belegen, dass sowohl NF90 als auch NF90-NF45 in der Lage sind, die Hybridisierung komplementärer ssRNAs konzentrationsabhängig zu beschleunigen. Beide Proteine besitzen somit eine RNA-Chaperon-Aktivität als RNA-*annealer*. Dabei zeigt der Komplex gegenüber dem NF90-Monomer eine um mehr als eine Größenordnung höhere Aktivität. Neben diesen individuellen Eigenschaften der Proteine wurde festgestellt, dass der Komplex die zwei hier verwendeten RNA-Systeme mit unterschiedlicher Effizienz beeinflusst. Somit wird deutlich, dass Eigenschaften des Substrats die proteinkatalysierte RCA beeinflussen.

3.2.7 Die durch die Komplexbildung von NF90 mit NF45 stabilisierten Strukturelemente sind nicht an der RNA-Bindung beteiligt

Es konnte bisher u.a. gezeigt werden, dass die Komplexbildung von NF90 mit NF45 zu einer thermodynamischen Stabilisierung beider Proteine und zur Verbesserung der RNA-Bindung von NF90 führt. Wie oben aufgeführt, findet keine Dissoziation des Komplexes innerhalb des ersten Übergangs der chemischen Denaturierung statt (**Abb. 16** und **17**). Daher wurde eine Korrelation zwischen dem beobachteten Stabilisierungseffekt der Proteine bei der Bildung des Heterodimers und der verbesserten RNA-Bindung von NF90-NF45 untersucht. Für diesen Zweck wurden die RNA-Bindung von NF90 bzw. NF90-NF45 an ssRNA-1 und dsRNA-1 bei steigenden Harnstoff-Konzentrationen analysiert. Der Konzentrationsbereich von Harnstoff wurde so gewählt, dass er dem Verlauf des ersten Übergangs der chemischen Denaturierung entsprach. Diese Experimente waren den RNA-Bindungsstudien analog, bei denen dem Puffer Natriumchlorid zur Bestimmung des Bindungsmodus an die verschiedenen RNAs zugesetzt war. Dementsprechend wurden zunächst die Affinitäten von NF90 und NF90-NF45 zu ssRNA-1 und dsRNA-1 bei verschiedenen Harnstoff-Konzentrationen quantifiziert und anschließend nach einer linearen freien Enthalpiebeziehung (Gleichung 4, s. 2.6.2.3) ausgewertet. Zum Vergleich des Einflusses von Harnstoff auf die RNA-Bindung von NF90 und NF90-NF45 wurde erneut der m -Wert aus Gleichung 4 herangezogen. Der Wert spiegelt die Sensitivität der RNA-Bindung der Proteine gegenüber Harnstoff wider. Da Harnstoff allerdings einen strukturellen Einfluss auf die Struktur der Proteine hat, konnte der m -Wert an dieser Stelle nicht als Bindungsmodus verstanden werden. Vielmehr demonstriert der m -Wert innerhalb eines definierten Konzentrationsbereichs von Harnstoff, dass die an der RNA-Bindung beteiligten Strukturelemente des Proteins nicht denaturieren.

Für die Bindung von NF90 und NF90-NF45 an ssRNA-1 bzw. dsRNA-1 konnten m -Werte im Bereich von 0 bis 3 M Harnstoff ermittelt werden (**Abb. 21A**, **Tabelle 15**). An dieser Stelle fiel zusätzlich auf, dass die Sensitivität der RNA-Bindung von NF90 und NF90-NF45 gegenüber Harnstoff deutlich geringer (m -Werte nahe 0) als gegenüber Natriumchlorid war. Entsprechend obiger Betrachtung konnte anhand dieser Beobachtungen eine Denaturierung der an der RNA-Bindung beteiligten Strukturelemente von NF90 bzw. NF90-NF45 hier ausgeschlossen werden.

Interessanterweise führte im Vergleich zu NF90wt die Heterodimerisierung von NF90 mit NF45 zu einer Abnahme des m -Wertes der Bindung an dsRNA-1 ($m = -0.96 \text{ kcal mol}^{-2} \text{ L}$ vs. $-0.62 \text{ kcal mol}^{-2} \text{ L}$ des Monomers, **Tabelle 15**). Somit reagierten die Strukturelemente, die an der Bindung von dsRNA-1 beteiligt sind, im Komplex sensitiver als im Monomer auf das Denaturans. Im Vorfeld dieser Analyse wurde eine Dissoziation der verwendeten dsRNA-1 unter diesen Bedingungen ausgeschlossen (Daten nicht

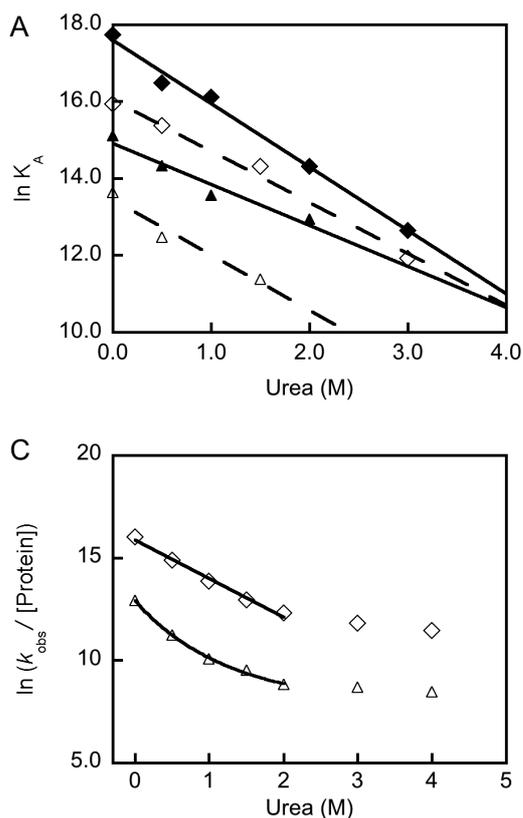


Abbildung 21: Einfluss von Harnstoff auf die RNA-Bindung und RCA von NF90 bzw. NF90-NF45. (A) Quantifiziert wurde die Bindung von ssRNA-1 (leere Symbole) und dsRNA-1 (volle Symbole) an NF90 (Dreieck) bzw. NF90-NF45 (Raute) bei 20 °C in NF90-Puffer, der definierte Konzentrationen an Harnstoff enthielt (Gleichung 3, s. 2.6.2.2). Die erhaltenen Assoziationskonstanten wurden logarithmiert gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen und entsprechend einer LFER beurteilt (Gleichung 4, s. 2.6.2.3). Die *m*-Werte sind in **Tabelle 15** zusammengefasst. (B) Das RNA-annealing von je 10 nM der HCV-SL3 ssRNAs wurde in Ab- (Quadrat) und Anwesenheit von 1 μM NF90 (Dreieck) bzw. 50 nM NF90-NF45 (Raute) bei 20 °C in NF90-Puffer quantifiziert, der definierte Konzentrationen an Harnstoff enthielt. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten (Gleichung 11a, s. 2.8) wurden gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen. (C) Experiment wie in (B). Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten (Gleichung 11a, s. 2.8) wurden hier auf die Proteinkonzentration normiert und logarithmiert gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen.

Tabelle 15. *m*-Werte der Bindung von NF90 und NF90-NF45 an ssRNA-1 und dsRNA-1 in Anwesenheit von Harnstoff

	<i>m</i> (ssRNA-1) (kcal mol ⁻² L)	<i>m</i> (dsRNA-1) (kcal mol ⁻² L)
NF90	-0.84 ± 0.18	-0.62 ± 0.10
NF90-NF45	-0.77 ± 0.05	-0.96 ± 0.05

gezeigt). Der ermittelte *m*-Wert der Bindung von NF90-NF45 an ssRNA-1 war dagegen zu dem der Assoziation von NF90 an ssRNA-1 sehr ähnlich.

Diese Ergebnisse belegen, dass die durch die Heterodimerisierung von NF90 mit NF45 stabilisierten Strukturelemente nicht für die verbesserte RNA-Bindung von NF90 im Heterodimer verantwortlich sind. Die Unterschiede in den ermittelten *m*-Werten zwischen NF90 und NF90-NF45 weisen dennoch auf eine strukturelle Reorganisation der in der RNA-Bindung involvierten RNA-bindenden Motive infolge der Heterodimerisierung hin.

3.2.8 Die Strukturelemente in NF90, die durch die Komplexbildung mit NF45 stabilisiert werden, tragen zur RNA-Chaperon-Aktivität bei

In Analogie zum vorherigen Experiment wurde als Nächstes eine Korrelation zwischen dem beobachteten Stabilisierungseffekt und der effizienteren RCA von NF90-NF45 untersucht. Für diesen Zweck wurde das katalysierte RNA-*annealing* von HCV-SL3 in Anwesenheit steigender Konzentrationen an Harnstoff analysiert. Bei dieser Analyse galten dieselben Vorbetrachtungen über den Einfluss von Harnstoff wie oben beschrieben. Alle Progresskurven der RNA-*annealing*-Reaktionen wurden nach einer Reaktion 2. Ordnung (Gleichung 11a, 2.8) ausgewertet und in Analogie zu Gleichung 4 (s. 2.6.2.3) eine Analyse des m -Werts der Reaktion durchgeführt.

Zunächst musste allerdings geklärt werden, welchen Einfluss Harnstoff auf das unkatalysierte RNA-*annealing* der HCV-SL3 ausübt. Dazu wurde diese Reaktion bei steigenden Harnstoffkonzentrationen verfolgt und entsprechend ausgewertet. Das Ergebnis zeigte, dass Harnstoff einen vernachlässigbaren Einfluss auf das unkatalysierte RNA-*annealing* der HCV-SL3 hatte (**Abb. 21B**). In den folgenden Experimenten wurde nun eine 20fach höhere Konzentration von NF90 als NF90-NF45 eingesetzt, um den beobachteten Aktivitätsunterschied zwischen den Proteinen auszugleichen. Daher wurden für die m -Wert-Analyse die ermittelten k_{obs} -Werte auf die eingesetzte Proteinkonzentration normiert (**Abb. 21C**).

Die Untersuchungen zeigten, dass eine beschleunigte RNA-*annealing*-Reaktion in Anwesenheit von NF90 bzw. NF90-NF45 nur bis 2 M Harnstoff nachgewiesen werden konnte (**Abb. 21B**). Auch die Analyse des m -Wertes der RNA-*annealing*-Aktivität von NF90 und NF90-NF45 belegte, dass im Bereich von 0 bis 4 M Harnstoff kein linearer Zusammenhang bestand und somit kein m -Wert der katalysierten Reaktionen für diesen Bereich berechnet werden konnte (**Abb. 21C**). Entsprechend obiger Betrachtung wurde somit angedeutet, dass in diesem Konzentrationsbereich von Harnstoff Strukturelemente von NF90 bzw. NF90-NF45 denaturieren, die in der RCA involviert sind. Allerdings konnte für NF90-NF45 im Gegensatz zu NF90 im Bereich von 0 bis 2 M Harnstoff ein m -Wert des RNA-*annealing* ermittelt werden ($m = 1.1 \text{ kcal mol}^{-2} \text{ L}$, **Abb. 21C**). Somit sind an der RCA beteiligte Strukturelemente im Komplex in diesem Konzentrationsbereich von Harnstoff im Vergleich zu NF90 stabilisiert.

Diese Ergebnisse belegen, dass Strukturelemente, die im ersten Übergang der chemischen Denaturierung von NF90 bzw. NF90-NF45 entfalten, essentiell zur RCA beitragen. Es wurden außerdem Hinweise erhalten, dass diese Strukturelemente durch die Heterodimerisierung von NF90 mit NF45 stabilisiert werden. Daraus ergibt sich eine Korrelation zwischen den durch die Komplexbildung thermodynamisch stabilisierten Strukturelemente und der RNA-Chaperon-Aktivität von NF90.

3.2.9 Der C-Terminus von NF90 ist in der Interaktion mit NF45 involviert

Nachdem der Komplex NF90-NF45 in einigen grundlegenden Eigenschaften charakterisiert wurde, sollten nun molekulare Ursachen der beobachteten funktionellen Veränderungen von NF90 durch die Interaktion mit NF45 identifiziert und beschrieben werden. Dazu wurden zunächst Komplex-Varianten aus der pseudophosphorylierten Variante NF90^{S651E} und der in den dsRBMs mutierten Variante NF90^{F432, 559A} hergestellt (NF90^{S651E}-NF45 bzw. NF90^{F432, 559A}-NF45). Danach wurden strukturelle und funktionale Veränderungen der Komplex-Varianten im Vergleich zum Wildtyp-Komplex NF90wt-NF45 analysiert.

Als Erstes wurde der Fern-UV CD der Komplex-Varianten aufgezeichnet und mit dem CD des Wildtyp-Komplexes verglichen. Dabei war der Fern-UV CD der Komplex-Variante NF90^{F432, 559A}-NF45 mit dem des Wildtyp-Komplexes identisch. Die pseudophosphorylierte Komplex-Variante NF90^{S651E}-NF45 hingegen zeigte Unterschiede im Fern-UV CD im Vergleich zum Wildtyp-Komplex bei Wellenlängen < 200 nm (**Abb. 22A**). Interessanterweise stimmte das CD-Spektrum dieser Komplex-Variante mit der (berechneten) Mischung aus NF90wt + NF45 überein (**Abb. 22A**, violett und vgl. **Abb. 16D**). Somit traten die bei der Heterodimerisierung der Wildtyp-Proteine beobachteten Konformationsänderungen nicht bei der Komplexbildung der pseudophosphorylierten Variante mit NF45 auf. Folglich wurde vermutet, dass der C-terminale Bereich von NF90 an bzw. in diesen Strukturänderungen und somit in der Interaktion von NF90 mit NF45 involviert ist.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die thermodynamische Stabilität der pseudophosphorylierten Variante als Monomer und im Komplex ermittelt. Diese Analysen erfolgten wie die bereits durchgeführten Untersuchungen zur thermodynamischen Stabilität von NF90wt und NF90wt-NF45. Auch die pseudophosphorylierte Variante wies eine zweistufige Denaturierungskurve auf (**Abb. 22B, Tabelle 16**), zeigte aber eine deutlich geringere Kooperativität des ersten Übergangs (*m*-Wert). Daher ergab sich eine um 0.64 kcal mol⁻¹ geringere Stabilität von Strukturelementen, die in diesem Übergang denaturierten, als entsprechende Elemente von NF90wt ($\Delta G_{N-I}^0 = 0.82 \pm 0.10$ kcal mol⁻¹ vs. 1.46 ± 0.18 kcal mol⁻¹ von NF90wt, **Tabelle 16**). Im Gegensatz dazu wiesen Strukturelemente des zweiten Übergangs in der pseudophosphorylierten Variante eine um 1.41 kcal mol⁻¹ größere Stabilität als im Wildtyp auf ($\Delta G_{I-N}^0 = 3.89 \pm 0.35$ kcal mol⁻¹ vs. 2.48 ± 0.06 kcal mol⁻¹ des Wildtyps, **Tabelle 16**). Insgesamt war damit die thermodynamische Stabilität der Variante um 0.77 kcal mol⁻¹ stabiler als NF90wt. Das bestätigt, dass die Pseudophosphorylierung des C-Terminus von NF90 im Monomer zu Strukturänderungen führt. Zusätzlich destabilisiert

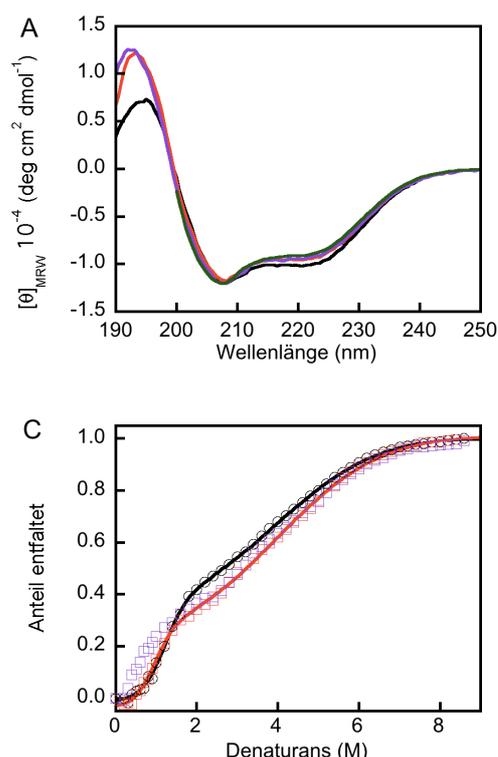


Abbildung 22: Der C-Terminus von NF90 ist in der Interaktion mit NF45 involviert. (A) Fern-UV Circular dichroismus von NF90wt-NF45 (schwarz), NF90^{S651E}-NF45 (rot), NF90^{F432, 559A}-NF45 (grün) bei 20 °C in NF90-Puffer. Zum Vergleich wurde das Spektrum einer Mischung äquimolarer Mengen NF90wt und NF45 herangezogen (violett, vgl. **Abb. 16D**) (B) Chemische Denaturierung mittels eines Denaturansgemisches aus GuHCl und Harnstoff der Monomere NF90wt (schwarz) und NF90^{S651E} (rot) bzw. (C) der Heterodimere NF90wt-NF45 (schwarz), NF90^{S651E}-NF45 (rot). Zum Vergleich wurde die Denaturierung einer Mischung äquimolarer Mengen NF90^{S651E} und NF45 berechnet (violett). Die Proteine wurden in steigenden Denaturanskonzentrationen in NF90-Puffer für 24 h inkubiert und anschließend der CD bei 225 nm gemessen. Gemessene Elliptizitäten wurden in den Anteil des entfalteten Proteins umgerechnet und gegen die Denaturanskonzentration aufgetragen. Gemessene Elliptizitäten wurden in den Anteil des entfalteten Proteins umgerechnet. Zur Auswertung wurde die Gleichung 2 den Daten angenähert (s. 2.5.3). Berechnete thermodynamische Parameter sind in **Tabelle 16** zusammengefasst.

Tabelle 16. Thermodynamische Parameter der chemischen Denaturierung von NF90^{S651E} und NF90^{S651E}-NF45 im Vergleich zum Wildtyp

	Übergang	[D] _{50%} (M)	<i>m</i> (kcal L mol ⁻²)	Δ <i>G</i> ⁰ (kcal mol ⁻¹)
NF90wt	N-I	0.48 ± 0.07	3.06 ± 0.26	1.46 ± 0.18
	I-U	2.85 ± 0.12	0.87 ± 0.03	2.48 ± 0.06
NF90 ^{S651E}	N-I	0.82	1*	0.82 ± 0.10
	I-U	3.19 ± 0.12	1.22 ± 0.10	3.89 ± 0.35
NF90-NF45	N-I	1.19 ± 0.07	2.05 ± 0.09	2.44 ± 0.12
NF90 ^{S651E} -NF45	N-I	0.94 ± 0.13	2.35 ± 0.20	2.21 ± 0.21

N, I, U – nativer, intermediärer und denaturierter Zustand

* Der *m*-Wert wurde über ein Linearisierungsverfahren (ln K vs. [D]) ermittelt und in Gleichung 2 zur Berechnung der thermodynamischen Parameter der Variante eingesetzt.

die Modifikation Strukturelemente im ersten und stabilisiert Strukturelemente im zweiten Übergang der chemischen Denaturierung.

Die Komplex-Variante NF90^{S651E}-NF45 wies im ersten Übergang der chemischen Denaturierung die gleichen Parameter wie der Wildtyp-Komplex auf (**Abb. 22C, Tabelle 16**). Somit wurde die in Vergleich zu NF90wt quantifizierte Destabilisierung von

Strukturelementen von NF90^{S651E} durch die Heterodimerisierung der Variante mit NF45 wieder kompensiert. Allerdings betrug die Amplitude dieses Übergangs der Variante nur 20 %, während sie beim Wildtyp-Komplex 30 % ausmachte. Nach dem ersten Übergang entsprach der weitere Verlauf der Denaturierung der Variante einer (berechneten) Mischung aus NF90^{S651E} + NF45 (**Abb. 22C**, violett). Das wies wie bei der Denaturierung von NF90wt-NF45 darauf hin, dass ab ca. 2 M Denaturans NF90^{S651E} und NF45 unabhängig voneinander entfalteteten und die Komplex-Variante ab hier möglicherweise dissoziiert vorlag.

Es kann festgehalten werden, dass die Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs von NF90 Konformationsänderungen, die durch die Heterodimerisierung von NF90 mit NF45 induziert werden, zu einem bestimmten Grad blockiert. Dabei zeigte sich, dass die Modifikation zu einer Destabilisierung von bestimmten Strukturelementen von NF90 führt. Da die Stabilität dieser Strukturelemente durch die Heterodimerisierung der Variante mit NF45 wieder kompensiert wird, legen diese Ergebnisse nahe, dass der C-Terminus von NF90 in der Interaktion mit NF45 involviert ist.

3.2.10 Die Heterodimerisierung von NF90-NF45 fördert den Beitrag der dsRBMs zur Bindung von ssRNA-1

Nach der Analyse der Struktureigenschaften der Komplex-Varianten wurden als Nächstes deren RNA-Bindungseigenschaften analysiert. Als Vergleichspunkte sollten dienen: a) die RNA-Bindungsaffinitäten, b) Verbesserungsfaktoren der RNA-Bindung von Monomer zu Heterodimer (s. u.) und c) der Bindungsmodus der RNA-Bindung. Im Folgenden wird die dsRBM-Variante NF90^{F432, 559A}-NF45 analysiert. Damit sollten zunächst Einblicke erhalten werden, auf welche Weise die Interaktion von NF45 mit NF90 die Eigenschaften der dsRBMs von NF90 verändert.

Zunächst wurden die Affinitäten von NF90^{F432, 559A}-NF45 zu ssRNA-1 und dsRNA-1 bestimmt (**Abb. 23, Tabelle 17**). Dabei zeigte NF90^{F432, 559A}-NF45 im Vergleich zum Wildtyp-Komplex eine etwa um Faktor 10 und Faktor 2 geringere Affinität zu dsRNA-1 ($K_D = 222$ nM vs. 20 nM von NF90wt-NF45, **Abb. 23A, Tabelle 17**) bzw. ssRNA-1 ($K_D = 250$ nM vs. 110 nM von NF90wt-NF45, **Abb. 23B, Tabelle 17**). Diese Ergebnisse zeigen, dass die dsRBMs auch im Heterodimer vor allem zur Bindung der dsRNA-1 beitragen, aber auch in der Assoziation des Komplexes mit ssRNA-1 involviert sind.

Um nun Hinweise zu erhalten, inwiefern die Aktivität der RNA-bindenden Motive von NF90 durch die Interaktion mit NF45 individuell beeinflusst wird, wurde ein weiterer Vergleichspunkt gewählt. Dafür wurde berechnet, um welchen Faktor die Affinität vom Monomer zu ssRNA-1 bzw. dsRNA-1 durch die Heterodimerisierung mit NF45 gesteigert wurde. Diese RNA-spezifischen Faktoren (nachfolgend „Verbesserungsfaktoren“) wurden anschließend zwischen Variante und Wildtyp verglichen. Dabei auftretende

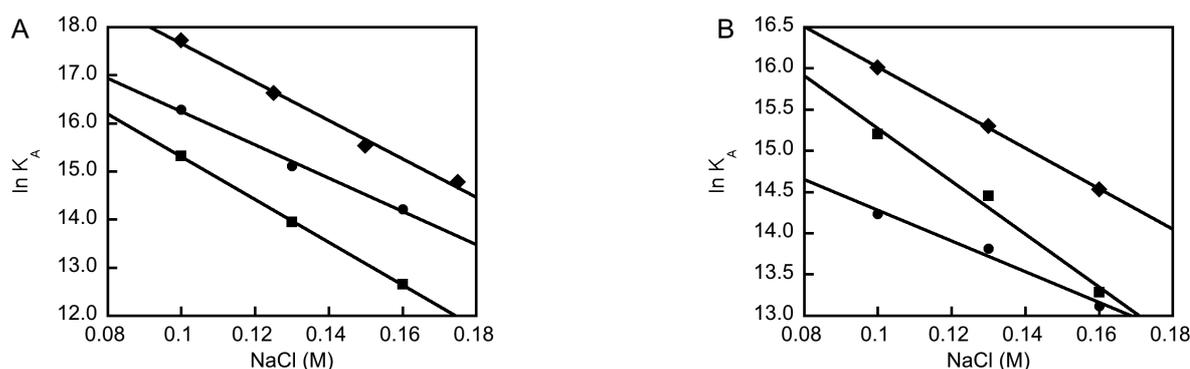


Abbildung 23: Die Heterodimerisierung von NF90 und NF45 beeinflusst die Funktion der RNA-bindenden Motive von NF90. Die Bindung von NF90wt-NF45 (Raute), NF90^{F432, 559A}-NF45 (Quadrat) und NF90^{S651E}-NF45 (Kreis) an (A) dsRNA-1 bzw. (B) ssRNA-1 wurde in NF90-Puffer bei 20 °C als Funktion der Natriumchlorid-Konzentration quantifiziert. Fluoreszenz-Daten wurden mittels Gleichung 3 ausgewertet (s. 2.6.2.2), K_A logarithmiert gegen die NaCl-Konzentration aufgetragen und anhand Gleichung 4 nach einer LFER beurteilt (s. 2.6.2.3). Die ermittelten Parameter sind in **Tabelle 17** zusammengefasst.

Tabelle 17. RNA-Bindungsparameter von NF90-NF45-Varianten zu verschiedenen RNAs

	ssRNA-1 (nM)	VF	m (kcal mol ⁻² L)	Δm	dsRNA-1 (nM)	VF	m (kcal mol ⁻² L)	Δm
NF90	1200 ± 49		-24.8 ± 2.5		160 ± 19		-12.8 ± 2.0	
NF90-NF45	110 ± 9	11	-14.4 ± 0.4	10.4	20 ± 2	8	-23.5 ± 1.4	-10.7
NF90 ^{F432, 559A}	1800 ± 130		-22.1 ± 3.7		1800 ± 170		-15.9 ± 0.1	
NF90 ^{F432, 559A} -NF45	250 ± 10	7.2	-18.6 ± 2.3	3.5	222 ± 20	8	-24.9 ± 0.3	-9.0
NF90 ^{S651E}	1100 ± 78		-16.5 ± 1.7		500 ± 22		-20.3 ± 2.3	
NF90 ^{S651E} -NF45	660 ± 30	1.7	-10.8 ± 1.6	5.7	84 ± 7	6	-20.1 ± 1.6	0.2

VF – Verbesserungsfaktor (s. Text)

Unterschiede zwischen den Verbesserungsfaktoren von Variante und Wildtyp weisen dann darauf hin, dass die Modifikation in der Variante die Funktion von NF45 bei der Heterodimerisierung beeinflusst.

Die Komplex-Variante NF90^{F432, 559A}-NF45 assoziierte demnach mit einer 7fach und 8fach höheren Affinität als die Monomer-Variante NF90^{F432, 559A} an ssRNA-1 bzw. dsRNA-1 (**Tabelle 17**). Beim Vergleich NF90wt-NF45 mit NF90wt wurden die Verbesserungsfaktoren 11 (ssRNA-1) bzw. 8 (dsRNA-1) berechnet. Somit wurde durch die Interaktion der dsRBM-Variante mit NF45, trotz der Mutationen, derselbe Verbesserungsfaktor der Affinität der dsRNA-1-Bindung wie bei der Heterodimerisierung des Wildtyps erreicht. Bei der Bindung an ssRNA-1 fielen allerdings Unterschiede in den Verbesserungsfaktoren auf. Daher konnte vermutet werden, dass sich die Heterodimerisierung nicht auf die individuelle Bindungsaktivität der einzelnen dsRBMs von NF90 auswirkt, sondern den kooperativen Beitrag beider dsRBMs zur Bindung von dsRNA-1 und vor allem ssRNA-1 verstärkt.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde anschließend untersucht, wie sich der Bindungsmodus zu ssRNA-1 und dsRNA-1 durch die Mutationen in NF90^{F432, 599A}-NF45 im Vergleich zu NF90wt-NF45 veränderte. Dabei zeigte sich, dass die Komplex-Variante und NF90wt-NF45 denselben Bindungsmodus zu dsRNA-1 aufwiesen (**Tabelle 17**). Im Unterschied dazu führten die Mutationen in NF90^{F432, 599A}-NF45 im Vergleich zu NF90wt-NF45 zu einer Abnahme des *m*-Werts der Bindung an ssRNA-1. Somit war bei dieser Variante bei der Bindung an ssRNA-1 ein höherer Anteil an ionischen Wechselwirkungen als bei NF90wt-NF45 involviert.

Als Letztes wurde zwischen Variante und Wildtyp verglichen, wie sich jeweils der Bindungsmodus an ssRNA-1 bzw. dsRNA-1 durch die Heterodimerisierung des Monomers mit NF45 veränderte (nachfolgend „Modulation des Bindungsmodus“). Wie oben beschrieben, führte die Heterodimerisierung von NF90wt mit NF45 bei der Bindung von ssRNA-1 zu einer Zunahme des *m*-Werts (**Tabelle 17**). Im Unterschied dazu wurde bei der Bindung von dsRNA-1 von NF90wt eine Abnahme des *m*-Werts infolge der Heterodimerisierung mit NF45 festgestellt. Im Fall von NF90^{F432, 599A} konnte eine ähnliche Modulation des Bindungsmodus an ssRNA-1 bzw. dsRNA-1 durch die Heterodimerisierung mit NF45 festgestellt werden (**Tabelle 17**). Allerdings war der Betrag der Modulation des Bindungsmodus der Variante an ssRNA-1 mit $\Delta m = 3.5 \text{ kcal mol}^{-2} \text{ L}$ deutlich geringer als beim Wildtyp mit $\Delta m = 10.4 \text{ kcal mol}^{-2} \text{ L}$. Somit korrelieren bei der Heterodimerisierung der dsRBM-Variante NF90^{F432, 599A} mit NF45 die Veränderungen in der Modulation des ssRNA-1-Bindungsmodus mit dem reduzierten Verbesserungsfaktor der RNA-Bindung an ssRNA-1.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Interaktion von NF90wt mit NF45 zu einem größeren Beitrag der dsRBMs zur Bindung an ssRNA-1 führt. Es wurden Hinweise erhalten, dass Orientierungseffekte, die die Kooperativität der dsRBMs verstärken, dafür verantwortlich sind.

3.2.11 Die Heterodimerisierung von NF90 mit NF45 verändert die Aktivität des C-Terminus von NF90 bei der RNA-Bindung

Im Folgenden wird nun die pseudophosphorylierte Komplex-Variante NF90^{S651E}-NF45 nach denselben Punkten wie zuvor analysiert: a) RNA-Bindungsaffinitäten, b) Verbesserungsfaktoren der RNA-Bindung durch die Heterodimerisierung, c) Bindungsmodus der RNA-Bindung und d) Modulation der Bindungsmodi durch die Heterodimerisierung. Damit sollten nun Einblicke erhalten werden, auf welche Weise die Interaktion von NF45 mit NF90 die Eigenschaften des C-Terminus bzw. RGG-Motivs von NF90 verändert.

Als Erstes wurden die Affinitäten der pseudophosphorylierten Komplex-Variante zu ssRNA-1 und dsRNA-1 ermittelt. Dabei wies die Variante im Vergleich zu NF90wt-NF45

eine 4- und 6-fach geringere Affinität der Bindung an dsRNA-1 ($K_D = 84$ vs. 20 nM von NF90wt-NF45, **Abb. 23A, Tabelle 17**) bzw. an ssRNA-1 auf ($K_D = 660$ vs. 110 nM von NF90wt-NF45, **Abb. 23B, Tabelle 17**). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs von NF90 in NF90^{S651E}-NF45 deutliche Auswirkungen auf die Bindung des Proteins an dsRNA-1 sowie ssRNA-1 hatte. Daher konnte an dieser Stelle vermutet werden, dass dieses Motiv in NF90wt-NF45 an beiden RNA-Bindungsprozessen beteiligt ist.

Die ermittelten Verbesserungsfaktoren der RNA-Bindung von NF90^{S651E} durch die Heterodimerisierung mit NF45 betragen nur Faktor 1.7 (ssRNA-1) bzw. 6 (dsRNA-1, **Tabelle 17**). Damit waren beide Faktoren der Variante geringer als die Faktoren des Wildtyps. Somit konnte geschlussfolgert werden, dass die Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs von NF90 die Funktion von NF45 bei der Heterodimerisierung beeinträchtigte. Diese Beobachtung ließ die Vermutung zu, dass der C-Terminus von NF90 durch die Heterodimerisierung in seinen grundsätzlichen RNA-Bindungseigenschaften modifiziert wird, und dass diese Veränderung eine zentrale Rolle im gesamten Prozess der RNA-Bindung von NF90-NF45 und vor allem bei der Bindung an ssRNA-1 einnimmt.

Um diese Hypothese weiter zu prüfen, wurden nun die Bindungsmodi der pseudophosphorylierten Komplex-Variante zu ssRNA-1 und dsRNA-1 mit denen des Wildtyp-Komplexes verglichen. Es zeigte sich, dass die Modifikation in NF90^{S651E}-NF45 im Vergleich zu NF90wt-NF45 zu einer Zunahme des m -Wertes der Bindung an ssRNA-1 und dsRNA-1 führte (**Tabelle 17**). Damit zeichneten sich die Bindungsmodi der Komplex-Variante an beide RNAs durch einen höheren Anteil an hydrophoben Wechselwirkungen als im Wildtyp-Komplex aus.

Als Letztes wurde auch bei dieser Variante die Modulation der Bindungsmodi durch die Heterodimerisierung mit NF45 im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Wie bei NF90wt konnte auch bei NF90^{S651E} infolge der Interaktion mit NF45 eine Zunahme des m -Wertes der Bindung an ssRNA-1 ermittelt werden (**Tabelle 17**). Allerdings war die Modulation dieses Bindungsmodus der Variante mit $\Delta m = 5.7$ kcal mol⁻² L geringer als beim Wildtyp mit $\Delta m = 10.4$ kcal mol⁻² L. Darüber hinaus wurde festgestellt werden, dass bei der pseudophosphorylierten Variante keine Modulation des Bindungsmodus der Bindung an dsRNA-1 erfolgte (**Tabelle 17**). Diese Ergebnisse korrelieren mit den reduzierten Verbesserungsfaktoren durch die Heterodimerisierung der Variante mit NF45 und legen somit nahe, dass die Interaktion von NF90 mit NF45 zu einer Steigerung des Beitrags des C-Terminus zur Bindung an dsRNA-1 und vor allem ssRNA-1 führt. Daher konnte bestätigt werden, dass die Interaktion von NF90 mit NF45 die grundsätzlichen RNA-Bindungseigenschaften des C-Terminus von NF90 verändert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die verschiedenen Mutationen der RNA-bindenden Motive im monomeren NF90 unterschiedliche Auswirkungen auf die Funktion von NF45 hatten, die RNA-Bindungseigenschaften von NF90 bei der Heterodimerisierung zu verändern. Es wird nahe gelegt, dass die Interaktion von NF90 mit NF45 dazu führt, dass die dsRBMs stärker zur Bindung von ssRNA-1 und der C-Terminus von NF90 stärker zur Bindung von dsRNA-1 und ssRNA-1 beitragen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Assoziation von NF45 an NF90 die Kooperativität der RNA-bindenden Motive von NF90 erheblich verbessert.

3.2.12 Die RNA-bindenden Motive von NF90 leisten unterschiedliche Beiträge zur RNA-Chaperon-Aktivität

In der nächsten Serie von Experimenten sollte untersucht werden, welche Bedeutung die verschiedenen RNA-bindenden Motive von NF90 für die RNA-Chaperon-Aktivität des Proteins haben. Dazu wurden die RNA-*annealing*-Aktivität der pseudophosphorylierten Komplex-Variante NF90^{S651E}-NF45, bei der das RGG-Motiv in seiner Funktion beeinträchtigt war, und die Komplex-Variante NF90^{F432, 599A}-NF45, bei der beide dsRBMs mutiert waren, unter Verwendung der HCV-SL3 RNAs (je 10 nM) im RCA-Assay analysiert.

Entsprechend den vorherigen RCA-Analysen wurden zunächst die Progresskurven des RNA-*annealing* bei ansteigenden Proteinkonzentrationen aufgezeichnet. Dabei zeigte sich, dass beide Komplex-Varianten in der Lage waren, das RNA-*annealing* der HCV-SL3 konzentrationsabhängig zu beschleunigen (**Abb. 24A**). Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} wurden nach Gleichung 11a ermittelt (s. 2.8). k_{obs} wies bei beiden Varianten eine hyperbole Abhängigkeit von der Proteinkonzentration auf (k_{obs} s. **Tabelle A5**). Damit konnten ebenso wie beim Wildtyp die kinetischen Parameter k_{on} , k_{max} und die katalytische Effizienz $k_{\text{max}}/K_{\text{M}}$ über Gleichung 9 und 11b ermittelt werden (s. 2.7 und 2.8). Diese Parameter wurden für nachfolgende Vergleiche der Varianten mit dem Wildtyp herangezogen.

Die dsRBM-Variante NF90^{F432, 599A}-NF45 wies eine zum Wildtyp-Komplex nahezu identische Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung k_{on} auf (**Abb. 24A, Tabelle 18**). Die Maximalaktivität k_{max} der Komplex-Variante war im Vergleich zum Wildtyp-Komplex leicht gesteigert. Interessanterweise führte die Perturbation beider dsRBMs in NF90^{F432, 599A}-NF45 dementsprechend nicht zu einer Verminderung der Effizienz der RNA-*annealing*-Reaktion ($k_{\text{max}} / K_{\text{M}} = 6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ vs. $8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ des Wildtyp-Komplexes, **Tabelle 18**).

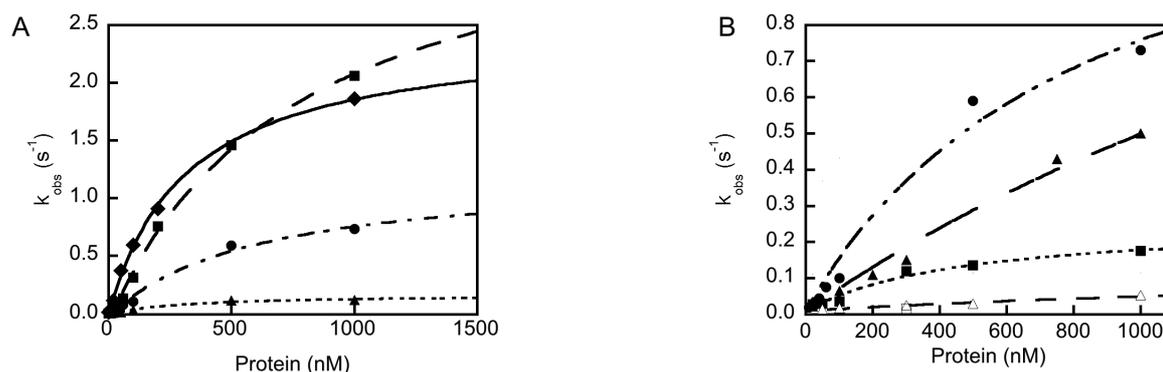


Abbildung 24: Beiträge der RNA-bindenden Motive zur RNA-Chaperon-Aktivität von NF90 und NF90-NF45. Das RNA *annealing* von je 10nM HCV-SL3 RNAs wurde bei ansteigenden Konzentrationen von (A) NF90 (Raute) NF90-NF45 (Raute), NF90^{S651E}-NF45 (Kreis) und NF90^{F432, 559A}-NF45 (Quadrat) und (B) NF90^{S651E}-NF45 (Kreis), NF90ΔC63-NF45 (ausgefülltes Quadrat), NF90ΔC46-NF45 (ausgefülltes Dreieck) und NF90ΔC46 (leeres Dreieck) in NF90-Puffer bei 20 °C aufgezeichnet. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) wurden mittels Gleichung 11a quantifiziert (s. 2.8). Die k_{obs} -Werte sind in **Tabelle A - 5** zusammengefasst. Diese wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und nach Gleichung 10b ausgewertet. Ermittelte Parameter sind in **Tabelle 18** zusammengefasst.

Tabelle 18. Kinetische Parameter des RNA-*annealing* von NF90-Varianten

	k_{on} ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_{max} (s^{-1})	K_M (nM)	k_{max}/K_M ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
NF90	0.1	0.2	330	$5 \cdot 10^5$
NF90-NF45	5	2.4	320	$8 \cdot 10^6$
NF90 ^{S651E}	0.07	0.3	2165	$1 \cdot 10^5$
NF90 ^{S651E} -NF45	1	1.2	850	$1 \cdot 10^6$
NF90 ^{F432, 559A}	0.3	n.d.	n.d.	n.d.
NF90 ^{F432, 559A} -NF45	3	3.8	700	$6 \cdot 10^6$
NF90ΔC63	keine RCA detektiert			
NF90ΔC63-NF45	0.2	0.24	500	$5 \cdot 10^5$
NF90ΔC46	0.03	0.12	2152	$5 \cdot 10^4$
NF90ΔC46-NF45	0.5	> 0.5	>1000	$\sim 5 \cdot 10^5$

Bei der pseudophosphorylierten Komplex-Variante NF90^{S651E}-NF45 waren im Vergleich zu NF90wt-NF45 sowohl die Maximalaktivität ($k_{max} = 0.8 \text{ s}^{-1}$ vs. 2.1 s^{-1} von NF90-NF45, **Abb. 24A, Tabelle 18**) als auch die Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung ($k_{on} = 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ vs. $5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ von NF90-NF45) um mehr als 50% reduziert. Damit ging eine Reduktion der Effizienz der RNA-*annealing*-Aktivität dieser Variante um fast eine Größenordnung einher ($k_{max} / K_M = 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ versus $8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ des Wildtyp-Komplexes). Außerdem wurde festgestellt, dass der pseudophosphorylierte Komplex im Vergleich zur Monomer-Variante eine nur 10fach höhere Effizienz aufwies. Dagegen war der Wildtyp-Komplex in der RCA 16mal effizienter als NF90wt.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Mutationen der verschiedenen RNA-bindenden Motive von NF90 unterschiedliche Auswirkungen auf die RNA-*annealing*-Aktivität von NF90-NF45 haben. Während sich die Perturbation beider dsRBMs nicht negativ auf die RCA auswirkte, beeinträchtigte die Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs von NF90 die RCA dagegen erheblich. Es wurde zusätzlich deutlich, dass die Veränderung der RNA-Bindungseigenschaften des C-Terminus von NF90 durch die Interaktion mit NF45 wichtig für eine effiziente RCA ist. Zusammenfassend konnte somit postuliert werden, dass der C-Terminus von NF90 unmittelbar an der RCA beteiligt ist.

3.2.13 Das RGG-Motiv von NF90 ist essentiell für die RNA-Chaperon-Aktivität von NF90. Das gilt nicht für die RCA von NF90-NF45.

Um die besondere Rolle des C-Terminus von NF90 in der RCA näher zu untersuchen, wurden nun die RNA-*annealing*-Aktivitäten der bereits oben verwendeten C-terminal verkürzten Varianten NF90 Δ C63 und NF90 Δ C46 im Monomer und im Komplex mit NF45 unter Verwendung der HCV-SL3 RNAs (je 10 nM) analysiert. Bei NF90 Δ C63 ist der C-Terminus um 63 Aminosäuren verkürzt. Diese schließen das RGG-Motiv ein. Die Variante NF90 Δ C46 hingegen enthält das RGG-Motiv, ist aber um die restlichen C-terminalen 46 Aminosäuren verkürzt. Die Analyse der Varianten erfolgte wie im vorherigen Abschnitt angegeben. Die ermittelten k_{obs} -Werte sind in **Tabelle A5** zusammengefasst.

In Anwesenheit der Monomer-Variante NF90 Δ C63 konnte keine Beschleunigung des RNA-*annealing* der HCV-SL3 RNAs beobachtet werden. Somit konnte bei dieser Variante keine RNA-*annealing*-Aktivität mehr nachgewiesen werden (**Abb. 24B, Tabelle 18**). Die C-terminal verkürzte Monomer-Variante NF90 Δ C46 zeigte hingegen eine RNA-*annealing*-Aktivität. Die Effizienz der Reaktion war gegenüber dem monomeren NF90wt allerdings um Faktor 10 reduziert ($k_{\text{max}} / K_{\text{M}} = 5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ vs. $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ des Wildtyp-Monomers, **Abb. 24B, Tabelle 18**). Den ermittelten kinetischen Parametern nach konnten das auf eine im Vergleich zu NF90wt reduzierte Maximalaktivität sowie reduzierte Geschwindigkeitskonstante k_{on} zurückgeführt werden. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Präsenz des C-terminalen RGG-Motivs von NF90 essentiell für die RCA des Monomer NF90 ist.

Interessanterweise konnte dieser Befund mit dem monomeren NF90 für die Aktivität des Heterodimers nicht bestätigt werden. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass für nachfolgende Experimente mit den Komplex-Varianten NF90 Δ C63-NF45 und NF90 Δ C46-NF45 nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Verkürzung des C-Terminus einen grundsätzlichen Einfluss auf die Affinität zwischen NF90 und NF45 hat. Die Kristallstruktur von NF90¹⁻³⁹⁰-NF45²⁹⁻³⁸⁹ demonstriert allerdings, dass Aminosäuren 391-706 von NF90 nicht essentiell für die Heterodimerisierung sind. Daher wurde

angenommen, dass der Einfluss der Verkürzungen von NF90 auf die Affinität zwischen NF90 und NF45 vernachlässigbar ist.

Die Komplex-Variante NF90 Δ C63-NF45 beschleunigte nämlich das RNA-*annealing* von HCV-SL3 (**Abb. 24B**). Die Effizienz der RCA der Komplex-Variante betrug allerdings nur 1/16 der Effizienz von NF90wt-NF45 und entsprach somit dem Monomer NF90wt ($k_{\max} / K_M = 5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ der Komplex-Variante und des Wildtyp-Monomers, **Tabelle 18**). Das war auf eine Reduktion von k_{on} sowie der Maximalaktivität k_{\max} dieser Komplex-Variante gegenüber dem Wildtyp-Komplex um Faktor 10 zurückzuführen. Die Aktivität von NF90 Δ C46-NF45 ließ nicht zu, dass ein genauer Wert der Effizienz ermittelt werden konnte. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Interaktion von NF90 Δ C46 mit NF45 ähnlich wie bei den Wildtyp-Proteinen zu einer Effizienzsteigerung der RCA führte. Allerdings wurde die RCA-Effizienz von NF90 Δ C46 durch die Heterodimerisierung mit NF45 nur um Faktor ca. 10 gesteigert, während Faktor 16 bei NF90wt erreicht wurde (**Tabelle 18**). Insgesamt war die RCA-Effizienz von NF90 Δ C46-NF45 damit in der Größenordnung des Monomer NF90wt. Auch bei dieser Komplex-Variante konnte das auf eine gegenüber dem Wildtyp-Komplex deutlich reduzierte Geschwindigkeitskonstante k_{on} zurückgeführt werden. Ob auch k_{\max} kleiner als bei NF90wt-NF45 ist, konnte an dieser Stelle nicht präzise ermittelt werden. Es konnte jedoch vermutet werden, dass auch die Maximalaktivität von NF90 Δ C46-NF45 geringer als die von NF90wt-NF45 ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Verkürzung des C-Terminus von NF90 die RNA-*annealing*-Aktivität des Heterodimers signifikant reduziert. Damit belegen diese Resultate, dass das RGG-Motiv sowie die restlichen 46 Aminosäuren des C-Terminus von NF90 essentiell für eine effiziente RCA von NF90-NF45 sind. Ferner legt die nachweisbare RCA von NF90 Δ C63-NF45 nahe, dass auch in NF45 funktionale Motive existieren, die im Heterodimer zur RCA beitragen.

3.3 Untersuchungen zum Mechanismus der RNA-Chaperon-Aktivität

Während der Charakterisierung von NF90 bzw. NF90-NF45 konnte eine RNA-Chaperon-Aktivität von NF90 identifiziert werden, die sich als RNA-*annealing* manifestierte. Eine detaillierte Analyse verschiedener Varianten des Proteins legte unterschiedliche Bedeutungen der verschiedenen RNA-bindenden Motive für diese Aktivität nahe. Als Nächstes sollte geklärt werden, welchen Einfluss verschiedene Determinanten der RNA-Substrate, wie Größe, thermodynamische Stabilität und Komplementarität, auf die Reaktion haben. Dazu wurden die bereits verwendeten RNAs RaSc- und HCV-SL3 um strukturelle Varianten erweitert. Die Einzelstränge der Varianten wurden so konstruiert, dass der entstehende Doppelstrang im Vergleich zur vollständig komplementären

dsRNA einen nicht-komplementären Abschnitt von jeweils 4 bp (HCV-SL3) bzw. 6 bp (RaSc) in der Mitte (*bubble*) oder an einem Ende (*fork*) enthielt (**Abb. 25A**). Die vollständig-komplementären RNAs werden nun als HCV-SL3-*full* bzw. RaSc-*full* bezeichnet. Durch diese Studien sollte ein Modell des Mechanismus der unkatalysierten sowie der katalysierten RNA-*annealing*-Reaktion erarbeitet werden.

Zur Validierung der spezifischen strukturellen Organisation der oben vorgestellten dsRNAs wurden Schmelzkurven-Analysen durchgeführt (s. Anhang 7.2.2 und **Abb. A3**). Durch diese Analyse kann u.a. die Schmelzenthalpie (ΔH_{TM}) einer dsRNA ermittelt werden. Dieser Parameter korreliert mit der Anzahl aufbrechender Basenpaare während der thermischen Denaturierung der dsRNA (120). Folglich kann die Anzahl der Basenpaare der dsRNA abgeschätzt werden. Es zeigte sich, dass die nicht-vollständig komplementären *-bubble -fork* RNAs im Vergleich zu HCV-SL3-*full* und RaSc-*full* eine signifikant geringere Schmelzenthalpie aufwiesen (s. Anhang 7.2.2). Daraus konnte geschlossen werden, dass die *-bubble* und *-fork* RNAs entsprechend der Vorhersage eine geringere Komplementarität als die *-full* RNAs besitzen. Darüber hinaus belegten diese Analysen, dass alle getesteten dsRNAs unter Assay-Bedingungen (NF90-Puffer, 20 °C) thermodynamisch stabil waren. Somit konnten diese RNAs für die geplanten Experimente eingesetzt werden.

3.3.1 Der Übergangszustand des unkatalysierten RNA-*annealing* von HCV-SL3 und RaSc weist ähnliche Eigenschaften auf

Um zunächst die unkatalysierte RNA-*annealing*-Reaktion weiter zu charakterisieren, wurden zur mechanistischen Analyse der Reaktion Arrhenius-Analysen in NF90-Puffer durchgeführt. Diese beruhen auf der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion. Die zusätzliche Verwendung der unvollständig komplementären RNAs sollte einen detaillierten Einblick in die analysierte Reaktion liefern. Bei allen folgenden Reaktionen wurden jeweils 10 nM der Einzelstränge eingesetzt und die Temperaturabhängigkeit von k_{obs} im Bereich 10 – 37 °C untersucht. Die Auswertung erfolgte dabei nach Doetsch *et al.* (121). Dabei werden zur Arrhenius-Analyse die ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten der RNA-*annealing*-Reaktionen (Gleichung 11a, s. 2.8) auf die eingesetzte RNA-Konzentration normiert. Anschließend wurden die thermodynamischen Parameter unter Verwendung Gleichung 12-15 ermittelt (s. 2.8.1).

Der Hybridisierung der verschiedenen RNAs war gemeinsam, dass mit zunehmender Temperatur ein Anstieg der beobachteten Geschwindigkeitskonstante erfolgte (**Abb. 25B, C**). Im Gegensatz zu den Varianten von RaSc (**Abb. 25C**) bestand bei den Varianten von HCV-SL3 (**Abb. 25B**) über den gesamten untersuchten Temperaturbereich kein linearer Zusammenhang im Arrhenius-Diagramm. Dieses

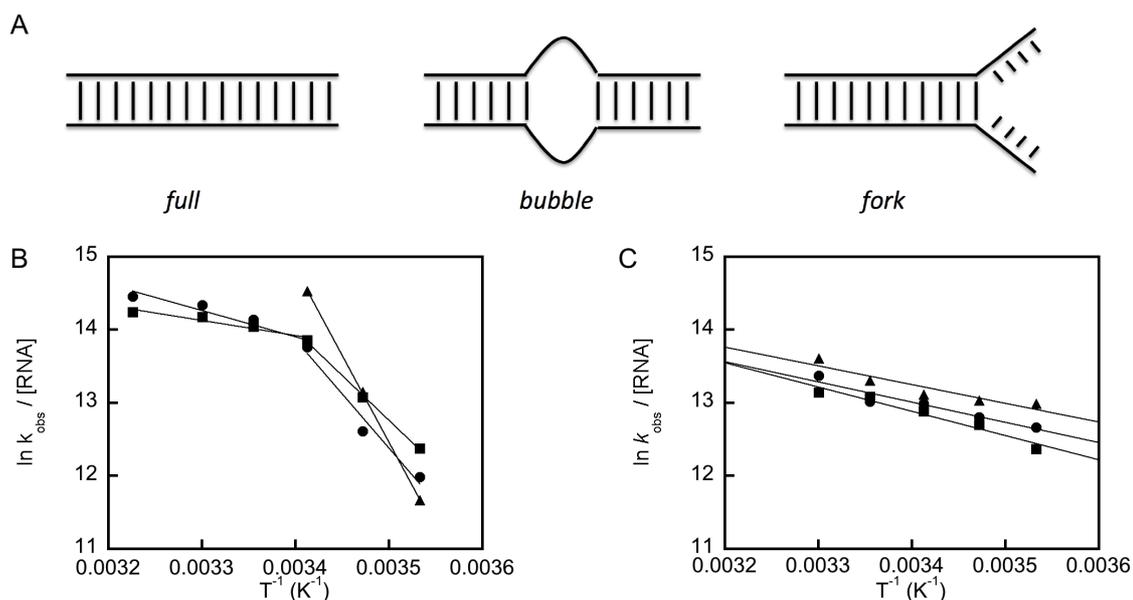


Abbildung 25: Das RNA-annealing von HCV-SL3 und RaSc folgt einem ähnlichen Mechanismus. (A) Schematische Darstellung der verwendeten Paare von RNAs mit unterschiedlicher Komplementarität. **(B)** Das RNA-annealing von je 10 nM der Einzelstränge von HCV-SL3-*full* (Kreis), HCV-SL3-*fork* (Quadrat) und HCV-SL3-*bubble* (Dreieck) wurde bei verschiedenen Temperaturen (10-37 °C) in NF90-Puffer gemessen. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten (Gleichung 11a, s. 2.8) wurden auf die RNA-Konzentration normiert, logarithmiert und gegen das Reziproke der Temperatur aufgetragen. Die thermodynamischen Parameter wurden mittels Gleichung 12-15 ausgewertet (s. 2.8.1) und sind in **Tabelle 19** zusammengefasst. **(C)** Das gleiche Experiment und analoge Auswertung wie **(A)** unter Verwendung der RaSc-*full* (Kreis), RaSc-*fork* (Quadrat) und RaSc-*bubble* (Dreieck).

Tabelle 19. Thermodynamische Parameter des RNA-annealing

	E_A (kcal mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kcal mol ⁻¹)	ΔS^\ddagger (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	$\Delta G^\ddagger_{20^\circ\text{C}^*}$ (kcal mol ⁻¹)
HCV-SL3, T < 20 °C	29.3 ± 1.2	28.7 ± 1.2	66.8 ± 2.8	9.1
HCV-SL3, T > 20 °C	7.2 ± 1.6	6.6 ± 1.6	-8.6 ± 2.1	9.1
HCV-SL3- <i>fork</i> , T < 20 °C	24.3 ± 1.5	23.7 ± 1.5	50.1 ± 3.2	9.1
HCV-SL3- <i>fork</i> , T > 20 °C	4.1 ± 0.8	3.5 ± 0.8	-19.1 ± 4.4	9.1
HCV-SL3- <i>bubble</i>	47.1 ± 0.6	46.5 ± 0.6	129.4 ± 1.7	8.6
RaSc	5.5 ± 0.9	4.9 ± 0.9	-15.8 ± 2.9	9.5
RaSc- <i>fork</i>	6.6 ± 0.8	6.0 ± 0.8	-12.3 ± 1.6	9.6
RaSc- <i>bubble</i>	5.1 ± 1.1	4.5 ± 1.1	-16.9 ± 4.1	9.5

* ΔG^\ddagger wurde mittels Gleichung 13 berechnet. Der Fehler ist ≤ 10%

Verhalten ist für Reaktionen charakteristisch, bei denen sich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt temperaturabhängig ändert (122,123). Somit wird für die Reaktion der Varianten von HCV-SL3 indiziert, dass in den Temperaturbereichen 10 – 20 °C und 20 – 37 °C jeweils ein anderer Reaktionsschritt geschwindigkeitsbestimmend ist. Aus diesem Grund wurden für die Auswertung der

Hybridisierung der Varianten von HCV-SL3 zwei lineare Temperaturbereiche 10 – 20 °C und 20 – 37 °C angenommen (**Tabelle 19**).

Interessanterweise unterschieden sich beide RNA-Systeme (HCV-SL3 und RaSc) nicht erheblich in den Eigenschaften des Übergangszustands im Temperaturbereich 20 - 37 °C. Die Hybridisierung aller RNA-Varianten wies Aktivierungsenergien (E_A) von 4 - 7 kcal mol⁻¹ auf und war von Entropieabnahmen (ΔS^\ddagger) zwischen -20 bis -8 cal mol⁻¹ K⁻¹ begleitet (**Tabelle 19**). Aus der Entropieänderung lässt sich schlussfolgern, dass die Anzahl der Mikrozustände im Übergangszustand im Vergleich zum Ausgangszustand geringer ist. Die positive Aktivierungsenergie weist dagegen auf eine ungünstige Veränderung von Bindungsenthalpien hin. Die Änderung der freien Aktivierungsenthalpie im Übergangszustand betrug bei allen RNA-Varianten $\Delta G^\ddagger = 9 - 10$ kcal mol⁻¹ (**Tabelle 19**). Dementsprechend hatte die Lage der nicht-komplementären Bereiche zwar einen gewissen Einfluss auf die einzelnen Parameter, änderte aber nicht grundlegend die Natur des Übergangszustands. Eine Ausnahme bildete die Variante HCV-SL3-*bubble*, die im Bereich über 20 °C nicht mehr hybridisierten. Vermutlich verhinderten der geringe Schmelzpunkt und die mit zunehmender Temperatur auftretende Destabilisierung der resultierenden dsRNA die Reaktion (Abb. A3).

Im Temperaturbereich 10 – 20 °C traten jedoch signifikante Unterschiede zwischen den RaSc- und HCV-SL3-Varianten auf (**Abb. 25, Tabelle 19**). Im Vergleich zum höheren Temperaturbereich waren die Aktivierungsenergien der Varianten von HCV-SL3 nun mit 30 – 50 kcal mol⁻¹ deutlich erhöht und andererseits waren Entropiezunahmen zwischen 50 – 130 cal mol⁻¹ K⁻¹ im Übergangszustand zu verzeichnen (**Tabelle 19**). Diese zeigte nun eine größere Anzahl der Mikrozustände im Übergangs- als im Ausgangszustand an. Am deutlichsten waren diese Eigenschaften bei der Variante HCV-SL3-*bubble*, bei der die Aktivierungsenergie und der Entropiegewinn im Übergangszustand um etwa Faktor 2 größer als bei HCV-SL3-*full* und HCV-SL3-*fork* waren. Damit belegen diese Ergebnisse eine andere Natur des Übergangszustands des RNA-*annealing* der Varianten von HCV-SL3 im Temperaturbereich von 10 bis 20 °C. Daher konnte bestätigt werden, dass in diesem Temperaturbereich ein anderer geschwindigkeitsbestimmender Schritt als bei der Reaktion über 20 °C vorliegt. Da dieses Verhalten für die RaSc-Varianten hier nicht beobachtet werden konnte, handelt sich hierbei vermutlich um einen RNA-spezifischen Effekt der Varianten von HCV-SL3.

Die Arrhenius-Analyse der RNA-*annealing*-Reaktion der verschiedenen RNAs belegt, dass unabhängig von der Größe und der strukturellen Organisation (Komplementarität) der hybridisierenden ssRNAs der Übergangszustand aller hier analysierten Reaktionen im Bereich 20 – 37 °C sehr analoge Charakteristika aufweist. Im Verlauf des RNA-*annealing* zum Übergangszustand reduziert sich die Anzahl an Mikrozuständen und es entstehen ungünstige Bindungsenergiezustände.

3.3.2 Das NF90-katalysierte RNA-annealing ist durch verbesserte enthalpische Prozesse charakterisiert

Nach der Arrhenius-Analyse des unkatalysierten RNA-annealing, wurden als Nächstes die katalysierten Reaktionen untersucht. Für diesen Zweck wurde ebenfalls ein Arrhenius-Diagramm erstellt, das die Temperaturabhängigkeit des RNA-annealing von HCV-SL3-full bzw. RaSc-full in Gegenwart von NF90, NF90wt-NF45 und NF90^{S651E}-NF45 aufzeigte. Zur Analyse wurden unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen Proteine eingesetzt, um die temperaturabhängige Änderung der jeweiligen RCA besser verfolgen zu können. Die Konzentration wurde so gewählt, dass NF90, NF90wt-NF45 und NF90^{S651E}-NF45 bei 20 °C die gleiche Aktivität zeigten. Die Auswertung der Temperaturabhängigkeit der RCA der Proteine erfolgte wie oben beschrieben.

Wie bei der unkatalysierten Reaktion der HCV-SL3-full wurden auch in Anwesenheit von NF90, NF90wt-NF45 und NF90^{S651E}-NF45 zwei lineare Bereiche im Arrhenius-Diagramm erhalten (**Abb. 26, Tabelle 20**). Zur Auswertung wurde jedoch nur der Bereich 20 - 37 °C herangezogen, da aus dem vorherigen Experiment hervorging, dass es sich bei dem Verhalten im Bereich 10 – 20 °C um einen RNA-spezifischen Effekt handelte.

Im Temperaturbereich 20 – 37 °C konnte in Anwesenheit der verschiedenen Proteine bei HCV-SL3-full und RaSc-full kein Anstieg der apparenten Geschwindigkeitskonstante mit steigender Temperatur beobachtet werden (**Abb. 26A, B**). Daher wurde in Anwesenheit von NF90, NF90wt-NF45 bzw. NF90^{S651E}-NF45 eine Aktivierungsenergie E_A des RNA-annealing von HCV-SL3-full von 0 kcal mol⁻¹ berechnet (**Tabelle 20**). Allerdings verringerte sich in Anwesenheit der Proteine der entropische Beitrag im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion von -8.6 auf -27 cal mol⁻¹ K⁻¹. Das bedeutete nun eine größere Abnahme der Anzahl an Mikrozuständen im Verlauf der RNA-annealing-Reaktion zum Übergangszustand in Anwesenheit der Proteine als bei der unkatalysierten Reaktion. Insgesamt resultierten bei den katalysierten Reaktionen sehr ähnliche Beträge der Änderung der freien Aktivierungsenthalpie von ca. 7.3 kcal mol⁻¹ (**Tabelle 20**). Somit stabilisierten die Proteine den Übergangszustand der RNA-annealing-Reaktion um ca. 1.7 kcal mol⁻¹ im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion. Interessanterweise wurden für das durch NF90-NF45 katalysierte RNA-annealing der RaSc-full sehr ähnliche thermodynamischen Parameter wie für die katalysierten RNA-annealing-Reaktionen der HCV-SL3-full ermittelt (**Abb. 26B, Tabelle 20**).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Übergangszustand der RNA-annealing-Reaktion der getesteten RNAs in Anwesenheit von NF90, NF90wt-NF45 und NF90^{S651E}-NF45 sehr ähnlich charakterisiert ist. Das katalysierte RNA-annealing zeichnet sich durch eine Reduktion der Aktivierungsenergie (E_A) auf 0 kcal mol⁻¹ als mechanistisches Charakteristikum aus. Daraus kann geschlossen werden, dass in Anwesenheit von NF90, NF90wt-NF45 bzw. NF90^{S651E}-NF45 ungünstige energetische Zustände im

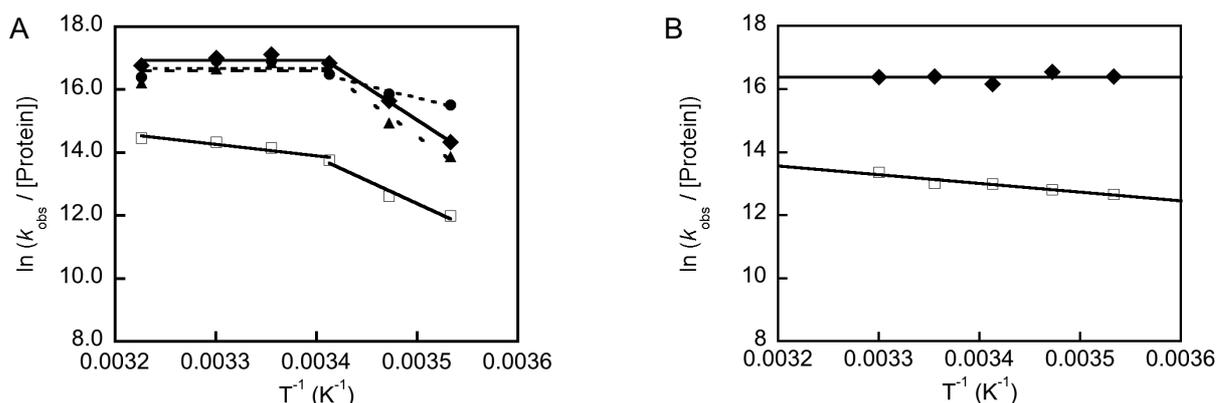


Abbildung 26: NF90wt, NF90wt-NF45, und NF90^{S651E}-NF45 reduzieren die Aktivierungsenthalpie des RNA-annealing. (A) Das RNA-annealing von je 10 nM der Einzelstränge von HCV-SL3-full ohne Zugabe von Protein (Quadrat) oder in Anwesenheit von 500 nM NF90 (Dreieck), 35 nM NF90-NF45 (Raute) und 150 nM NF90^{S651E}-NF45 (Kreis) wurde in NF90-Puffer bei verschiedenen Temperaturen (10-37 °C) gemessen. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten (Gleichung 11a, s. 2.8) wurden auf die eingesetzte RNA-Konzentration normiert, anschließend logarithmiert und gegen 1/T aufgetragen. Die thermodynamischen Parameter wurden mittels Gleichung 12 - 15 ausgewertet (s. 2.8.1) und sind in **Tabelle 20** zusammengefasst. (B) Das gleiche Experiment und analoge Auswertung wie (A) unter Verwendung der RaSc-full in Ab- (Quadrat) und Anwesenheit von NF90wt-NF45 (Raute).

Tabelle 20. Thermodynamische Parameter des RNA-annealing von NF90, NF90-NF45 und NF90^{S651E}-NF45 im Bereich 20 – 37 °C

	E_A (kcal mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kcal mol ⁻¹)	ΔS^\ddagger (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	$\Delta G^\ddagger_{20^\circ\text{C}^*}$ (kcal mol ⁻¹)
HCV-SL3-full	7.2 ± 1.6	6.6 ± 1.6	-8.6 ± 2.1	9.1
HCV-SL3-full + NF90	0 ± 0.08	-0.6 ± 0.08	-27.5 ± 3.7	7.4
HCV-SL3-full + NF90-NF45	0 ± 0.05	-0.6 ± 0.05	-27.0 ± 2.2	7.3
HCV-SL3-full + NF90 ^{S651E} -NF45	0 ± 0.08	-0.6 ± 0.08	-27.7 ± 3.7	7.5
RaSc-full	5.5 ± 0.9	4.9 ± 0.9	-15.8 ± 2.9	9.5
RaSc-full + NF90-NF45	0 ± 0.04	-0.6 ± 0.04	-28.3 ± 1.9	7.7

* ΔG^\ddagger wurde mittels Gleichung 13 berechnet. Der Fehler ist $\leq 10\%$.

Übergangszustand der RNA-annealing-Reaktion kompensiert werden. Widererwarten konnte an dieser Stelle kein Einfluss der Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs von NF90 auf die Natur des Übergangszustand identifiziert werden (s. Diskussion 4.3.3).

3.3.3 Die ssRNA-1-Bindung von NF90 und NF90-NF45 ist enthalpisch getrieben

In vorangegangenen Studien wurde der Übergangszustand der RNA-annealing-Reaktionen in An- und Abwesenheit NF90 bzw. verschiedener Varianten untersucht. Nun sollte als Nächstes der Ausgangszustand der Reaktion, die Bindung der ssRNA,

analysiert werden. Um diesen Prozess in die thermodynamischen Parameter aufzuschlüsseln, wurden van't Hoff-Analysen der Bindung von NF90 und NF90wt-NF45 an ssRNA-1 durchgeführt. Dies erforderte die Bestimmung der Affinität der RNA-Bindung bei verschiedenen Temperaturen. Entsprechende Titrationsen wurden in einem Temperaturbereich von 10 – 30 °C in NF90-Puffer durchgeführt. Die so erhaltenen Assoziationskonstanten wurden logarithmisch gegen $1/T$ aufgetragen und die thermodynamischen Parameter nach van't Hoff mittels Gleichungen 5 und 6 (s. 2.6.2.4) berechnet.

Die Analyse zeigte eine mit zunehmender Temperatur abnehmende Affinität der Bindung von NF90wt und NF90wt-NF45 an ssRNA-1 (**Abb. 27, Tabelle 21**). NF90wt wies dabei eine um etwa 6 kcal mol^{-1} geringere Enthalpieänderung (ΔH^0) der Bindung als der Komplex NF90wt-NF45 auf. Daraus konnte geschlossen werden, dass im Komplex mehr oder stärkere Bindungen in der Assoziation an ssRNA-1 als im Monomer involviert sind. Jedoch war die Bindung von ssRNA-1 an den Komplex durch eine größere Entropieabnahme (ΔS^0) als beim Monomer charakterisiert. Das indizierte eine größere Abnahme an Mikrozuständen bei der Bindung von NF90wt-NF45 an ssRNA-1 als bei der Interaktion von NF90wt mit dieser RNA. Durch den günstigeren enthalpischen Zustand des Komplexes resultierte bei 20 °C eine im Vergleich zum Monomer um $1.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ stärkere Bindung an ssRNA-1 (ΔG^0).

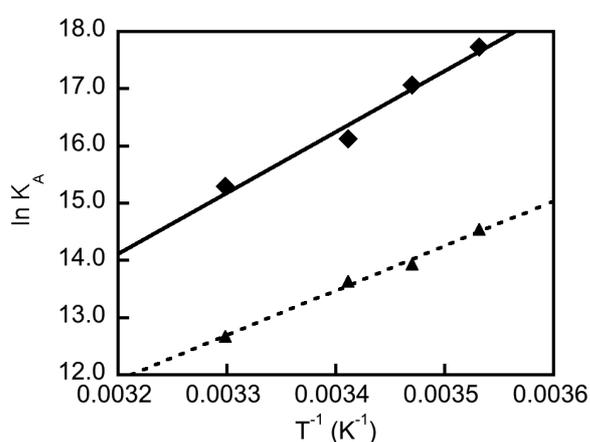


Abbildung 27: Die ssRNA-1-Bindung von NF90wt und NF90-NF45wt verringert die konformationelle Freiheit des Systems. Die Bindung von ssRNA-1 an NF90 (Dreieck) und NF90-NF45 (Raute) wurden bei verschiedenen Temperaturen im Bereich 10 – 30 °C analog vorheriger Titrationsen quantifiziert. Die erhaltenen Assoziationskonstanten (Gleichung 3, s. 2.6.2.2) wurden entsprechend einer van't Hoff-Analyse logarithmiert gegen das Reziproke der Temperatur aufgetragen. Unter Verwendung der Gleichungen 5 und 6 wurden die thermodynamischen Parameter der Bindung berechnet (s. 2.6.2.4) und in **Tabelle 21** zusammengefasst.

Tabelle 21. Thermodynamische Parameter der Bindung von ssRNA-1 an NF90wt und NF90wt-NF45

	ΔH^0 (kcal mol^{-1})	ΔS^0 ($\text{cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)	$\Delta G^0_{20^\circ\text{C}}$ (kcal mol^{-1})	$\Delta G^0_{37^\circ\text{C}}$ (kcal mol^{-1})
NF90-NF45	-21.3 ± 2.4	-40.1 ± 8.2	-9.6 ± 3.3	-8.9 ± 3.3
NF90	-15.5 ± 1.0	-25.9 ± 3.5	-7.9 ± 1.4	-7.5 ± 1.4

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Bindung von NF90wt und NF90wt-NF45 an ssRNA-1 durch einen Entropieverlust gekennzeichnet war (Verlust an Freiheitsgraden). Dieses ungünstige Ereignis wird durch die günstigen enthalpischen Prozesse kompensiert. Dabei induziert die Bindung des Komplexes an ssRNA-1 im Vergleich zum Monomer NF90 einen größeren Verlust an Mikrozuständen bei besserer Enthalpiebilanz.

3.3.4 Die strukturelle Organisation der RNAs beeinflusst die Effektivität der RNA-Chaperon-Aktivität von NF90

In vorangegangenen Experimenten wurde die katalysierte RCA ausschließlich unter Verwendung von vollständig komplementären RNAs untersucht. Daher wurde in nachfolgenden Experimenten untersucht, inwiefern die strukturelle Organisation der entstehenden dsRNA der RNA-*annealing*-Reaktion die katalysierte Reaktion beeinflusst. Dazu wurde die Reaktionen der bereits eingesetzten RNAs HCV-SL3-*bubble* und HCV-SL3-*fork* in An- und Abwesenheit steigender Konzentrationen von NF90wt und NF90wt-NF45 charakterisiert. Diese RNAs wurden so konstruiert, dass erhebliche Unterschiede in ihrer Struktur enthalten sind (s. 3.3).

Zunächst wurde das unkatalysierte RNA-*annealing* untersucht. Dazu wurden steigende Konzentrationen der (-)-Strang-RNA zu 10 nM (+)-Strang-RNA hinzugegeben und die Reaktionen aufgezeichnet. Aus den erhaltenen Progresskurven der RNA-*annealing*-Reaktionen wurden die apparenten Geschwindigkeitskonstanten mittels Gleichung 11a ermittelt (s. 2.8). Im Vergleich zu den vollständig komplementären HCV-SL3-*full* zeigte sich, dass mit den HCV-SL3-*bubble* und HCV-SL3-*fork* unter den gegebenen Reaktionsbedingungen keine hyperbole Konzentrationsabhängigkeit von k_{obs} festgestellt werden konnte. Daher wurde nur k_{on} mit Gleichung 9 berechnet (s. 2.7) und zum Vergleich des RNA-*annealing* der RNAs herangezogen. So lief das RNA-*annealing* der unvollständig komplementären HCV-SL3-*bubble* und HCV-SL3-*fork* kinetisch langsamer als das von HCV-SL3-*full* ab (**Abb. 28, Tabelle 22**). Die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung des RNA-*annealing* der HCV-SL3-*fork* und HCV-SL3-*bubble* war mit 7 bzw. 6 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ um ca. Faktor 2 kleiner als die Reaktion der HCV-SL3-*full* ($k_{\text{on}} = 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Somit wurden Hinweise erhalten, dass die nicht-komplementären Bereiche in HCV-SL3-*fork* und HCV-SL3-*bubble* negative Auswirkungen auf die Assoziation der RNAs hatten. Als Nächstes wurde nun das RNA-*annealing* dieser RNAs in Anwesenheit von NF90wt und NF90wt-NF45 untersucht (**Abb. 28, Tabelle 22**). Unter Verwendung der HCV-SL3-*fork* konnte in Anwesenheit von NF90wt bzw. NF90wt-NF45 eine konzentrationsabhängige Beschleunigung der RNA-*annealing*-Reaktion beobachtet werden. Dabei stimmte der k_{on} -Wert des RNA-*annealing* von HCV-SL3-*fork* in Anwesenheit von NF90wt bzw. NF90wt-NF45 mit dem Wert der entsprechenden

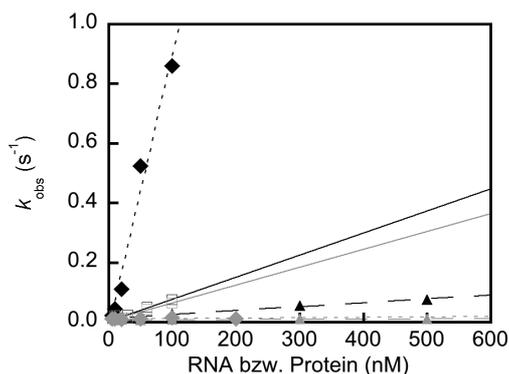


Abbildung 28: Die strukturelle Organisation der RNAs beeinflusst die RCA von NF90. Das RNA-annealing von je 10 nM von HCV-SL3-bubble (grau) und HCV-SL3-fork (schwarz) wurde in Ab- (Quadrat) und Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF90wt (Dreieck) und NF90wt-NF45 (Raute) bei 20 °C in NF90-Puffer gemessen. Die aus den Progresskurven ermittelten Geschwindigkeitskonstanten (Gleichung 11a, s. 2.8) sind gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten und aus der Auftragung berechnete Parameter sind in **Tabelle 22** zusammengefasst.

Tabelle 22. Kinetische Parameter des RNA-annealing von HCV-SL3-fork und HCV-SL3-bubble durch NF90 und NF90-NF45

	(nM)											$k_{\text{on}} 10^5$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
	5	10	20	30	50	60	100	200	300	500		
HCV-SL3-fork		1.0	1.6	2.5		4.9	7.6					0.7
HCV-SL3-fork + NF90		1.1	1.3		1.8		2.7		5.6	7.6		0.1
HCV-SL3-fork + NF90-NF45	2.3	4.4	11.1		52.5		86.0					9.3
HCV-SL3-bubble		2.1	1.1	1.4		4.4	6.6					0.6
HCV-SL3-bubble + NF90		0.8	0.9		0.8		1.0		1.1	1.1		-
HCV-SL3-bubble + NF90-NF45	1.0	1.0	1.0		1.2		1.5	1.2				-

In der Tabelle sind die k_{obs} -Werte der Reaktion bei der gekennzeichneten RNA- bzw. Proteinkonzentration angegeben.

Reaktion der HCV-SL3-full fast überein. Im Gegensatz dazu waren NF90wt und NF90wt-NF45 nicht in der Lage, das RNA-annealing der HCV-SL3-bubble konzentrationsabhängig zu beschleunigen. Die Konstante war bei beiden Proteinen ca. $k_{\text{obs}} = 0.01 \text{ s}^{-1}$.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die strukturelle Organisation der RNAs die un- sowie proteinkatalysierte RNA-annealing-Reaktion beeinflusst. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Lage nicht-komplementärer Bereiche der entstehenden dsRNA eine Bedeutung für die katalysierte Reaktion hat. Es zeigte sich, dass NF90wt-NF45 bzw. NF90wt kein RNA-annealing der Struktur der HCV-SL3-bubble durchführt. Folglich wird eine Strukturspezifität der NF90- bzw. NF90-NF45-katalysierten RNA-annealing-Reaktion angedeutet.

3.3.5 NF90wt und NF90wt-NF45 katalysieren eine *strand displacement* Reaktion auf unvollständig komplementären HCV-SL3 RNAs

Wie bereits eingeführt, wird eine weitere elementare Reaktion einer RCA unterschieden: ein *strand displacement*. Bei dieser Reaktion wird ein Strang innerhalb einer vorhandenen dsRNA gegen einen anderen Einzelstrang substituiert (s. 3.2.5, **Abb. 19A**). Es wurde bereits festgestellt, dass die in dieser Arbeit verwendeten HCV-SL3-*full* und RaSc-*full* eine Resistenz gegenüber dieser Reaktion zeigen (Daten nicht gezeigt). Durch die vorherigen Experimente wurde nun deutlich, dass die Positionierung von nicht-komplementären Bereichen in den jeweiligen RNA-Molekülen sowohl die un- als auch die katalysierte RNA-*annealing*-Reaktion kinetisch beeinflusst. Des Weiteren wurde darauf eingegangen, dass die unvollständig komplementären dsRNAs HCV-SL3-*bubble* und HCV-SL3-*fork* eine geringere Schmelzenthalpie als die vollständig komplementäre dsRNA HCV-SL3-*full* aufweisen (s. 3.3.4 und Anhang 7.2.2). Aus diesen Gründen sollte nun geprüft werden, ob die besondere strukturelle Organisation der HCV-SL3-*bubble* bzw. HCV-SL3-*fork* eine *strand displacement* Reaktion ermöglichen. Wie bei der RNA-*annealing*-Reaktion wurde sich experimentell an der Methode von Rajkowitsch *et al.* orientiert (118,119). Demzufolge wurde zunächst die RNA-*annealing*-Reaktion entsprechender RNAs für 300 s inkubiert und fluorimetrisch verfolgt. Das *strand displacement* wurde dann durch Zugabe eines 10-fach molaren Überschusses einer unmarkierten RNA induziert und das Signal für weitere 300 s aufgezeichnet (118,119). Ein *strand displacement* äußerte sich dann in einer Abnahme des Fluoreszenzsignals (**Abb. 19A**). Die Progresskurven des *strand displacement* wurden entsprechend Rajkowitsch *et al.* nach einer einfach-exponentiellen Reaktion 1. Ordnung (Gleichung 7, s. 2.7) ausgewertet (118,119).

Im Zuge dieser Experimente stellte sich heraus, dass in Abwesenheit von Protein die dsRNAs der HCV-SL3-*bubble* und HCV-SL3-*fork* eine unterschiedliche Neigung zum *strand displacement* zeigten. Während mit der HCV-SL3-*fork* kein Strangaustausch beobachtet werden konnte, wurde eine effiziente Substitution bei HCV-SL3-*bubble* erreicht (**Abb. 29B, Tabelle 23**). Aus diesen Progresskurven des *strand displacement* der HCV-SL3-*bubble* konnte unter Standardbedingungen eine apparente Geschwindigkeitskonstante von $k_{\text{obs}} = 0.02 \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden.

Unter Zugabe steigender Konzentrationen von NF90wt oder NF90wt-NF45 wurde bei HCV-SL3-*bubble* und HCV-SL3-*fork* eine Beschleunigung des *strand displacement* beobachtet (**Tabelle 23**). Allerdings lief der Austausch bei HCV-SL3-*fork* auch unter den höchsten Proteinkonzentrationen nur mit maximal 0.004 s^{-1} ab. Im Gegensatz dazu konnte bei Verwendung der HCV-SL3-*bubble* eine deutlich Beschleunigung der Reaktion in Anwesenheit der Proteine beobachtet werden. Dabei zeigte k_{obs} eine Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration. Die daraus resultierenden

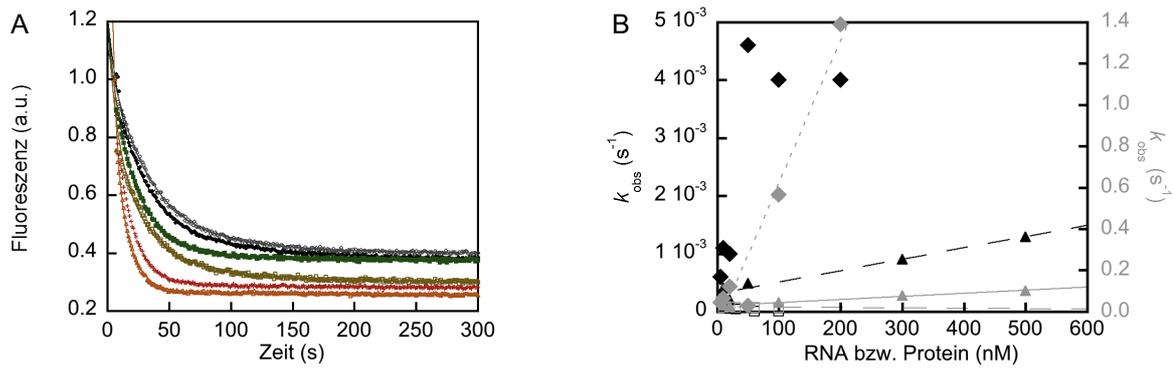


Abbildung 29: NF90wt und NF90wt-NF45 katalysieren ein strand displacement von HCV-SL3-bubble. (A) Das strand displacement von HCV-SL3-bubble (je 10 nM Einzelstrang) wurden in Anwesenheit von 10 – 500 nM NF90 (schwarz – orange) bei 20 °C in NF90-Puffer gemessen. Zur Induktion des Austauschs wurde nach 300 s prä-Inkubation der RNA mit NF90 ein 10-fach molarer Überschuss von unmarkierter HCV-SL3(-)RNA hinzugegeben. (B) Die aus den Progresskurven ermittelten Geschwindigkeitskonstanten des strand displacement (Gleichung 11a, s. 2.8) von HCV-SL3-bubble (grau, Quadrat) und HCV-SL3-fork (schwarz, Quadrat) in Ab- (Dreieck) und Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF90 (Dreieck) und NF90-NF45 (Raute) sind gegen die RNA- bzw. Proteinkonzentration aufgetragen (20 °C, NF90-Puffer). Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten und aus der Auftragung berechnete Parameter sind in **Tabelle 23** zusammengefasst.

Tabelle 23. Kinetische Parameter des strand displacement von NF90wt und NF90wt-NF45

	(nM)										$k_{on} 10^5$ ($M^{-1} s^{-1}$)
	5	10	20	30	50	60	100	200	300	500	
HCV-SL3-fork	kein strand displacement										
HCV-SL3-fork + NF90		0.04	0.02		0.05				0.09	0.13	0.02
HCV-SL3-fork + NF90-NF45	0.06	0.1	0.1		0.46		0.4	0.4			0.2
HCV-SL3-bubble	2.2										
HCV-SL3-bubble + NF90		3.1	2.8		3.7		4.5		7.7	10.2	2
HCV-SL3-bubble + NF90-NF45	4.4	6.6	12.2		28.8		56.8	138			70

In der Tabelle ist $k_{obs} 10^2 (s^{-1})$ der Reaktionen bei der gekennzeichneten RNA- bzw. Proteinkonzentration angegeben.

Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung der proteinkatalysierten Reaktion entsprachen in guter Näherung den Konstanten des katalysierten RNA-annealing der vollständig komplementären HCV-SL3-full ($k_{on} = 0.2$ und $7 \cdot 10^6 M^{-1} s^{-1}$ für NF90wt bzw. NF90wt-NF45, **Tabelle 23**). Somit stellte in Anwesenheit der Proteine der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des strand displacement eine bimolekulare Reaktion dar. Dementsprechend limitierte die monomolekulare Dissoziation der HCV-SL3-bubble dsRNA nicht die Reaktion.

Es konnte belegt werden, dass die strukturelle Organisation der vorliegenden RNAs das Ausmaß der elementaren RNA-annealing und strand displacement-Reaktion signifikant beeinflussen. Es wurden Hinweise erhalten, dass NF90wt und NF90wt-NF45 unter

bestimmten Voraussetzungen konzentrationsabhängig ein *strand displacement* katalysieren. Damit zeigen die Proteine beide grundsätzliche Eigenschaften, RNA-*annealing* sowie *strand displacement*, eines echten RNA-Chaperons.

3.4 Untersuchungen zur biologischen Relevanz der RNA-Chaperon-Aktivität von NF90

Die vorherigen Untersuchungen beschäftigten sich ausschließlich mit den biophysikalischen und proteinbiochemischen Eigenschaften von NF90 bzw. deren Veränderungen durch die Heterodimerisierung mit NF45. Als Nächstes sollte die biologische Bedeutung der identifizierten RNA-Chaperon-Aktivität untersucht werden. Dafür wurden zwei Funktionen von NF90/NF90-NF45 gewählt: a) Die Wirtsfaktorfunktion von NF90 in der Replikation des Hepatitis-C-Virus und b) die Interaktion des Proteins mit der VEGF-mRNA (s. 1.2). Das besondere an diesen Beispielen ist, dass hier jeweils die Bindestelle von NF90 in den RNAs ermittelt werden konnte und die biologischen Funktionen dieser NF90-RNA-Interaktionen gut dokumentiert sind. Auf die VEGF-mRNA wird weiter unten noch einmal eingegangen (s. 3.4.5). Die Verwendung von NF90wt, NF90wt-NF45 sowie der pseudophosphorylierten Komplex-Variante NF90^{S651E}-NF45 sollte dabei eine Korrelation zwischen dem beobachteten Effekt des Proteins und der Effizienz der RCA ermöglichen.

An dieser Stelle soll noch einmal kurz die Wirtsfaktorfunktion von NF90 bei der Replikation des Hepatitis C-Virus *in cellulo* aufgegriffen werden (58-60). Wie einführend beschrieben, wird im ersten Schritt der viralen Replikation ausgehend vom (+)-Strang-RNA-Genom ein vollständig komplementäres (-)-Strang-RNA-Intermediat synthetisiert. Dieser Schritt wird von der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP) katalysiert. Es wurde nun festgestellt, dass die Präsenz von NF90 die Replikation des HCV-Genoms *in cellulo* stimuliert und NF90 mit dem viralen Replikationskomplex kolokalisiert (58,59).

In nachfolgenden Experimenten wurde daher ein RNA-abhängiger RNA-Polymerase-Assay (RdRP-Assay) als experimentelles System verwendet, der diesen ersten Replikationsschritt, die Synthese der (-)-Strang-RNA, mittels viralem RNA-Templat und der viralen Polymerase (NS5B) *in vitro* rekonstituiert. Behrens *et al.* entwarfen bereits früher die Grundlagen dieses Assays für das HCV-System (67). Zur Etablierung des in der vorliegenden Arbeit präsentierten RdRP-Assays wurde sich zusätzlich an der Arbeit von Friedrich *et al.* (124) orientiert, die einen modifizierten Assay für das HCV-verwandte West-Nil-Virus beschreibt. Nach der Etablierung dieses Systems sollten NF90wt, NF90wt-NF45 und NF90^{S651E}-NF45 auf ihren Einfluss auf die (-)-Strang-Synthese untersucht werden.

3.4.1 Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase katalysiert die Synthese von (-)-Strang-RNA auf der viralen 5BSL3.1_3'-UTR

Für die Experimente wurde die virale Polymerase NS5B (nachfolgend RdRP) vom Genotyp HCV-1b verwendet (bereitgestellt von Dr. Stefan Reich, ehem. MLU Halle-Wittenberg, (112)). In der vorliegenden Arbeit wurde nun die enzymatische Aktivität des Proteins in einem radioaktiven RdRP-Assay *in vitro* untersucht. Die durch die RdRP synthetisierte RNA sollte durch den Einbau eines radioaktiv-markierten Nukleotids (^{32}P -[α]-CTP) mittels Szintillationsmessung detektiert werden. Dementsprechend setzte sich die Reaktion aus der viralen Polymerase (100 nM), einem RNA-Templat (30 nM) und einem Ribonukleotidmix (ATP, GTP, UTP) in Anwesenheit von zweiwertigen Metallionen (Mn^{2+} , Mg^{2+}) zusammen. Als RNA-Templat wurde die RNA 5BSL3.1_3'-UTR (394 nt, HCV-1b, Con1-Isolat, **Abb. 30A**) eingesetzt, die neben der vollständigen 3'-UTR des viralen Genoms auch die Strukturelemente der 5BSL3-Region beinhaltet. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass Strukturelemente beider Regionen in intramolekularen RNA-RNA-Interaktionen des 5BSL3 *pseudoknot* involviert und essentiell für eine Replikation von HCV *in cellulo* sind (s. Einleitung und (73,75,125)). Als weiteres RNA-Templat wurde die virale X-tail-RNA (125 nt, **Abb. 30A**) eingesetzt, die eine verkürzte Variante der 3'-UTR darstellt. Im Unterschied zu 5BSL3.1_3'-UTR fehlt diesem Substrat u.a. die 5BSL3-Region und somit auch der 5BSL3-*pseudoknot* als essentielles RNA-Strukturelement der Replikation. Mit diesen RNAs sollte die Authentizität des *in vitro*-RdRP-Assays belegt werden. Außerdem wurde zusätzlich poly(rC) als Substrat eingesetzt (1 μg im Ansatz, Verwendung von ^{32}P -[α]-GTP). Unter Verwendung der verschiedenen RNA-Templates resultierten bei 5BSL3.1_3'-UTR und poly(rC) signifikante Aktivitäten, die sich deutlich von der Reaktion ohne Templat unterschieden (**Abb. 30B**). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die detektierte Aktivität auf kontaminierende RNAs in der NS5B-Präparation zurückzuführen war. Des Weiteren wurde bei der Reaktion mit 5BSL3.1_3'-UTR lediglich minimale Aktivität detektiert, wenn nur das radioaktiv-markierte Nukleotid ^{32}P -[α]-CTP statt eines kompletten rNTP-Mix eingesetzt wurde (**Abb. 30B** „nur ^{32}P -[α]-CTP“). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die virale Polymerase unter den gegebenen Reaktionsbedingungen eine signifikante terminale Transferase-Aktivität besitzt (Hinzufügen von Nukleotiden am 3'-Ende des RNA-Templats). Daher handelte es sich bei den Templaten 5BSL3.1_3'-UTR und poly(rC) dementsprechend um die Detektion der neusynthetisierten (-)-Strang-RNA. In den Experimenten, denen die X-tail-RNA als Templat zugesetzt war, konnte keine signifikante Aktivität detektiert werden. Folglich rekonstituierte der RdRP-Assay nur unter Verwendung der 5BSL3.1_3'-UTR den ersten Schritt der Replikation des Hepatitis C-Virus *in vitro*.

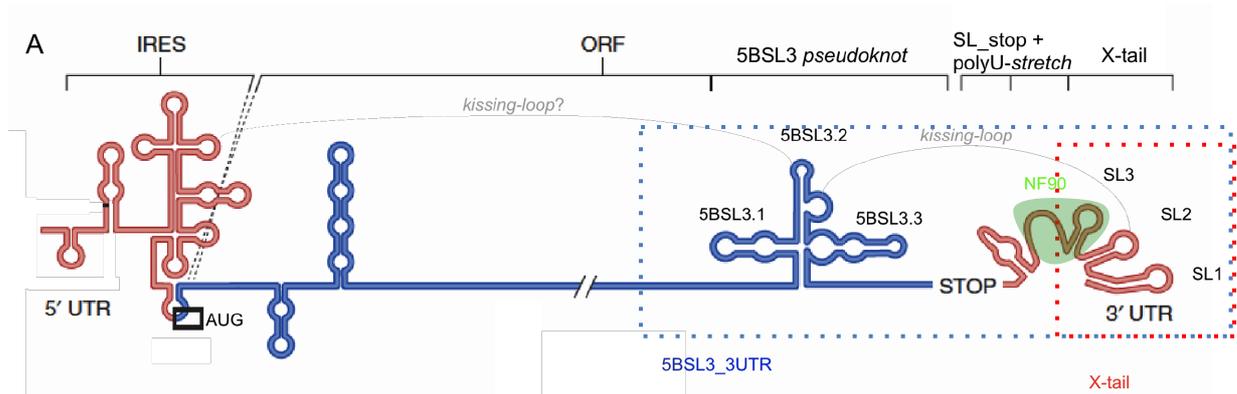


Abbildung 30: HCV-RdRP katalysiert die (-)-Strang-RNA-Synthese auf 5BSL3.1_3'-UTR *in vitro*. (A) Schematische Darstellung des HCV-Genoms (s. Abb. 2, modifiziert nach Scheel und Rice (65)). Am 3'-Ende des ORF ist der 5BSL3 pseudoknot lokalisiert. Dieser geht eine kissing-loop-Interaktion mit SL2 im X-tail ein. Am 3'-Ende der viralen 3'-UTR initiiert die RdRP, für deren Funktion die Regionen 5BSL3 und X-tail essentiell sind (70). Daher wurden 5BSL3.1_3'-UTR (394 nt, blauer Kasten) und X-tail (125 nt, roter Kasten) als Template des *in vitro* RdRP-Assays verwendet. Die von Isken et al. identifizierte Bindestelle von NF90 bzw. NF90-NF45 im viralen Genom ist grün markiert (58). (B) 100 nM RdRP (HCV-1b) wurden mit 30 nM 5BSL3.1_3'-UTR, 30 nM X-tail oder 1 µg poly(rC) als Template im RdRP-Assay zur Reaktion gebracht. Nach einer Stunde Inkubation bei 20 °C wurden die Ansätze einer Phenol-Chloroform-Extraktion sowie Ethanol-Präzipitation unterzogen und die Radioaktivität mittels Szintillationsmessung bestimmt. Die Ansätze „ohne Templat“ und „nur ³²P-CTP“ (Templat: 5BSL3.1_3'-UTR) enthielten bis auf ein RNA-Templat bzw. einen NTP-Mix sämtliche Komponenten der Reaktion und dienen als Negativkontrollen. Der Mittelwert aus drei verschiedenen Experimenten ist angegeben. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung.

3.4.2 NF90-NF45 stimuliert die RdRP-katalysierte (-)-Strang-RNA-Synthese *in vitro*

Nach der Etablierung des RdRP-Assays wurden nun NF90wt, das Heterodimer NF90wt-NF45 sowie die Komplex-Variante NF90^{S651E}-NF45 auf ihre Aktivität im RdRP-Assay *in vitro* untersucht. Steigende Konzentrationen der Proteine wurden mit 30 nM Templat präinkubiert, bevor die Reaktionen durch Zugabe von 100 nM RdRP gestartet wurden. Bei 5BSL3.1_3'-UTR als Templat konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung der *in vitro* (-)-Strang-RNA-Synthese von der RdRP nach Komplementation mit NF90wt-NF45 quantifiziert werden (Abb. 31A). So stimulierten bereits Konzentrationen von NF90wt-NF45 ab 10 nM die Syntheseaktivität der RdRP. In den Ansätzen mit 30, 60 bzw. 100 nM NF90-NF45 wurde ein maximaler Stimulationsfaktor von etwa 2.5 gegenüber der Kontrollreaktion erreicht. Mit 200 nM des Komplexes konnte hingegen kein stimulierender Effekt mehr nachgewiesen werden. Nach Komplementation des

RdRP-Assays mit NF90wt oder der pseudophosphorylierten Komplex-Variante NF90^{S651E}-NF45 konnte unter Verwendung des Templats 5BSL3.1_3'-UTR keine Steigerung der (-)-Strang-RNA-Synthese von der RdRP festgestellt werden. Damit stimulierte nur NF90wt-NF45 die Aktivität der RdRP auf diesem Templat.

Um auszuschließen, dass NF90wt-NF45 generell die Aktivität der viralen Polymerase stimulierte, wurden die bereits verwendeten Matrizen X-tail-RNA sowie poly(rC) in parallel durchgeführten RdRP-Assays eingesetzt. Mit beiden Templaten konnte bei keinem der eingesetzten Proteine (NF90wt, NF90wt-NF45, NF90^{S651E}-NF45) eine Stimulation der *in-vitro*-Aktivität der RdRP festgestellt werden (**Abb. 31B, C**). Diese Ergebnisse belegen, dass NF90wt-NF45 keinen direkten Einfluss auf die Polymerase selbst ausübt und zeigen somit, dass der stimulierende Effekt von NF90wt-NF45 vom eingesetzten RNA-Templat abhängt. Damit konnte nur NF90wt-NF45 eine spezifische Stimulation der viralen RdRP nachgewiesen werden und das auch nur im Falle der 5BSL3.1_3'-UTR RNA, dem Templat, das auch von der Polymerase am effizientesten für die (-)-Strang-RNA-Synthese genutzt wird. Das legt die Vermutung nahe, dass die RNA-Chaperon-Aktivität von NF90wt-NF45 zum stimulierenden Effekt des Proteins beiträgt.

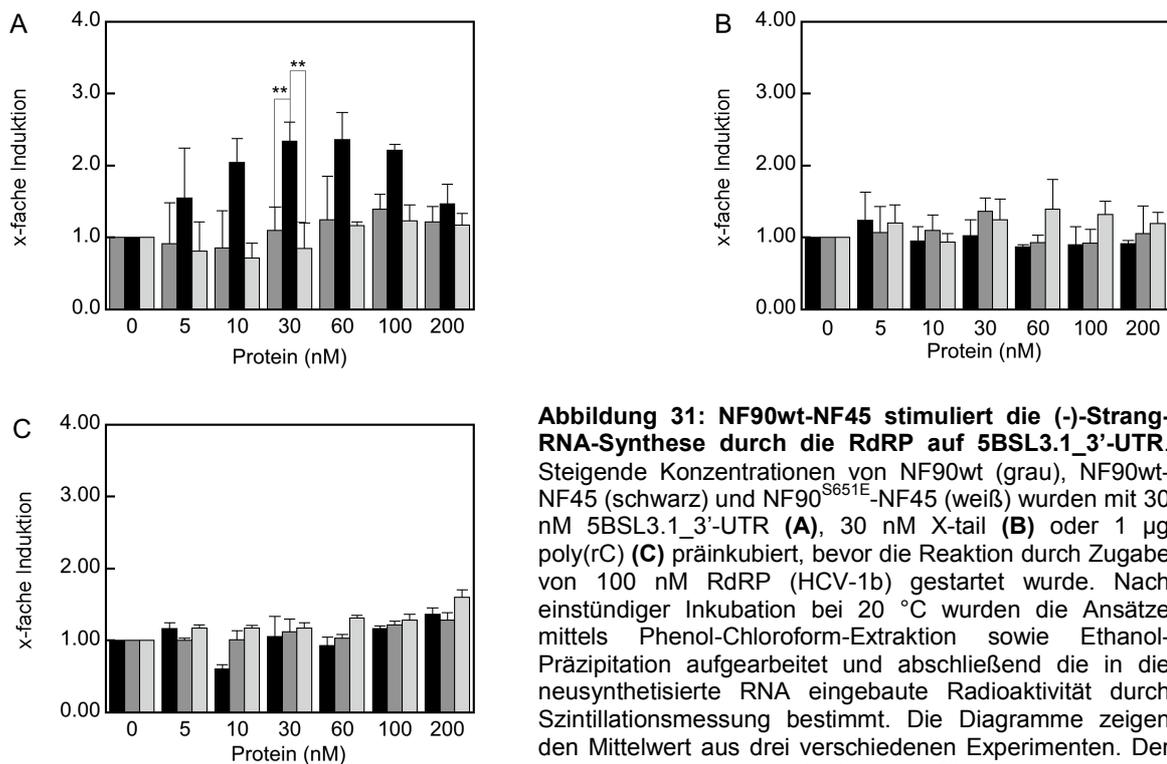


Abbildung 31: NF90wt-NF45 stimuliert die (-)-Strang-RNA-Synthese durch die RdRP auf 5BSL3.1_3'-UTR. Steigende Konzentrationen von NF90wt (grau), NF90wt-NF45 (schwarz) und NF90^{S651E}-NF45 (weiß) wurden mit 30 nM 5BSL3.1_3'-UTR (**A**), 30 nM X-tail (**B**) oder 1 µg poly(rC) (**C**) präinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 100 nM RdRP (HCV-1b) gestartet wurde. Nach einstündiger Inkubation bei 20 °C wurden die Ansätze mittels Phenol-Chloroform-Extraktion sowie Ethanol-Präzipitation aufgearbeitet und abschließend die in die neusynthetisierte RNA eingebaute Radioaktivität durch Szintillationsmessung bestimmt. Die Diagramme zeigen den Mittelwert aus drei verschiedenen Experimenten. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung. Statistische Prüfung mit *Student's t-Test, paired data* (**) $p < 0.01$

3.4.3 NF90wt-NF45 verändert die Struktur oder Konformation von 5BSL3.1_3'-UTR

Im vorangegangenen Experiment wurde beobachtet, dass nur NF90wt-NF45 die (-)-Strang-Synthese von der RdRP spezifisch stimuliert. Es wurde vermutet, dass die RCA des Komplexes bei dieser Funktion eine Bedeutung hat. In diesem Zusammenhang ist es besonders interessant, dass die in 5BSL3.1_3'-UTR enthaltenen RNA-Regionen 5BSL3 und X-tail des viralen Genoms in intramolekularen RNA-RNA-Wechselwirkungen involviert sind (**Abb. 30A** und Einleitung). Dabei definieren diese Interaktionen Konformere der viralen RNA, die putativ unterschiedliche Replikationsaktivitäten besitzen (74,75,126). Aus diesem Grund wurde nun die Hypothese verfolgt, dass NF90wt-NF45, aber weder NF90 noch NF90^{S651E}-NF45 in die Konformationsgleichgewichte von 5BSL3.1_3'-UTR eingreift.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Schmelzanalysen von 5BSL3.1_3'-UTR durchgeführt. Dafür sollte die thermische Denaturierung von 5BSL3.1_3'-UTR unter den Bedingungen des RdRP-Assays untersucht werden. Diese Methode erlaubt die Detektion RNA-Struktur verändernder Effekte der Proteine (120). Dementsprechend wurde die thermische Denaturierung von 30 nM 5BSL3.1_3'-UTR in An- und Abwesenheit von 60 nM NF90wt-NF45, NF90 bzw. NF90^{S651E}-NF45 im RdRP-Assaypuffer untersucht. Bei dieser Proteinkonzentration wurde zuvor die maximale Stimulation von NF90wt-NF45 auf die (-)-Strang-RNA-Synthese von der RdRP beobachtet (**Abb. 31A**).

Die Schmelzkurve von 5BSL3.1_3'-UTR in Abwesenheit von Protein zeigte keine eindeutige Transition in den denaturierten Zustand (**Abb. 32A**). Daher wurde zur Bestimmung des Schmelzpunktes die erste Ableitung der ermittelten Kurve nach Mergny & Lacroix (120) herangezogen (**Abb. 32B**). Diese Analyse wies auf einen Schmelzpunkt von 5BSL3.1_3'-UTR bei ca. 68 °C hin. Des Weiteren charakterisierte der flache Anstieg der Transition eine äußerst geringe Kooperativität.

Die Anwesenheit der verschiedenen Proteine resultierte in jeweils einem anderen Schmelzverhalten von 5BSL3.1_3'-UTR. Dabei konnten nach Komplementation mit NF90wt-NF45 drei deutlich separierte Transitionen der thermischen Denaturierung von 5BSL3.1_3'-UTR mit Schmelzpunkten bei ca. 58 °C, 68 °C und > 80 °C (blaue Pfeile) beobachtet werden (**Abb. 32**, gestrichelt). Ab ca. 85 °C trat eine Präzipitation von NF90wt-NF45 (schwarzer Pfeil) auf. Diese Daten wurden über Lichtstreuung bei 360 nm ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise trat in Anwesenheit von NF90wt die Transition mit dem Schmelzpunkt der RNA von $T_M > 80$ °C nicht auf. Hier manifestierte NF90wt nur jene Transition mit einem Schmelzpunkt von 5BSL3.1_3'-UTR um 58 °C (**Abb. 32**, violett).

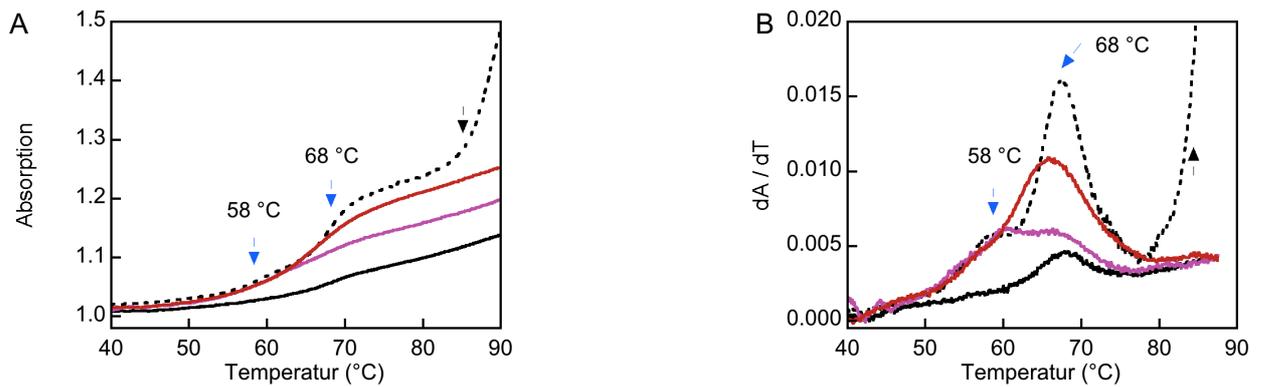


Abbildung 32: NF90wt, NF90wt-NF45 und NF90^{S651E}-NF45 verändern die Konformation der RNA 5BSL3.1_3'-UTR. (A) Die thermische Denaturierung von 30 nM 5BSL3.1_3'-UTR in Ab- (schwarz) und Anwesenheit von 60 nM NF90 (violett), NF90^{S651E}-NF45 (rot) oder NF90wt-NF45 (gestrichelt) wurden in RdRP-Assay-Puffer in einem Bereich von 10 – 90 °C bei 268 nm verfolgt. Der Temperaturgradient betrug 0.4 K min⁻¹. Jede Kurve wurde auf die gemessene Absorption bei 268 nm bei 10 °C normiert. (B) 1. Ableitung (dA/dT) der in (A) gemessenen Kurven zur Bestimmung der Schmelzpunkte. Die blauen Pfeile markieren die detektierten Schmelzpunkte bei 58 °C bzw. 68 °C (blaue Pfeile). Der schwarze Pfeil markiert die Temperatur, an der Präzipitation von NF90-NF45 auftrat.

Die Transition mit dem Schmelzpunkt bei 68 °C war ähnlich ausgeprägt wie in Abwesenheit von Protein.

Nach Komplementation mit der Komplex-Variante NF90^{S651E}-NF45 konnten ebenfalls Transitionen von 5BSL3.1_3'-UTR mit Schmelzpunkten bei 58 °C und auch bei 68 °C identifiziert werden (**Abb. 32**, rot). Der letzte war aber weniger stark ausgeprägt als bei NF90wt-NF45. Die Komplex-Variante erzeugte nicht die Transition der RNA mit dem Schmelzpunkt von $T_M > 80$ °C. Somit konnte in Anwesenheit jedes der getesteten Proteine die Transition mit dem Schmelzpunkt bei 58 °C beobachtet werden. Dagegen konnte nur bei den beiden Komplexen jene Transition mit dem Schmelzpunkt bei 68 °C bestimmt werden und nur NF90wt-NF45 war in der Lage, die Transition mit einem Schmelzpunkt von $T_M > 80$ °C zu induzieren. Darüber hinaus fiel auf, dass die Anwesenheit der Proteine eine signifikant höhere Kooperativität der thermischen Denaturierung der RNA verursachte.

In weiterführenden Experimenten wurde der Einfluss von NF90wt, NF90wt-NF45 und der pseudophosphorylierten Komplex-Variante auf die thermische Denaturierung der X-tail-RNA analysiert. Interessanterweise konnten mit dieser RNA mit keinem der Proteine zu 5BSL3.1_3'-UTR vergleichbare Auswirkungen gemessen werden, da die Proteine vor dem thermischen Übergang der X-tail RNA präzipitierten (Daten nicht gezeigt). Es wird angedeutet, dass die Proteine nur auf der komplex aufgebauten 5BSL3.1-3'-UTR, deren Struktur für die HCV-Replikation essentiell ist und auch am effizientesten von der Polymerase als Templat genutzt wird, Konformationsänderungen der RNA bewirken.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Protein-vermittelten Konformationen von 5BSL3.1_3'-UTR zusätzliche Strukturelemente als die RNA-Konformation in Abwesenheit der Proteine aufweisen. Nur nach Komplementation mit NF90wt-NF45 wird eine spezifische Struktur von 5BSL3.1_3'-UTR induziert, dass Strukturelemente mit Schmelzpunkten > 80

°C resultieren. Da dies mit Ergebnisse des RdRP-Assays korreliert, wird nahe gelegt, dass dieses RNA-Strukturelement für die Aktivität der RdRP eine Bedeutung hat, und dass die RNA-Chaperon-Aktivität von NF90wt-NF45 zu den beobachteten Effekten beiträgt.

3.4.4 Die HCV-3'UTR nimmt alternative Konformationen ein

Im vorangegangenen Experiment konnte festgestellt werden, dass NF90wt-NF45 die Konformationen bzw. Struktur der 5BSL3.1_3'-UTR verändert und spezifische RNA-Strukturelemente induziert. Um eine Aussage darüber zu erhalten, um welche RNA-Elemente es sich handelt, wurde eine systematische Analyse der Schmelzkurven von Strukturelemente von 5BSL3.1_3'-UTR in Abwesenheit von Protein durchgeführt. Dazu wurden 3'-Fragmente von 5BSL3.1_3'-UTR hergestellt und ihr Schmelzverhalten untersucht (**Abb. 33A**). Gegenüber der Analyse isolierter Struktureinheiten sollten dadurch auch tertiäre Wechselwirkungen berücksichtigt werden. Zur Konstruktion der RNA-Fragmente wurde der *mfold*-Webserver zur Vorhersage der Sekundärstruktur genutzt (127). Zur Analyse der Schmelzpunkte wurde erneut die 1. Ableitung der Kurven dA/dT herangezogen.

Für alle analysierten RNAs konnten Schmelzpunkte im Bereich 50 – 90 °C ermittelt werden (**Abb. 33B, C**). In **Tabelle 24** sind spezifische Schmelzpunkte aufgelistet, die für die verschiedenen RNA-Fragmente bestimmt werden konnten. Eine präzise Zuordnung eines Schmelzpunkts zu einem Strukturelement konnte nur für SL1 mit einem Schmelzpunkt von ca. 86 °C erfolgen. In der Transition der SL2-RNA konnte kein weiterer Schmelzpunkt beobachtet werden. Die X-tail-RNA wies zwei schwache Schmelzbereiche um 64-68 °C und 86 °C auf, wodurch eine Zuordnung zur vorhergesagten Struktur des X-tails (**Abb. 33B, C, Tabelle 24**) nicht erfolgen konnte. Im Schmelzverhalten des Fragments polyU manifestierte sich ein breiter Schmelzbereich mit einer Schulter bei 58 °C und Maxima bei 68 °C und 86 °C. Der breite Schmelzbereich stellt an dieser Stelle einen Hinweis auf mögliche alternative Konformationen dar. In den größeren RNAs SL_stop und 5BSL3.1_3'-UTR nahm die Ausprägung der Schmelzbereiche wieder deutlich ab. In 5BSL3.1_3'-UTR konnte erneut nur ein signifikanter Schmelzpunkt von 68 °C ermittelt werden (**Tabelle 24**).

Bei der Schmelzpunktanalyse fielen auch unterschiedliche Stärken der Kooperativität sowie Amplituden der Übergänge der verschiedenen RNAs auf (**Abb. 33B, C, Tabelle 24**). SL1, SL2 und X-tail zeigten die schwächsten Amplituden und Kooperativitäten der Transitionen, während mit der polyU-RNA, die entsprechend der Vorhersage kein weiteres Strukturelement als den X-tail enthielt, Transitionen mit ausgeprägten Kooperativitäten erreicht wurden. Mit zunehmender Länge des Fragments, SL_stop und 5BSL3.1_3'-UTR, nahmen Amplitude und Kooperativität wieder ab. Darüber hinaus

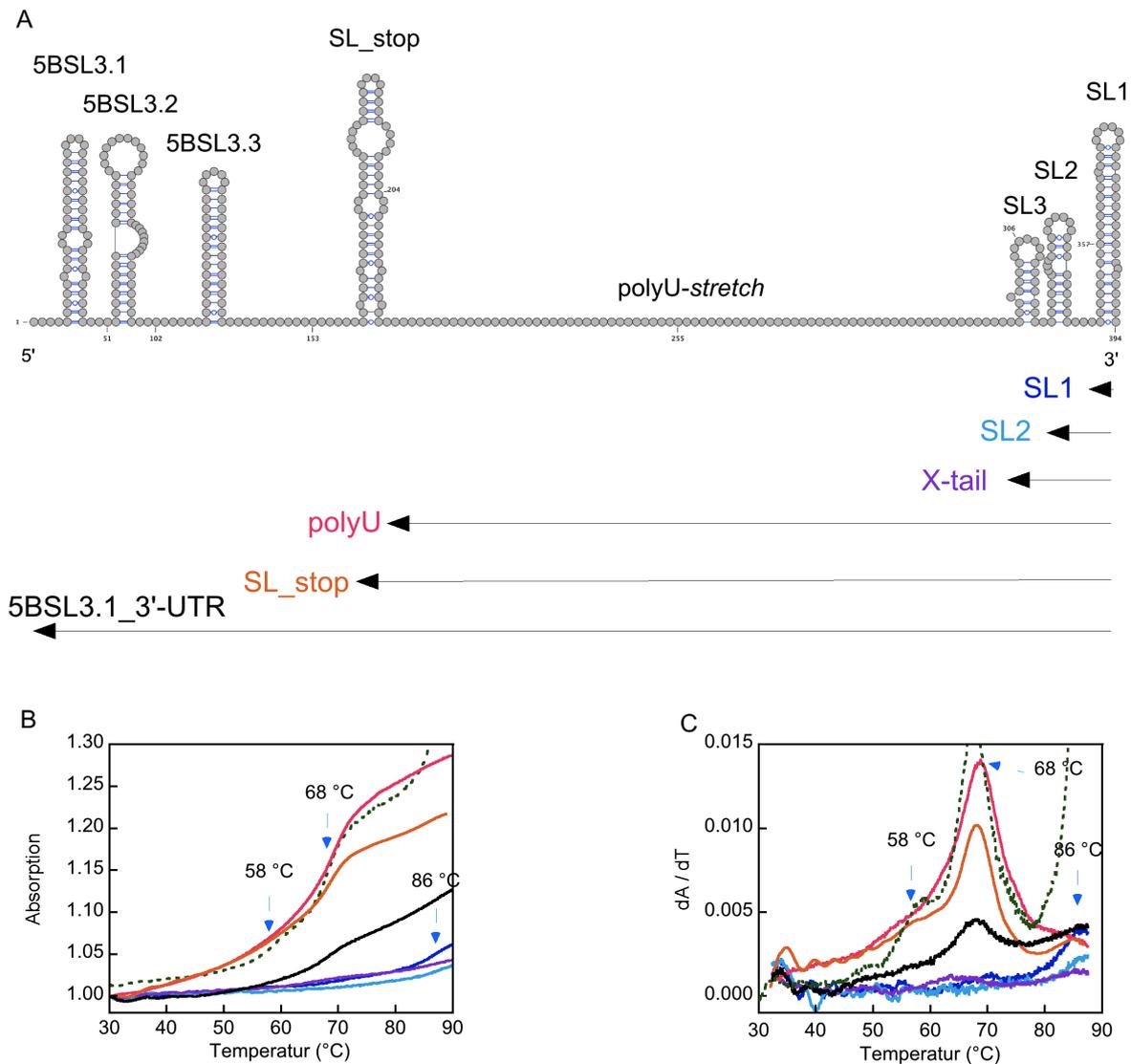


Abbildung 33: Thermische Denaturierung von 3'-Fragmenten von 5BSL3.1_3'-UTR. (A) Schematische Darstellung der Struktur von 5BSL3.1_3'-UTR (basierend auf *mfold*-Vorhersage (127)) und der generierten 3'-Fragmente. Bezeichnungen von Strukturelementen sind über dem entsprechenden Element angegeben. Die Pfeile darunter repräsentieren die Größe des jeweiligen Fragments und indizieren enthaltene Strukturelemente. Die Farbkodierung ist in nachfolgenden Abbildungen beibehalten. (B) Die thermische Denaturierung von 400 nM SL1, SL2, X-tail, polyU, SL_stop und 5BSL3.1_3'-UTR wurden in RdRP-Assay-Puffer im Bereich 10 – 90 °C bei 268 nm verfolgt. Der Temperaturgradient betrug 0.4 K min⁻¹. Jede Kurve wurde auf die gemessene Absorption bei 268 nm bei 10 °C normiert. Die Farbkodierung entspricht dem in (A) angegebenen Schema. (C) 1. Ableitung (dA/dT) der in (B) gemessenen Kurven zur Bestimmung der Schmelzpunkte. Die ermittelten Schmelzpunkte (blaue Pfeile) sind in **Tabelle 24** zusammengefasst.

konnten unterschiedlich starke Anstiege der Basislinie der Transitionen der verschiedenen RNAs festgestellt werden. Signifikante Anstiege der Basislinie können eine Indikation für das Auflösen von Tertiärstrukturen sein (120).

Durch thermische Denaturierung der verschiedenen Fragmente von 5BSL3.1_3'-UTR konnte nur der Schmelzpunkt des Strukturelements SL1 ermittelt werden. Es werden allerdings alternative Konformationen der RNA indiziert, die durch ein unterschiedliches Maß an Kooperativität und unterschiedliche Strukturelemente charakterisiert sind. Der Vergleich der ermittelten Schmelzpunkte der RNA-Fragmente mit den durch NF90-NF45

induzierten Schmelzpunkten von 5BSL3.1_3'-UTR (**Abb. 31**, grün gepunktet) legt nahe, dass in Anwesenheit des Proteinkomplexes primär Strukturelemente des X-tails, insbesondere SL1, populiert werden. Damit korreliert der stimulierende Effekt von NF90wt-NF45 auf die RdRP-Aktivität mit der Induktion von SL1.

Tabelle 24. Schmelzpunkte von 5BSL3.1_3'-UTR und von 3'-Fragmente der RNA

RNA	T _M (°C)*		
	55	68	86
SL1	-	-	++
SL2	-	-	+
X-tail	-	+/-	+/-
polyU	+	+++	+/-
SL_stop	++	++	+/-
5BSL3.1_3'-UTR	-	+	+/-
5BSL3.1_3'-UTR + NF90-NF45	+	++	++

* Anzahl der "+" als Indikator der Ausprägung der jeweiligen Transition (Kooperativität)

3.4.5 NF90-NF45 verändert die Konformation des HsR-SL der VEGF-mRNA

Die vorangegangenen Experimente geben Grund zur Annahme, dass die RNA-Chaperon-Aktivität von NF90wt-NF45 zur Konformationsänderung von RNA, hier am Beispiel der für die Replikationsinitiation wichtigen RNA-Elemente im 3'-Bereich des viralen Genoms (5BSL3.1_3'-UTR), beiträgt. Um diese Eigenschaft von NF90wt-NF45 auch an einem anderen Beispiel zu testen, wurde das HsR-Element der VEGF-mRNA gewählt. Das HsR-Element ist eine RNA-Struktur, die die Bindungsstelle von NF90 in der VEGF-mRNA darstellt (24) und für die experimentelle Hinweise erhalten wurden, dass es in der Regulation der VEGF-Expression involviert ist (42-44). Dabei nehmen zwei Konformere des Elements, *translation permissive* und *translation silencing*, eine zentrale Rolle ein (s. 1.2.1). Es konnte gezeigt werden, dass die NF90-HsR-Interaktion die VEGF-Expression beeinflusst. Aufgrund der mit der HCV-RNA erhaltenen Daten wurde entsprechend postuliert, dass zwischen den beschriebenen Konformationen des HsR-Elements und der beobachteten Funktion von NF90 eine Korrelation besteht. Zur Überprüfung der Hypothese, ob die NF90-HsR-Interaktion zu einer Konformationsänderung der RNA führt, wurde die thermische Denaturierung des zentralen *stem-loop* des HsR-Elements in An- und Abwesenheit des Heterodimers untersucht (**Abb. 34A**, im Folgenden als HsR-SL bezeichnet).

Im Gegensatz zur komplexen 5BSL3.1_3'-UTR handelt es sich bei HsR-SL allerdings nur um einen isolierten *stem-loop* (**Abb. 34A**). Strukturvorhersagen über den *mfold*-Webserver (127) beschreiben keine offensichtlichen alternativen Konformationen dieser RNA, obwohl diese experimentell bewiesen wurden (44). Die auf *mfold*-basierenden Vorhersagen werden jedoch in einem Puffermilieu einer Ionenstärke von 1 M berechnet. Es ist bekannt, dass die Ionenstärke des Umgebungsmilieus einen Einfluss auf die Stabilität von Nukleinsäuren und vor allem deren einzelsträngige *loop*-Regionen hat (128,129). Daher wurde die Präsenz alternativer RNA-Konformationen von HsR-SL durch Variationen der Ionenstärke des Puffers untersucht. Dazu wurden Schmelzkurven von HsR-SL (500 nM) in NF90-Puffer bei steigender Konzentration an NaCl analysiert. Die Auswertung der Transitionskurven (monomolekulare Denaturierung, Zwei-Zustandsmodell, Gleichung 16, s. 2.10) zeigte einen Anstieg der Schmelztemperatur von HsR-SL in Abhängigkeit von der eingesetzten Ionenstärke des Puffers (**Abb. 34B**). Jedoch konnte kein linearer Zusammenhang zwischen dem Schmelzpunkt bzw. der Stabilität der RNA (ΔG) und der Konzentration an NaCl festgestellt werden (nicht gezeigt). Strukturveränderungen von HsR-SL in Abhängigkeit von der Ionenstärke spiegelten sich am deutlichsten in der ermittelten Schmelzenthalpie wider. Wie bereits erwähnt, korreliert der Betrag der Schmelzenthalpie mit der Anzahl aufgebrochener Basenpaare einer Struktur (120). Es konnte festgestellt werden, dass erst ab NaCl-Konzentrationen > 200 mM eine maximale Anzahl an Basenpaaren bei der Denaturierung von HsR-SL aufgelöst wurde (**Abb. 34C**). Basenpaarungen weisen allgemein Schmelzenthalpien von etwa $4.6 - 6.1$ kcal mol⁻¹ auf (130,131). Danach entspricht die Änderung von $\Delta H_{TM} = 100$ kcal mol⁻¹ von HsR-SL bei 400 mM NaCl dem Schmelzen von etwa 16 – 21 bp, während nur 11 – 15 bp ($\Delta H_{TM} = 71.5$ kcal mol⁻¹) in Abwesenheit von NaCl aufgelöst wurden. Dabei konnte ein Schmelzpunkt der HsR-Struktur ab 200 mM NaCl von $T_M = 58$ °C ermittelt werden. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass bei NaCl-Konzentrationen < 200 mM mindestens zwei Konformationen des HsR-Elements präsent waren, die sich um ca. 5 bp unterschieden. Damit konnte die Existenz einer strukturellen Heterogenität des HsR-Elements im NF90-Puffer belegt werden.

Anschließend wurde der Einfluss steigender Konzentrationen von NF90wt-NF45 (60, 120 u. 200 nM) auf das Schmelzverhalten von HsR-SL (500 nM) in NF90-Puffer (100 mM NaCl) untersucht. In Pilotstudien konnte nachgewiesen werden, dass in Anwesenheit des HsR-Elements keine Präzipitation des Heterodimers im gesamten analysierten Temperaturbereich erfolgte (Daten nicht gezeigt). Schon nach Zugabe geringer Konzentrationen von NF90wt-NF45 trat eine Inhomogenität der Transitionskurve von HsR-SL auf (**Abb. 34D**). Daher war eine quantitative Auswertung mittels Gleichung 16 (Zwei-Zustandsmodell, s. 2.10) nicht möglich und es wurde an dieser Stelle die 1.

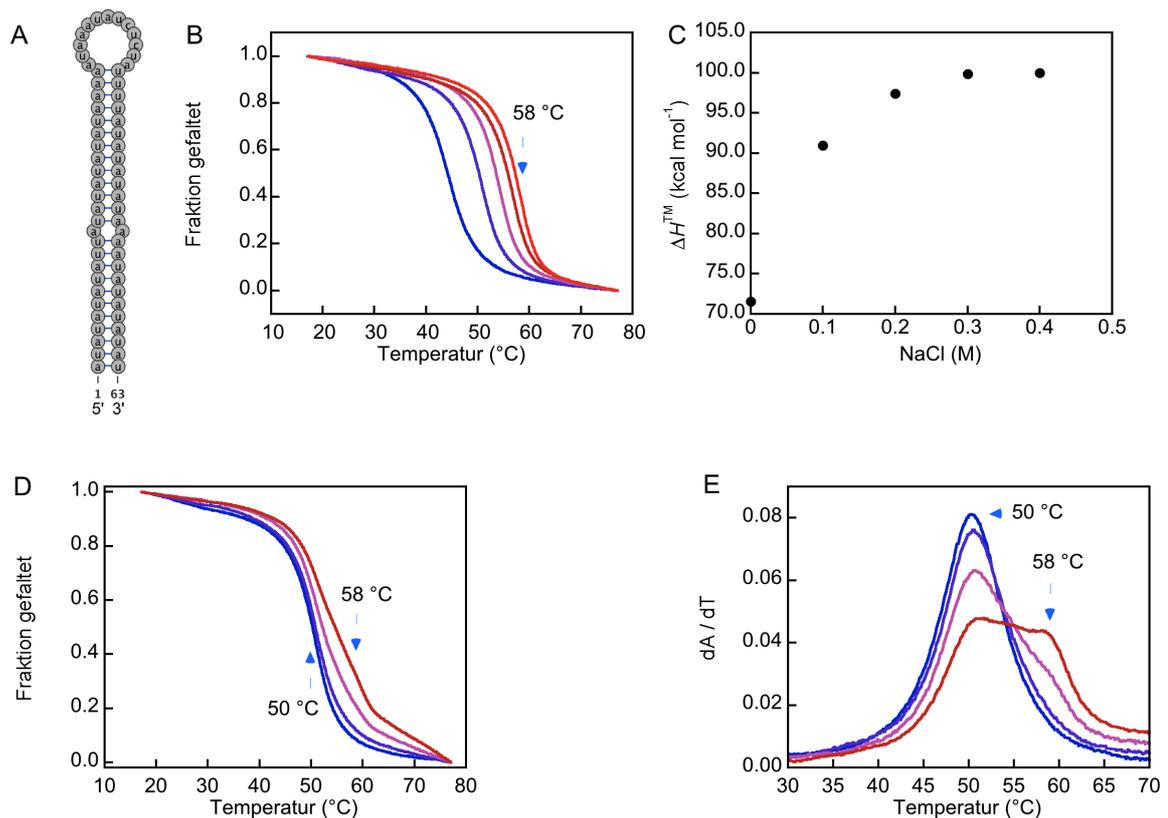


Abbildung 34: NF90-NF45 stabilisiert den HsR-SL der VEGF-mRNA. (A) Schematische Darstellung der Struktur des verwendeten Fragments von HsR-SL der VEGF-mRNA (basierend auf *mfold*-Vorhersage (127)). (B) Die thermische Denaturierung von 500 nM HsR-SL wurde in NF90-Puffer, der kein (blau), 100 mM (lila), 200 mM (magenta), 300 mM (rot) und 400 mM NaCl (orange) enthielt, im Bereich 10 – 90 °C bei 268 nm verfolgt. Der Temperaturgradient betrug 0.4 K min⁻¹. Die Auswertung der Kurven erfolgte unter Verwendung der Gleichung 15 (s. 2.10). (C) Die aus der Auswertung der Kurven (B) erhaltenen Schmelzenthalpien wurden gegen die eingesetzte Natriumchlorid-Konzentration aufgetragen. (D) Die thermische Denaturierung von 500 nM HsR-SL in Ab- (blau) und Anwesenheit von 60 nM (lila), 120 nM (magenta) und 200 nM NF90-NF45 (rot) wurde in NF90-Puffer unter den gleichen Bedingungen wie (B) analysiert. (E) 1. Ableitung der in (D) dargestellten Kurven.

Ableitung dA/dT der Transitionskurve zur Bestimmung von Schmelzpunkten herangezogen (**Abb. 34E**). Dabei zeigte sich, dass mit steigender Konzentration des Heterodimers eine zunehmende Verschiebung des Schmelzpunkts von HsR-SL zu höheren Temperaturen auftrat. Unter den höchsten NF90-NF45-Konzentrationen konnte deutlich ein zusätzlicher Schmelzpunkt in der Transitionskurve des HsR-Elements von 58 °C quantifiziert werden. Dieser Schmelzpunkt stimmte mit dem überein, der bereits oben für die Basenpaar-reiche HsR-Struktur ermittelt werden konnte. Damit wurden Hinweise erhalten, dass NF90wt-NF45 die thermodynamisch stabilere Struktur des HsR-SL induziert und stabilisiert.

Diese Ergebnisse belegen, dass NF90wt-NF45 neben der viralen 5BSL3.1_3'-UTR auch die Konformation von HsR-SL der VEGF-mRNA verändert und eine Struktur höherer Stabilität induziert. Diese Struktur enthält ca. 16 – 21 bp.

IV. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Eigenschaften von NF90, NF45 und des Proteinkomplex NF90-NF45 bei der Interaktion mit RNA und deren Funktion als Wirtsfaktoren der Amplifikation des Hepatitis C-Virus vergleichend *in vitro* charakterisiert werden.

4.1 Kooperativität der RNA-bindenden Motive von NF90

NF90 ist ein multifunktionales zelluläres Protein, das auf verschiedenen Ebenen in der Regulation der Genexpression involviert ist. Die vielfältigen Funktionen von NF90 beruhen zum überwiegenden Teil auf seiner Interaktion mit verschiedenen Klassen von Nucleinsäuren, u.a. DNA, mRNA, virale RNA und miRNAs (18). Eine essentielle Eigenschaft von NF90 sollte somit eine Diskriminierung dieser Klassen sein (23,36,39,132). Der C-Terminus des Proteins interagiert dabei mit RNA über drei RNA-bindende Motive: zwei dsRBMs und ein RGG-Motiv. Die hier vorliegenden Arbeiten zum NF90-Monomer liefern eine Reihe experimenteller Belege, wie die verschiedenen RNA-bindenden Motive funktional zusammenwirken und dem Protein eine spezifische Diskriminierung verschiedener Eigenschaften der RNA ermöglichen. Wie sich herausstellen sollte, ermöglicht das Interaktionsnetzwerk der RNA-bindenden Motive auch eine Veränderung der RNA-Konformationen.

4.1.1 Das dsRBM2 von NF90 liefert den größten Beitrag zur Bindung an dsRNA

Um die RNA-Bindung von NF90 bzw. der jeweiligen Varianten zu analysieren, wurden drei Modell-RNAs als Substrate eingesetzt. Im Allgemeinen sind RNA-Protein-Interaktionen komplexe Wechselwirkungen, die zwei flexible Biopolymere umfassen. Die Wahl dieser einfachen RNA-Substrate sollte daher Konformationsänderungen der RNAs durch die verschiedenen Ionenstärken in den Experimenten zur Ermittlung des Bindungsmodus und somit Änderungen der RNA-Protein-Interaktionsstellen auf ein Minimum reduzieren. Damit adressierte diese Analyse lediglich grundlegende strukturelle Eigenschaften von RNAs (kurze, lange Moleküle und Einzel- sowie Doppelstrang).

Die Analyse der Bindungsmodi zu den verschiedenen RNAs, in denen NF90wt mit den dsRBM-Varianten NF90^{F432A}, NF90^{F559A} und NF90^{F432, 559A} verglichen wurde, zeigten, dass beide dsRBMs unterschiedliche Funktionen charakterisieren. Als generelle Eigenschaft und in Übereinstimmung mit der Klassifizierung von NF90 als dsRNA-bindendes Protein (133) konnte bestätigt werden, dass das Protein mit besonders hoher Affinität an dsRNA assoziiert (**Tabelle 6**). Diese Eigenschaft hing stark von der

dsRBM mit ca. 8 - 10 bp einer dsRNA interagiert und ca. 16 bp dieser RNA sterisch einschließt (84). Weil eine 1:1 Stöchiometrie der RNA-Bindung von NF90 bestimmt werden konnte (**Abb. 7B**), folgt daraus, dass die kurze dsRNA-1 entsprechend durch eines und die lange dsRNA-2 durch beide dsRBMs gebunden werden könnte. Dennoch scheint es eine Kooperativität beider dsRBMs auch bei der Interaktion mit der kleineren dsRNA-1 zu geben. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass die Modifikation der individuellen dsRBMs (NF90^{F432A}, NF90^{F559A}) die Affinität und den Bindungsmodus von NF90 zu den verschiedenen RNAs auf unterschiedliche Weise veränderte und die Variante NF90^{F432, 559A}, in der beide dsRBMs mutiert sind, darüber hinaus die schwächsten Affinitäten zeigte. Des Weiteren lieferten die ermittelten Bindungsmodi an die dsRNA-2 zusätzliche Hinweise auf eine kooperative Bindung. So induzierten die Mutationen in jedem der dsRBMs ein im Vergleich zum NF90wt signifikant stärkeres Maß an ionischen Wechselwirkungen (m -Werte im Bereich -20 bis -30 kcal mol⁻² L vs. -8 kcal mol⁻² L von NF90wt). Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Mutation eines dsRBMs zum Verlust des Bindungsbeitrags zur dsRNA-2 führt. Zusammenfassend kann mit den präsentierten Daten ein Modell postuliert werden, nach dem sich beide dsRBMs in einer kooperativen Wirkungsweise an die assoziierte RNA anpassen (**Abb. 36**).

Unter Berücksichtigung der genannten Aspekte fallen Homologien zwischen den Eigenschaften der dsRBMs von NF90 und den dsRBMs von PKR auf. Für die PKR-dsRBMs konnte gezeigt werden, dass diese unterschiedliche RNA-Bindungseigenschaften aufweisen und kooperativ an RNA binden. In diesen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Kinase die Länge von RNAs diskriminiert (138). Eine effiziente Aktivierung der Kinase erfolgte nur durch dsRNAs von mindestens 30 bp

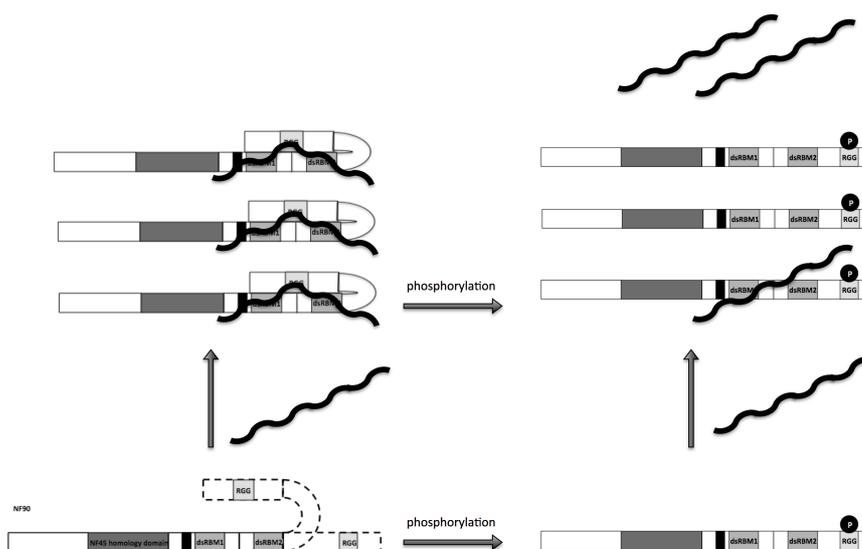


Abbildung 36: Modell der Kooperation der RNA-bindenden Motive bei der RNA-Bindung von NF90. Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Interaktionsnetzwerkes der RNA-bindenden Motive von NF90. Im Wildtyp-Protein ist das RGG-Motiv über einen kooperativen Modus mit den dsRBMs im RNA-Bindungsprozess involviert. Während ssRNA präferenziell über das RGG-Motiv in Kooperation mit dsRBM1 gebunden wird, trägt dsRBM2 zusammen mit dem RGG-Motiv hauptsächlich zur dsRNA-

Bindung bei. Dieses Netzwerk ermöglicht NF90, unterschiedliche RNA-Strukturen zu erkennen und die konformationellen Eigenschaften der gebundenen RNA zu modulieren. (Pseudo-) Phosphorylierung des RGG-Motivs führt zu einer Veränderung der konformationellen Eigenschaften dieser Region und des Proteins, die das Interaktionsnetzwerk der Motive verschlechtern. Daraus resultiert, dass der Beitrag des RGG-Motivs zur gesamten RNA-Bindung verschlechtert wird und RNA zum Teil dissoziieren kann. (Pseudo-) phosphoryliertes NF90 hat einen verminderten Einfluss auf die konformationellen Eigenschaften der gebundenen RNA.

Länge. Wie bereits erwähnt, umfasst der Interaktionsbereich eines dsRBMs mit dsRNA 16 bp. Damit korreliert die Länge von 30 bp gut mit der Anforderung an die Länge einer dsRNA, um beide PKR-dsRBMs zu bedienen (91,137,138). Dementsprechend könnte die Kooperativität der dsRBMs von NF90 ebenfalls zu einer Diskriminierung der Länge von RNA beitragen und somit ähnlich große biologische Relevanz besitzen, wie dies für PKR gezeigt wurde.

4.1.3 Die RNA-bindenden Motive von NF90 assoziieren kooperativ an RNA

RGG-Motive sind in vielen RNA-bindenden Proteinen enthalten und gelten allgemein als regulatorisches Element der RNA-Bindung. Die Aktivität bzw. Funktion dieser Motive kann durch post-translationale Modifikationen verändert werden (139,140). Über die allgemeine Funktionsweise von RGG-Motiven ist wenig bekannt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Deletion des gesamten C-terminalen Bereichs (NF90 Δ C63) zu einer stark reduzierten Bindung von NF90 an dsRNA führt und die Bindung an ssRNA-1 vollständig aufhebt. Interessanterweise zeigte die NF90-Deletionsvariante NF90 Δ C46, die das RGG-Motiv noch enthält, eine Bindung an ssRNA-1. Daraus konnte geschlossen werden, dass die C-terminalen 63 Aminosäuren und insbesondere das RGG-Motiv essentiell zur Bindung von ssRNA-1 beitragen. Die Bedeutung dieser Region von NF90 für die RNA-Bindung wird dadurch hervorgehoben, dass die Pseudophosphorylierung dieses Motivs die gesamte RNA-Bindung des Proteins deutlich beeinflusst (**Tabelle 9**). Somit kann eine zentrale Funktion des RGG-Motivs bzw. des C-Terminus von NF90 bei der RNA-Bindung des Proteins belegt werden. Darüber hinaus zeigte der beobachtete Bindungsmodus von NF90 an RNA eine starke Abhängigkeit von der Funktionalität des RGG-Motivs. So wies die Variante NF90 Δ C63, der dieses Motiv fehlte, ein ausgeprägtes Maß an hydrophoben Interaktionen und die Variante NF90^{F432, 599A}, die mutierte dsRBMs, aber ein wirksames RGG-Motiv besaß, ein starkes Maß an ionischen Interaktionen bei der Bindung an RNA auf. Daraus kann abgeleitet werden, dass die dsRBMs und das RGG-Motiv auf unterschiedliche Art und Weise zur RNA-Bindung beitragen: die dsRBMs durch einen höheren Beitrag hydrophober, nicht-ionischer und das RGG-Motiv durch einen hohen Beitrag an ionischen Wechselwirkungen. Damit wird belegt, dass alle RNA-bindenden Motive von NF90 in kooperativer Weise zur RNA-Bindung beitragen.

4.1.4 Die Pseudophosphorylierung beeinflusst die Kooperativität und Aktivität der RNA-bindenden Motive von NF90

NMR-Studien eines RGG-Motivs wiesen auf gelenkartige Eigenschaften einiger Glycine innerhalb des Elements hin, die eine allgemeine Flexibilität des Motivs bedingen (97). Passend zu diesem Modell konnte in der vorliegenden Arbeit ein starker Einfluss der RGG-Pseudophosphorylierung von NF90 auf die konformationellen Eigenschaften

dieses Motivs und des gesamten Proteins nachgewiesen werden. Die Analyse der intrinsische Fluoreszenz der pseudophosphorylierten Variante NF90^{S651E} zeigte eine Schwächung des intrinsischen FRETs zwischen den C-terminalen Tyrosine und den N-terminalen Tryptophanen. Bei steigender Ionenstärke verstärkte sich dieser Effekt. Diese Eigenschaft konnte auf durch die Ionenstärke induzierte Konformationsänderungen der Variante zurückgeführt werden (**Abb. 12**). Weiterhin resultierte die ssRNA-1-Bindung von NF90wt in signifikanten Änderungen im CD, die nicht in der pseudophosphorylierten Variante auftraten (**Abb. 13**). Dementsprechend scheint die Pseudophosphorylierung von Ser651 die konformationellen Eigenschaften dieser Region in einer Weise zu verändern, welche Transitionen von Sekundärstrukturelementen einschränken oder die Strukturen selbst destabilisieren könnten. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit Beobachtungen von Pei *et al.* Diese Autoren stellten fest, dass ein Kernexport von NF90 durch die Phosphorylierung von Ser651 ausgelöst wird (28). Die vorliegenden Ergebnisse indizieren nun eine dynamische Distanz zwischen den C-terminalen Tyrosinen und N-terminalen Tryptophanen nach der Pseudophosphorylierung (**Abb. 12**). Folglich könnte sich der C-Terminus vom N-Terminus entfernen und das N-terminal lokalisierte Kernexportsignal exponieren, das die Translokation induziert.

Die Beobachtung, dass durch die Pseudophosphorylierung der Prozess der RNA-Bindung verändert war, kann auf ähnliche Weise erklärt werden. Die Veränderung von Konformationseigenschaften von NF90 durch die Pseudophosphorylierung könnte die Kooperativität aller RNA-bindenden Motive vermindern. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass die pseudophosphorylierte und dsRBM1-Variante NF90^{F432A} (**Tabelle 7** und **Tabelle 9**) sehr ähnlichen Bindungsparameter zeigten. Diese Tatsache unterstützt die Hypothese, dass eine starke räumliche Nähe dieser Motive vorliegt und dem Protein somit ermöglicht, in einer koordinierten und kooperativen Art mit RNA-Molekülen zu interagieren. Diese räumliche Organisation der RNA-bindenden Motive wirkt sich vor allem auf große RNA-Moleküle wie dsRNA-2 aus. Dementsprechend überbrückt dsRNA-2 nicht nur beide dsRBMs sondern zusätzlich auch das RGG-Motiv. Folglich resultiert eine maximale Kooperativität und effektive Bindung insbesondere von größeren RNAs (**Abb. 36**). Dieser Effekt wurde hier beobachtet (**Tabelle 7** und **Tabelle 9**). Daraus kann geschlossen werden, dass die Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs mit dieser Kooperativität interferiert, wodurch die RNA-Bindung von NF90 verändert wird. Post-translationale Modifikationen des RGG-Motivs von NF90 können daher einen regulatorischen Mechanismus darstellen, die Kooperativität der RNA-bindenden Motive und damit die spezifische Aktivität des Proteins zu beeinflussen. In Korrelation der Beobachtungen von Pei *et al.* kann eine Phosphorylierung des RGG-Motivs entsprechend die zelluläre Lokalisation als auch die RNA-Bindung reversibel koordinieren (**Abb. 36**).

4.1.5 Der C-Terminus von NF90 ist in Konformationsänderungen gebundener ssRNA involviert

Eine weitere vom C-Terminus von NF90 vermittelte Eigenschaft wurde während der kinetischen Analysen der RNA-Bindung identifiziert (**Abb. 14**). Da die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Bindung von NF90^{S651E} an ssRNA-1 keine lineare Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration zeigte, konnte so auf mindestens einen weiteren intramolekularen Reaktionsschritt geschlossen werden. Im Allgemeinen können Bindungsprozesse von Biomolekülen nach einem *conformational-selection*- oder *induced-fit*-Mechanismus ablaufen. Bei *conformational selection* bindet der eine Bindungspartner selektiv an eine bestimmte Konformation des anderen. Beim *induced fit* hingegen geht ein Bindungspartner nach der Assoziation in eine bestimmte Konformation über. In Abhängigkeit vom Konzentrationsverhältnis der Substrate und den entsprechenden mikroskopischen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten können aber auch beide Prozesse parallel ablaufen. Die Verteilung (Partitionierung) zwischen beiden Mechanismen der Bindungsreaktion kann variieren und wurde mathematisch durch ein Flussmodell von Hammes *et al.* beschrieben (141). Der *conformational-selection*-Mechanismus impliziert ein der eigentlichen Bindung vorgelagertes Konformationsgleichgewicht eines Reaktanden. Nur die resultierende bindungskompetente Konformation geht in den bimolekularen Assoziationsprozess ein. Die apparente Geschwindigkeitskonstante der Bindung hängt dann u.a. von der Konzentration dieser Konformation ab.

Bei der in dieser Arbeit analysierten Bindungsreaktion wurde auf einen *conformational-selection*-Mechanismus hingewiesen. Demnach könnte aus NF90^{S651E} oder der RNA die bindungskompetente Konformation hervorgehen (NF90^{S651E*} oder RNA*, **Abb. 14D**). Die kinetischen Messungen wurden mit steigender Proteinkonzentration durchgeführt, wobei der Anteil der bindungskompetenten Konformation NF90^{S651E*} proportional zur eingesetzten Proteinkonzentration ist. Wenn nun das Protein für das Konformationsgleichgewicht im *conformational-selection*-Mechanismus verantwortlich wäre, sollte mit steigender Proteinkonzentration ein Anstieg der beobachteten Geschwindigkeitskonstante beobachtet werden. Im durchgeführten Experiment wurde jedoch eine Abnahme dieser Konstanten festgestellt. Die Schlussfolgerung ist somit, dass für den *conformational-selection*-Mechanismus eine bindungskompetente Konformation der RNA, die durch NF90^{S651E} gebunden wird, berücksichtigt werden muss (**Abb. 14D**). Unter Beachtung dieser Aspekte wurde ein Flussmodell analog Hammes *et al.* angewendet (141). Zu dessen Berechnung wurden die experimentellen Daten sowie Schätzungen nicht ermittelter Parameter verwendet (Anhang 7.3 **Abb. A4, Tabelle A - 9**). Daraus resultierte ein vereinfachtes Modell, das zeigt, dass die Bindung bei niedrigen Proteinkonzentrationen vorwiegend über den *conformational-selection*-Mechanismus

und bei hohen Proteinkonzentrationen vorwiegend über den *induced-fit*-Mechanismus abläuft. Damit spiegelte das aufgestellte Modell bereits von Hammes *et al.* beschriebene Situationen anderer Proteine wider (141). Der festgestellte Anstieg der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten bei höheren Proteinkonzentrationen kann entsprechend so erklärt werden, dass die Bindung hier vorwiegend einem *induced-fit*-Mechanismus folgt. Im Unterschied zu dieser Situation folgt die Bindung der pseudophosphorylierten Variante an dsRNA-1 keiner Partitionierung zwischen beiden Mechanismen. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten belaufen sich auf die gleiche Größenordnung wie die der ssRNA-1-Bindung der pseudophosphorylierten Variante. Auf die kinetische Betrachtung der dsRNA-1-Bindung wird im Anhang weiter eingegangen (s. 7.3).

Eine kinetische Analyse des Wildtyp NF90 war aus genannten Gründen technisch nicht möglich. Die Amplitudenabnahme bei der Bindungsreaktion von NF90wt innerhalb der Totzeit des Messgeräts stellt zusammen mit der oben beschriebenen konformationellen Heterogenität des ssRNA-Substrats allerdings eine Indikation dar, dass das Protein keinem *conformational-selection*-Mechanismus folgt. Dementsprechend scheinen beide Schritte des *induced-fit*-Mechanismus (Bindung, k_{on} , und die interne Transformation, k_1) im Vergleich zur pseudophosphorylierten Variante signifikant beschleunigt zu sein. Daher kann für den Wildtyp vermutet werden, dass die RNA-Bindung fast ausschließlich über einen *induced-fit*-Mechanismus abläuft. Dies wiederum würde bedeuten, dass im Unterschied zu NF90^{S651E} das Wildtypprotein keine Konformation der ssRNA-1 selektiv bindet, sondern eine bestimmte Konformation durch die Bindung induziert. Diese Annahme stimmt mit Beobachtungen der CD-Spektroskopie insofern überein, als dass bei NF90wt erhebliche Konformationsänderungen durch die ssRNA-Assoziation beobachtet wurden, die mit der pseudophosphorylierten Variante nicht auftraten (**Abb. 13**). Zusätzlich wird diese Vermutung durch die van't Hoff-Analyse der Bindung von NF90 an ssRNA-1 unterstützt. Durch diese Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung von NF90 an ssRNA-1 die konformationelle Freiheit des System vermindert. Daraus kann entnommen werden, dass der Binärkomplex NF90wt-ssRNA eine definierte Konformation einnimmt. Wie bereits diskutiert, führt die Pseudophosphorylierung von NF90 dazu, dass eine bestimmte RNA-Konformation selektiv gebunden und nicht induziert wird. Daraus kann wiederum geschlussfolgert werden, dass das RGG-Motiv in NF90wt neben der essentiellen Funktion in der Koordination der RNA-Bindung auch stark in Konformationsänderungen beider Bindungspartner (Protein und gebundene RNA) involviert ist. Beide Prozesse werden erheblich durch die Pseudophosphorylierung beeinflusst.

4.2 Die Komplexbildung mit NF45 verändert grundlegende Eigenschaften von NF90

4.2.1 Mindestens zwei Interaktionsstellen zwischen NF90 und NF45 induzieren eine thermodynamische Stabilisierung des Komplexes

Der zweite Teil der Arbeit behandelt die Frage, inwieweit die Eigenschaften von NF90 durch die Interaktion mit NF45 verändert werden. Die Bedeutung dieser Interaktion wird durch eine Beobachtung von Guan und Mitarbeiter begründet. Sie stellten fest, dass die siRNA-vermittelte Depletion von NF45 die biologische Halbwertszeit von NF90 negativ beeinflusste (142). Da das reziproke Experiment ein analoges Resultat ergab, schlossen die Autoren auf eine post-translationale Koregulation der Expression von NF90 und NF45 *in cellulo*. Hier konnten nun beide Proteine rekombinant gewonnen, der Komplex erfolgreich rekonstituiert und dessen Oligomierzustand als Heterodimer definiert werden. Im Zuge der Denaturierungsstudien wurde deutlich, dass die Faltung von NF90, NF45 und NF90-NF45 über mindestens einen intermediären Zustand abläuft (**Abb. 16**). Dabei zeigten NF90 und NF45 einen homologen ersten Übergang. Die DZF-Domänen der beiden Proteine weisen eine 30%ige Identität in der Primärstruktur auf (4), weshalb möglicherweise Strukturelemente dieser Domäne in diesem Übergang denaturieren. Dieser Übergang war beim Heterodimer NF90-NF45 zu höheren Denaturationskonzentrationen verschoben. Die Quantifizierung ergab dementsprechend eine erhöhte Stabilität involvierter Strukturelemente von ca. $\Delta\Delta G^0 = 1 \text{ kcal mol}^{-1}$ (gegenüber einem Monomer) und weist somit auf eine Stabilisierung von Strukturelementen der DZF-Domäne durch die Komplexbildung hin. Dies ist in Übereinstimmung mit der Kristallstruktur eines verkürzten NF90-NF45-Komplexes (4), in der Strukturelemente der DZF-Domäne die Interaktionsstelle zwischen beiden Proteinen darstellen.

Der Struktur nach basiert die NF90¹⁻³⁸⁰-NF45²⁹⁻³⁹⁰-Interaktion auf drei Salzbrücken (Glu-Arg, Arg-Asp, Gln-Gln). Allerdings steht die Beobachtung der Autoren, dass der Komplex auch unter Bedingungen von 500 mM NaCl stabil war, dazu im Widerspruch. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Komplex nicht innerhalb der ersten Transition der chemischen Denaturierung dissoziiert. Das legt nahe, dass neben den durch die Komplexbildung stabilisierten Strukturelementen noch mindestens eine weitere Interaktionsfläche zwischen NF90 und NF45 existiert. Da in besagter Kristallstruktur der C-Terminus von NF90 fehlt, kann vermutet werden, dass weitere NF90-NF45-Wechselwirkungen von dieser Region ausgehen.

Einige Hinweise darüber wurden hier über Strukturanalysen der Proteine gewonnen. Die unterschiedlichen Positionen des Maximums der intrinsischen Fluoreszenz von NF90 und NF45 lassen auf eine stärker polare Umgebung der Tryptophane von NF45 im

Vergleich zu denen von NF90 schließen. Es konnte festgestellt werden, dass die Heterodimerisierung von NF90 mit NF45 zu einem Quenching mindestens eines Tryptophans führt. Aus der publizierten Kristallstruktur geht hervor, dass die Tryptophane von NF90 eher weniger und die von NF45 deutlich dem Lösungsmittel exponiert vorliegen sowie weiterhin, dass kein Tryptophan in der interagierenden Oberfläche der DZF-Domänen lokalisiert ist. Folglich kann hier vermutet werden, dass im Komplex ein Tryptophan-Quenching von NF45 vorliegt, das aus einer Interaktion mit dem C-Terminus von NF90 hervorgeht.

Des Weiteren unterstützen die Analysen des Circular dichroismus von NF90 und Varianten, dass der C-Terminus von NF90 in der Interaktion mit NF45 involviert ist. Beim Vergleich des Fern-UV CD des Wildtyp-Komplexes mit der pseudophosphorylierten Variante NF90^{S651E}-NF45 fiel auf, dass bestimmte durch die Heterodimerisierung mit NF45 induzierte Konformationsänderungen nicht in der Komplex-Variante auftraten. Daher wird eine Konformationsänderung der C-terminalen Region von NF90 durch die Heterodimerisierung mit NF45 nahe gelegt. Die Analyse der thermodynamischen Stabilität der pseudophosphorylierten Variante unterstützt diese Vermutung. Es konnte gezeigt werden, dass die Pseudophosphorylierung Strukturelemente des ersten Übergangs destabilisiert. Interessanterweise resultierte die Interaktion der Variante mit NF45 in einer Kompensation dieser Destabilisierung (**Abb. 22**). Diese Tatsache belegt, dass der C-Terminus von NF90 durch die Interaktion mit NF45 eine Veränderung erfährt. Daher kann auch ausgeschlossen werden, dass die Pseudophosphorylierung zu einer verstärkten Dissoziation des Heterodimers führt.

Damit belegen die erhaltenen Ergebnisse, dass mindestens eine weitere Interaktionsstelle zwischen NF90 und NF45 existiert, die nicht in der Kristallstruktur von NF90¹⁻³⁸⁰-NF45²⁹⁻³⁹⁰ aufgelöst ist und vermutlich vom C-Terminus von NF90 ausgeht. Diese Region ist in Konformationsänderungen durch die Wechselwirkung mit NF45 involviert, trägt jedoch nicht zur höheren thermodynamischen Stabilität des Heterodimers im Vergleich zu den Monomeren bei.

4.2.2 Die Heterodimerisierung von NF90 mit NF45 verstärkt die Kooperativität der RNA-bindenden Motive von NF90 und verbessert so dessen RNA-Bindung

Im ersten Diskussionsteil wurde eine Kooperativität der RNA-bindenden Motive von NF90 formuliert (**Abb. 36**). Die RNA-Bindungsstudien des Heterodimers NF90-NF45 indizierten Veränderungen dieser Eigenschaften infolge der Komplexbildung. Eine veränderte Stöchiometrie der RNA-Bindung infolge der Heterodimerisierung beider Proteine konnte ausgeschlossen werden (**Abb. 18**).

Im Rahmen der durchgeführten Analysen wurde im Vergleich zum Monomer eine 10-fach höhere Affinität (Standardbedingungen) des Komplexes zu ssRNA-1 und dsRNA-1 gemessen. Mit dsRNA-2 wurde jedoch eine dem Monomer analoge Affinität ($K_D = 2 \text{ nM}$) sowie analoger Bindungsmodus ($m = -8 \text{ kcal mol}^{-2} \text{ L}$) des Komplexes ermittelt. Die Komplexbildung von NF90 mit NF45 führte demnach zu keiner Verbesserung der Affinität der Bindung von NF90 an dsRNA-2. Im Falle von NF90-Monomer wurde die verstärkte Bindung an dsRNA-2 durch einen kooperativen Bindungsmodus der RNA-bindenden Motive erklärt. Daher wird nun nahegelegt, dass die Interaktion von NF90 mit NF45 in Abwesenheit von RNA ähnliche Auswirkungen auf die RNA-bindenden Motive hat. Folgt man diesem Szenario, so müsste die Komplexbildung von NF45 mit NF90 die RNA-bindenden Motive von NF90 in eine solche Konformation und Orientierung überführen, die dem Zustand maximaler Kooperativität entspricht. Diese Hypothese wird vor allem durch die Modulation der Bindungsmodi (s. 3.2.10) durch die Heterodimerisierung unterstützt. Für das Monomer konnte gezeigt werden, dass das RGG-Motiv vor allem über ionische und die dsRBMs über hydrophobe nicht-ionische Interaktionen zur RNA-Bindung beitragen, sowie ssRNA vorwiegend über das RGG-Motiv und dsRNA über die dsRBMs assoziiert werden. Die Heterodimerisierung mit NF45 moduliert nun die Bindungsmodi zu den RNAs derart, dass in der Assoziation zu ssRNA-1 und dsRNA-1 im Vergleich zum Monomer ein höherer Anteil an hydrophoben bzw. ionischen Wechselwirkungen vorliegt (**Tabelle 17**). Folglich führt die Komplexbildung zu einem stärkeren Beitrag der dsRBMs zur Bindung von ssRNA-1 (Zunahme hydrophober Kontakte) bzw. einem stärkeren Beitrag des RGG-Motivs zur Bindung von dsRNA-1 (Zunahme ionischer Kontakte) als im Monomer (**Abb. 37**). Diese Annahme wird durch die vant'Hoff-Analyse der ssRNA-Bindung unterstützt, die eine um 6 kcal mol^{-1} ($\Delta\Delta H^0$) stärkere Interaktionen im NF90-NF45:ssRNA als im NF90:ssRNA Komplex zeigt. Diese höhere Bindungsenthalpie korreliert mit einer größeren Anzahl an Wechselwirkungen im Bindungsprozess des Komplexes als im Monomer (**Abb. 27**). Trotz dieser Beeinflussung von NF90 durch die Interaktion mit NF45 ist das Heterodimer ebenso wie das Monomer in der Lage, verschiedene Eigenschaften von RNAs zu diskriminieren. Dies zeigten nicht zuletzt die verschiedenen Bindungsmodi der RNA-Bindung zu den verschiedenen RNA-Substraten (s. 4.1).

In weiterführenden Experimenten wurde ein Zusammenhang zwischen den durch die Komplexbildung stabilisierten Strukturelementen und der Veränderung der RNA-Bindung durch die Heterodimerisierung verfolgt. Im Zuge dieser Experimente wurde festgestellt, dass die strukturelle Integrität der RNA-bindenden Motive von NF90 im ersten Übergang der Denaturierung erhalten blieb. Darüber hinaus konnte auch die verbesserte RNA-Bindung des Komplexes in diesem Übergang nachgewiesen werden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die verbesserte RNA-Bindung von NF90 nach der

Komplexbildung mit NF45 auf eine Stabilisierung der RNA-bindenden-Motive zurückzuführen war. Diese Tatsache untermauert die Existenz von mindestens zwei Interaktionsstellen der Proteine. Vielmehr indizierte die größere Sensitivität der RNA-Bindung des Komplexes gegenüber dem Denaturans eine im Vergleich zum Monomer sensiblere Tertiärstruktur der an der RNA-Bindung beteiligten Motive. Dies wiederum unterstützt die Annahme, dass die Heterodimerisierung von NF90 und NF45 die Kooperativität dieser Motive verbessert (**Abb. 37**).

Diese Theorie wird durch die Analysen mit den Komplex-Varianten bekräftigt. Die Mutationen der dsRBMs in der Komplex-Variante NF90^{F432, 599A}-NF45 führten genau wie im Monomer zu Abschwächungen der RNA-Bindung von NF90. Dennoch wurden etwa dieselben Verbesserungsfaktoren der RNA-Bindung (s. 3.2.10) infolge der Heterodimerisierung dieser Variante mit NF45 quantifiziert wie bei der Komplexbildung von NF90wt mit NF45 (**Abb. 23**). Daher kann angenommen werden, dass die Heterodimerisierung nicht die grundsätzlichen Eigenschaften der individuellen dsRBMs modifiziert. Im Gegensatz dazu wurden verminderte Verbesserungsfaktoren der RNA-Bindung bei der Komplexbildung der pseudophosphorylierten Variante NF90^{S651E} mit NF45 ermittelt. Somit kann bestätigt werden, dass sich die Heterodimerisierung von NF90 mit NF45 auf die grundsätzlichen RNA-Bindungseigenschaften des C-Terminus auswirkt.

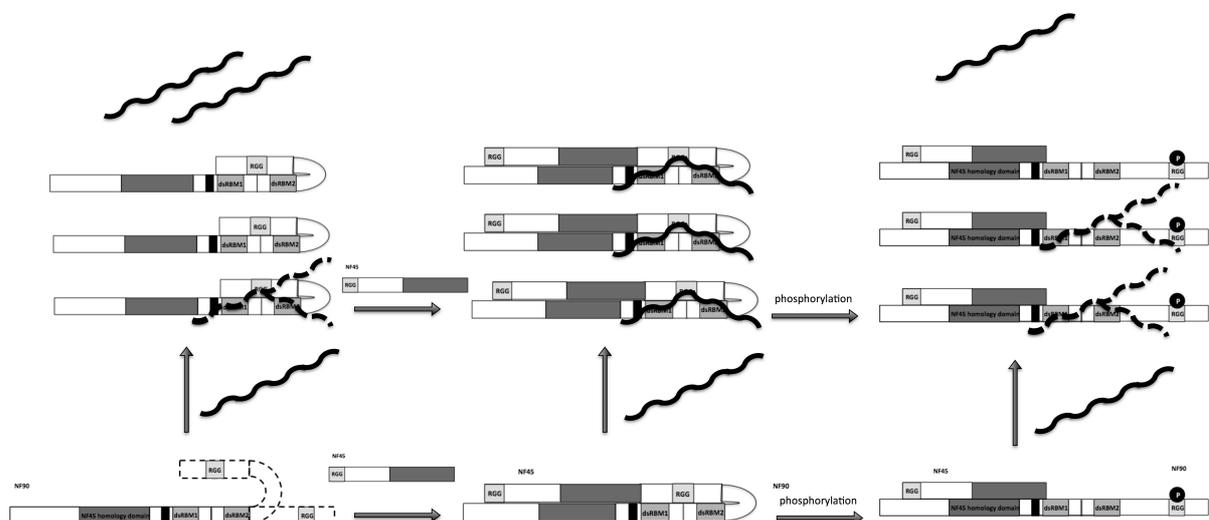


Abbildung 37: Modell des Einflusses der Heterodimerisierung von NF90 mit NF45 auf die RNA-bindenden Motive von NF90. Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Modulation der RNA-bindenden Motive von NF90 durch die Komplexbildung mit NF45 und der Einfluss der (Pseudo-)phosphorylierung. Im Monomer induziert die RNA-Bindung eine Kooperativität der RNA-bindenden Motive, die z.T. eine Modulation der konformationellen Eigenschaften der RNA ermöglicht. Die Bindung von NF45 über die DZF-Domäne an NF90 induziert auch in Abwesenheit von RNA-Substraten eine starke Kooperativität der RNA-bindenden Motive von NF90 durch deren Reorientierung (Tertiärstruktur). Diese Konformationsänderung involviert vor allem den C-Terminus und ermöglicht eine optimierte Assoziation an RNA. Diese Konstellation übt sehr stark konformationsverändernde Effekte auf die RNA aus. Die (Pseudo-)Phosphorylierung der C-terminalen Region führt zu einer weniger ausgeprägten Kooperativität der RNA-bindenden Motive und schwächt die Bindungsstärke an RNA. Der Einfluss auf die Konformation des Substrats ist geringer als im Wildtyp-Komplex.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Bindung von NF45 an NF90 die intrinsische Funktionalität des C-Terminus von NF90 verändert und durch Optimierung der Tertiärstruktur aller RNA-bindenden Motive ein effektiveres Zusammenwirken dieser Motive induziert. Dies führt zu einer signifikant verstärkten Kooperativität des RGG-Motivs mit den dsRBMs, sodass selbst kurze RNAs mit hoher Affinität assoziiert werden (**Abb. 37**). Die zentrale Rolle der C-terminalen Region von NF90 bei der RNA-Bindung wird somit auch im Komplex deutlich.

4.2.3 Homologiemodellierung von NF90-NF45

In Kooperation mit PD Dr. Iris Thondorf (AG Molecular Modeling) und Prof. Andrea Sinz wurde im Rahmen der Masterarbeit von Phil-Eric Jentschke ein Homologie-Modell von NF90-NF45 entwickelt. Da zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit noch kein finales Modell vorlag, wird auf dieses Projekt ausführlicher im Anhang 7.4 eingegangen. Es präsentiert Aspekte, die einige Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, wie die Kooperativität der RNA-bindenden Motive und weitere Interaktionsstellen zwischen NF90 und NF45 über strukturelle Informationen unterstützen könnte.

4.2.4 Die Komplexbildung von NF90 und NF45 induziert eine effektive RNA-Chaperon-Aktivität

4.2.4.1 Die Bedeutung von RNA-Chaperonen im Prozess der RNA-Faltung

Die Struktur einer RNA ist in diversen biologischen Vorgängen, u.a. der Translation, von essentieller Bedeutung. Die Funktionen einer RNA-Struktur kann sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Prozesse umfassen. Analog der Proteine wird die Funktion einer RNA durch ihre dreidimensionale Struktur (Faltung) und somit unmittelbar durch deren Sequenz (Primärstruktur) bedingt. Die RNA-Faltung folgt einem hierarchischen und sequentiellen Ablauf, d.h. es formen sich zuerst Sekundär-, bevor Tertiärstrukturen ausgebildet werden (143,144).

Die Primärstruktur von RNAs setzt sich aus nur vier verschiedenen, chemisch sehr ähnlichen Seitenketten (Nukleobasen) zusammen. Gegenüber Proteinen bedingt diese Konstellation eine höhere Schwierigkeit für Nukleinsäuren funktionsspezifische Strukturen einzunehmen. Eine Ursache spiegelt die relative Trägheit der Transitionen von Sekundärstrukturelementen einer RNA wider. Während die Halbwertszeit einer α -Helix im Millisekundenbereich liegt (145), beträgt sie je nach Sequenz zwischen 30 min und 100 Jahren für eine 10 bp A-Helix (146). Dadurch akkumulieren alternative Sekundärstrukturen, die zusammen mit Tertiärwechselwirkungen nicht native Konformere der RNA stabilisieren können. Ein weiteres Problem besteht im

Informationsgehalt der Sekundärstrukturen. Während in α -Helices und β -Faltblättern die spezifischen Seitenketten von Aminosäuren dem Lösungsmittel exponiert vorliegen, sind die Nukleobasen zur Helix-Achse orientiert. Folglich besitzen Sekundärstrukturen von Nukleinsäuren eine apparente, sehr hohe Ähnlichkeit, welche die Ausbildung der funktionalen Tertiärstruktur erschwert. Zusammenfassend resultieren zwei fundamentale Probleme der RNA-Faltung: die Präsenz alternativer nicht nativer Konformere (kinetische Fallen) und ähnliche thermodynamische Stabilitäten nicht nativer Sekundär- und Tertiärstrukturen (147,148).

Im Gegensatz zu Proteinen sind die Faltungswege von RNAs *in cellulo* nur in einigen Fällen detailliert analysiert (149,150). Es konnte gezeigt werden, dass Faltungsbarrieren von RNAs *in vitro* sehr dominant sind (151,152), während *in cellulo* die Aktivität spezieller Proteine eine effiziente RNA-Faltung vermittelt (153). Auf dieser Basis wurden RNA-Chaperone allgemein als solche Proteine definiert, die eine Fehlfaltung von RNA verhindern oder fehlgefaltete RNA in die native Struktur überführen können (144,149,150). Eine Klassifizierung dieser Proteine wurde wie folgt vorgeschlagen (154): *RNA chaperones*, *RNA annealers*, *RNA helicases* und *specific RNA-binding proteins* (**Tabelle 25**).

RNA-Chaperone bzw. Proteine mit RNA-Chaperon-Aktivität sind weit verbreitet und übernehmen viele wichtige Funktionen im RNA-Metabolismus verschiedener Organismen (144,154,155). Ähnlich wie Proteinfaltungshelfer (Chaperone), die bei der Faltung von Proteinen unterstützend eingreifen, sind RNA-Chaperone in der Lage, RNAs ATP-unabhängig umzustrukturieren, deren resultierende Struktur auch ohne weitere Anwesenheit des Proteins erhalten bleibt (154,155). Das unterscheidet sie von RNA-Helikasen, die eine ATP-abhängige Entfaltung von RNA katalysieren. Bei Proteinen mit

Tabelle 25. Klassifizierung von RNA-Chaperon-Aktivität

Klasse	RNA-Bindung	ATP- Abhängigkeit	Wirkung	Beispiel
RNA-Chaperon-Aktivität	transient unspezifisch	-	Auflösen von kinetischen Fallen sowie alternativer Konformationen	StpA
<i>RNA annealer</i>	transient, +/- spezifisch	-	Hybridisierung von RNAs	gBP21, Hfq, Tat-1
<i>RNA helicase</i>	transient	+	nicht-prozessive Denaturierung von dsRNA Disassemblierung von RNPs	DED1, eIF4a, RHA
<i>specific RNA-binding proteins</i>	spezifisch, nicht transient	-	Bindung essentiell für Induktion nativer Struktur und Stabilität der RNA	CBP2, Cyt-18

RNA-Chaperon-Aktivität werden zwei grundlegende Prozesse definiert (118,119): das *RNA-annealing*, das Hybridisieren zweier komplementärer ssRNA, und das *strand displacement*, das Austauschen eines Stranges in einer dsRNA gegen einen anderen komplementären Einzelstrang (**Abb. 19**).

4.2.4.2 NF90-NF45 ist ein RNA-annealer

Die Bindung von NF45 an NF90 bedingte eine weitere signifikante Veränderung der Eigenschaften von NF90. So wurde mit dem Heterodimer eine RNA-Chaperon-Aktivität (RCA), speziell eine *RNA-annealing*-Aktivität, identifiziert. Demnach beschleunigt NF90-NF45 die Hybridisierung komplementärer einzelsträngiger RNA mit einer fast diffusionslimitierten Effizienz von $5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei der RNA *RaSc-full*. Das Monomer hingegen zeigte nur 1/50 dieser Aktivität.

Wieso führt die Interaktion von NF90 mit NF45 zu einer Effizienzsteigerung der RCA von NF90? Zum einen könnte sich die verbesserte RNA-Bindung positiv auf die RCA auswirken oder zum anderen könnte die Komplexbildung die Katalyse der Reaktion verbessern. In die *RNA-annealing*-Reaktion geht ein Binär- (Protein-RNA) bzw. Ternärkomplex (Protein-RNA₂) ein. Eine höhere Bereitstellung dieser Komplexe sollte daher in einer Beschleunigung der gesamten Reaktion resultieren, sofern ein bimolekularer geschwindigkeitsbestimmender Schritt vorliegt. Dieser Annahme zufolge führt die verbesserte RNA-Bindung des Komplexes *per se* zu einer dem Monomer gegenüber erhöhten Reaktivität.

Auswirkungen auf den Mechanismus der Reaktion durch die Heterodimerisierung wurden dadurch angedeutet, dass eine Korrelation zwischen den durch die Komplexbildung stabilisierten Strukturelementen und der RNA-Chaperon-Aktivität identifiziert werden konnte. Für das Heterodimer konnte die strukturelle Integrität der für das *RNA-annealing* bedeutsamen Elemente im ersten Übergang der chemischen Denaturierung belegt werden, während dies nicht auf das Monomer zutraf. Daraus kann geschlossen werden, dass die Heterodimerisierung für die RNA-Chaperon-Aktivität essentielle Strukturen stabilisiert.

Die erhaltenen Ergebnisse definieren zusammenfassend mehrere direkte Ursachen, wie die Interaktion von NF90 mit NF45 zur Verbesserung der RCA von NF90 führt. Die Komplexbildung induziert zum einen eine verstärkte Kooperativität der RNA-bindenden Motive und somit eine verbesserte RNA-Bindung. Dies ermöglicht dem Komplex, effektiver RNA-Substrate zu binden. Zum anderen werden durch die Heterodimerisierung von NF90 mit NF45 Strukturelemente, die zur RCA beitragen, stabilisiert.

4.2.4.3 Das RGG-Motiv von NF90 ist von großer Bedeutung für die RNA-Chaperon-Aktivität des Proteins

Die vorherige Diskussion basierte auf dem Zusammenhang zwischen dem Stabilisierungseffekt der Heterodimerisierung und der Effizienz der RCA. Da festgestellt wurde, dass der C-Terminus von NF90 ebenfalls durch die Komplexbildung beeinflusst wird, konnte auch eine funktionelle Rolle des C-Terminus von NF90 in der RCA vermutet werden. Unter Verwendung der Komplex-Varianten wurde diese experimentell adressiert.

Während die Perturbation beider dsRBMs in NF90^{F432, 559A}-NF45 kaum negative Auswirkungen auf die RCA hatte, reduzierte die Modifikation des C-Terminus in NF90^{S651E}-NF45 hingegen die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung des RNA-*annealing* (k_{on}) sowie die Maximalaktivität k_{max} um ca. 50% im Vergleich zu NF90wt-NF45 (**Abb. 24**). Dementsprechend sind die dsRBMs eher weniger und der C-Terminus von NF90 eher stärker im Mechanismus des RNA-*annealing* involviert.

Weiterführende Analysen der RCA von NF90 Δ C63 und NF90 Δ C46, die einen verkürzten C-Terminus von NF90 enthielten, machten deutlich, dass das RGG-Motiv von NF90 essentiell für die RCA des Monomers ist. Da NF90 Δ C63 jedoch auch keine Bindung an ssRNA-1 zeigte, ist anzunehmen, dass dieser Umstand ebenfalls eine Ursache der Inaktivität dieser Variante darstellt (**Abb. 11**). Daraus ergibt sich, dass die dsRBMs von NF90 *per se* kein RNA-*annealing* katalysieren können. Die beobachtete Restaktivität der RCA der Komplex-Variante NF90 Δ C63-NF45, die kein RGG-Motiv von NF90 enthielt, weist auf eine mögliche Beteiligung des RGG-Motivs von NF45 am Prozess hin. Eine signifikante Assoziation von NF45 an RNA konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden (s. Anhang 7.2.1.2). Mit der C-terminal verkürzten Variante NF90 Δ C46 bzw. NF90 Δ C46-NF45 konnte eine im Vergleich zu NF90 Δ C63 und NF90 Δ C63-NF45 signifikante RCA gemessen werden, die jedoch geringer als NF90wt-NF45 war. Eine erhöhte Dissoziation dieser Komplex-Varianten wurde als Ursache für die verminderte RCA ausgeschlossen (s. 3.2.13). Insgesamt wird somit deutlich, dass die Präsenz eines RGG-Motivs für die RCA von NF90 bzw. NF90-NF45 essentiell ist. Das weist auf eine mögliche katalytische Beteiligung des RGG-Motivs in der RNA-*annealing*-Reaktion hin. Weiterhin wird angedeutet, dass auch die restlichen 43 Aminosäuren der C-terminalen Region von NF90 eine Funktion bei der RCA haben.

4.2.4.4 NF90-NF45 ist ein spezifisches RNA-Chaperon

Während der Etablierung des RNA-*annealing*-Assays wurde beobachtet, dass die Hybridisierung der 21nt langen RaSc-*full* langsamer als die der 5 nt kürzeren HCV-SL3-*full* ablief. Eine mit zunehmender Länge der Nukleinsäure in der Regel langsamer

ablaufende Hybridisierung konnte bereits an anderen Beispielen früher gezeigt werden (156). Interessanterweise erfolgte jedoch die NF90-NF45-katalysierte RNA-*annealing*-Reaktion der RaSc-*full* mit höherer Effizienz als die der HCV-SL3-*full*. Dies zeigt, dass aus den RNA-Eigenschaften allein nicht auf die Effizienz der katalysierten Reaktion geschlossen werden kann. Bei der Analyse von Determinanten, die sich auf diese Effizienz auswirken, zeigte sich, dass die strukturelle Organisation der RNAs die RCA der Proteine erheblich beeinflusst. So konnten weder NF90 noch NF90-NF45 das RNA-*annealing* von HCV-SL3-*bubble* katalysieren. Als direkte Ursache muss daher die Struktur der RNA angesehen werden. Wie bereits diskutiert, wiesen die dsRNAs HCV-SL3-*bubble* und HCV-SL3-*fork* entsprechend der Konstruktion nicht-komplementäre Bereiche auf (**Abb. 25**). Da eine Windung einer dsRNA-A-Helix aus 11 bp besteht, entsteht vor allem bei HCV-SL3-*bubble* eine Störung bei der Ausbildung einer A-Helix (**Abb. 25**). Das RNA-*annealing* der HCV-SL3-*fork* wurde dagegen durch NF90 und NF90-NF45 katalysiert. Diese RNA enthält einen zusammenhängenden Bereich von 11 bp. Daraus kann geschlossen werden, dass die katalysierte Reaktion die Ausbildung einer A-Helix der interagierenden ssRNAs erfordert und diese Struktur forciert. Damit kann eine Spezifität der RCA von NF90 bzw. NF90-NF45 definiert werden.

Unter bestimmten Voraussetzungen ermöglicht die spezifische RCA von NF90 bzw. NF90-NF45 die Katalyse eines *strand displacement*. So konnte ein proteinkatalysierter Strangaustausch bei der dsRNA HCV-SL3-*bubble* beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnten NF90 und NF90-NF45 kein *strand displacement* bei den dsRNAs HCV-SL3-*fork* und HCV-SL3-*full* durchführen. Demnach begünstigte die strukturelle Organisation der *bubble*-RNA die Reaktion, indem das Produkt des *strand displacement* eine vollständig komplementäre A-helikale dsRNA ergibt. (**Abb. 29**). In Anwesenheit von NF90 bzw. NF90-NF45 manifestiert sich der bimolekulare Reaktionsschritt des *strand displacement* stärker als in der unkatalysierten Reaktion, wobei die entsprechenden kinetischen Parameter ähnliche Beträge wie die der katalysierte Reaktion der vollständig komplementären HCV-SL3-*full* aufwiesen. Folglich trugen NF90 bzw. NF90-NF45 aktiv zum Austausch der Stränge bei, getrieben durch die Stabilität und Struktur des Produktes. Da NF90 und NF90-NF45 somit in der Lage sind RNAs umzustrukturieren, zeigen sie Eigenschaften, die für echten RNA-Chaperone charakteristisch sind. Dadurch wird die Bedeutung der strukturellen Organisation der RNAs für die elementaren RNA-*annealing*- bzw. *strand-displacement*-Reaktionen hervorgehoben.

Die Aktivität eines echten RNA-Chaperons wird dadurch definiert, dass die Struktur des Produktes nach der Katalyse auch in Abwesenheit des Chaperon erhalten bleibt (144,154). Im Fall von NF90 bzw. NF90-NF45 konnte gezeigt werden, dass die dsRNA-Struktur der in dieser Arbeit verwendeten RNAs stabil ist. Daher demonstrieren NF90 und NF90-NF45 alle Eigenschaften eines echten RNA-Chaperons. Dabei stellt sich eine

besondere, bisher nicht dokumentierte Funktionsweise eines RNA-Chaperons heraus. Im Unterschied zu anderen RNA-Chaperonen realisieren NF90 bzw. NF90-NF45 das *chaperoning* ausschließlich über deren spezifische RNA-*annealing*-Aktivität. Es wird somit demonstriert, dass sich die Eigenschaft von NF90 und NF90-NF45 verschiedene strukturelle Eigenschaften von RNA zu erkennen, auch auf das katalysierte RNA-*annealing* auswirkt. Diese differentielle RNA-Bindung von NF90 und NF90-NF45 erzeugt die Strukturspezifität bzw. -selektivität der RCA.

4.3 Der Mechanismus des RNA-*annealing*

4.3.1 Das unkatalysierte *annealing*

Um den Mechanismus der NF90-katalysierten Reaktion nachvollziehen zu können, musste zunächst geklärt werden, wie der unkatalysierte Prozess abläuft. Dafür sollten vor allem folgende Fragen beantwortet werden: i) *Wie ist die Energiebilanz der Reaktion?*, ii) *Ist das Hybridisieren ein kooperativer Prozess?*, iii) *Was ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt?*, iv) *Wie ist der Übergangszustand charakterisiert?* und v) *Verläuft das RNA-*annealing* nach einem one-site oder more-site Modell?*

*i-ii) Das RNA-*annealing* ist ein exergonischer, kooperativer Prozess.*

Die quantitative Auswertung der thermischen Denaturierung der RNAs erlaubte die Aufschlüsselung der enthalpischen und entropischen Beiträge sowie eine Aussage über die Änderung der Wärmekapazität (s. Anhang 7.2.2).

Der Verlauf aller Transitionskurven indizierte einen kooperativen Prozess der Dissoziation bzw. der Hybridisierung der RNAs. Ebenso war der Hybridisierungsprozess von einem hohen Entropieverlust ($\Delta S^\ddagger \sim -300 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) begleitet, der den Übergang der Einzelstränge in die hoch geordnete Konformation einer A-Helix der dsRNA widerspiegeln könnte. Die hohe Enthalpiefreisetzung (ΔH_{TM}) während des Hybridisierens, welche mit dem Grad der Basenpaarung korreliert, kompensierte die ungünstige Entropieänderung und resultierte für alle untersuchten dsRNAs unter Assay-Bedingungen in einer thermodynamischen Stabilität ΔG^0 zwischen 11 – 17 kcal mol⁻¹. Somit wurde unter Assay-Bedingungen und unabhängig von der genauen Struktur der RNA der Doppelstrang als der thermodynamisch begünstigte Zustand definiert.

iii-v) Die Hybridisierung wird durch eine Reaktion 2. Ordnung limitiert, kann simultan an mehreren Stellen initiieren und wird durch die Stabilität des Produktes getrieben.

Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante des RNA-*annealing* zeigte eine hyperbole Konzentrationsabhängigkeit von den Substraten, die eine intramolekulare Umwandlung

einer der RNAs vor der Reaktion (*conformational selection*) oder nach dem initialen RNA-RNA-Komplex (*induced fit*) indizierte (**Abb. 20**). Eine Unterscheidung der Mechanismen konnte an dieser Stelle noch nicht erfolgen. Des Weiteren beschrieb das RNA-*annealing* eine Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung in einer Größenordnung ($10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), die nicht in der Dimension des Diffusionslimits lag. Daher limitierte der RNA-RNA-Kontakt die Reaktion, führte aber aufgrund verschiedener Determinanten (z.B. Struktur, Konformation, Ladung) nicht in jedem Fall zur Hybridisierung. Daher wurde der Übergangszustand der Reaktion über eine Arrhenius-Analyse charakterisiert. Demnach war der Übergangszustand aller analysierten Hybridisierungsreaktionen homolog definiert und wies auf nahezu identische Mechanismen hin (**Abb. 25**). Die erhaltenen Daten stimmten mit bereits publizierten Daten eines sehr ähnlichen RNA-Systems überein (121). Entsprechend der Entropieänderung im Reaktionsverlauf zum Übergangszustand nimmt die Anzahl der Mikrozustände ab, weshalb eine strukturell besonders definierte Struktur bzw. Konformation der in Kontakt stehenden RNAs indiziert wird. Die positiven Aktivierungsenthalpien zeigen, dass im Übergangszustand möglicherweise noch keine Basenpaarungen sondern eher ungünstige Bindungsereignisse wie elektrostatische Abstoßungen der Ribose-Phosphat-Rückgrate vorliegen. Dies wird auch durch publizierte Daten der Hybridisierung anderer RNAs bestätigt (121,157-161), welche gleichermaßen eine ungünstige Aktivierungsenthalpie aufweisen (**Tabelle A - 8**).

In diesem Zusammenhang ist ein allgemeines Modell formuliert worden (**Abb. 38**), dem ein Hybridisierungsvorgang von RNA folgen könnte (162,163). Demzufolge führt der erste RNA-RNA-Kontakt zu einem *pre*-Komplex (Begegnungskomplex), der keine basenspezifischen Interaktionen involviert. Dieser geht reversibel in einen Zustand initialer basenspezifischer Wechselwirkungen zwischen den Strängen über, der die Ausbildung von 2 – 3 Basenpaaren und zugleich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (157,159,164). Schlussendlich wird die Duplexbildung initiiert, aus der der vollständige Doppelstrang hervorgeht. Die basenspezifischen Schritte können dabei an mehreren Stellen stattfinden (*more-site* Modell) und erzwingen keine Initiation an einem freien Ende der RNA (157). Diesem Modell entsprechend findet erst die Assoziation beider ssRNAs statt, bevor eine intramolekulare Umwandlung erfolgt. Daher beschreibt das Modell folglich einen *induced-fit*-Mechanismus, der die hier ermittelte

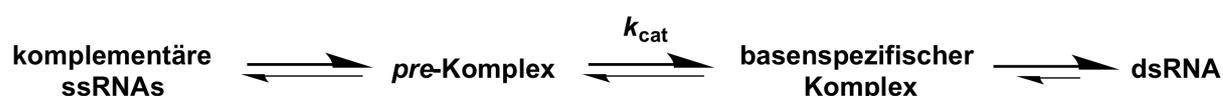


Abbildung 38: Modellvorstellung der Hybridisierungsreaktion von RNA. Komplementäre ssRNAs formen zunächst den Begegnungskomplex (*pre*-Komplex), in dem noch keine basenspezifischen Interaktionen zwischen den Strängen ausgebildet werden. Im folgenden geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden 2 – 3 basenspezifische Interaktionen ohne Helixentwicklung ausgebildet, die den basenspezifischen Komplex ergeben. Im letzten Schritt erfolgt die Duplexbildung mit Übergang in die helikale Struktur der dsRNA (162, 163).

hyperbole Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten begründet. Entsprechend der Charakteristika des Übergangszustands ist eine quantitative Dissoziation des Begegnungskomplexes bzw. des basenspezifischen Komplexes eine mögliche Ursache der limitierten bimolekularen RNA-*annealing*-Reaktion (159,160). Da alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten RNA-Substrate in der Lage waren, mindestens 2 – 3 Basenpaare auszubilden, kann anhand des präsentierten Modells begründet werden, weshalb strukturunabhängig nahezu identische Kinetiken ermittelt wurden.

Zusammenfassend ergibt sich nach Hammond und in Übereinstimmung des Modells eine Struktur des Übergangszustands, die weder der der Substrate, noch jener des Produkts entspricht (165). Folglich repräsentiert die im Vergleich zu den Substraten höhere thermodynamische Stabilität des Produktes die die Reaktion treibende Kraft.

4.3.2 Die NF90-NF45-katalysierte Reaktion

Über die Mechanismen katalysierter RNA-*annealing*-Reaktionen sind nur in wenigen Fällen Informationen verfügbar (**Tabelle A - 8**). Folgende Modelle werden allgemein diskutiert: *matchmaker*-Modell (166), bei dem vor allem ein Ladungsausgleich der RNAs durch das Protein erfolgt, und ein Modell, bei dem das Protein die RNA in eine spezifische *annealing*-kompetente Konformation überführt (121,166). Sofern nicht anders angegeben, gilt die folgende Betrachtung für NF90 und NF90-NF45.

Wie katalysiert NF90 bzw. NF90-NF45 im Vergleich zu anderen Proteinen die Reaktion? Ausgehend von einem einfachen Modell muss NF90 (E) i) eine ssRNA (A) und ii) die zweite ssRNA (B) assoziieren, iii) den Doppelstrang (P) ausbilden und schließlich iv) die dsRNA freisetzen (**Abb. 39**). Für die Umsetzung stehen dem Protein zwei dsRBMs und ein RGG-Motiv zur Verfügung. Die Analyse der Primärstruktur von NF90 weist darauf hin, dass ein weiteres Motiv zur RNA-Bindung im C-Terminus von NF90 existieren könnte: ein YGG-Motiv (s. 7.5). In der vorliegenden Arbeit wurden indirekte Hinweise erhalten die auf eine funktionelle Rolle dieser Sequenz in den C-terminalen letzten 43 Aminosäuren hindeuten könnten (s.o. und Daten nicht gezeigt).



Abbildung 39: Allgemeines Reaktionsschema des katalysierten RNA-*annealing*. Das Protein E (NF90) formt im ersten Schritt einen Binärkomplex mit der ersten ssRNA (E-A), bevor sich der Übergang in den Ternärkomplex der zweiten gebundenen ssRNA anschließt (E-A-B). Im nächsten Schritt erfolgt die intramolekulare Duplexbildung des Ternärkomplexes und bildet den Produkt-Protein-Komplex E-P. Im Anschluss wird das Produkt unter Regeneration des Proteins freigesetzt.

i) Die Bindung von NF90 an ssRNA induziert eine geschlossene Konformation von E-A

Repräsentativ für die Bindung von NF90 an unstrukturierte ssRNA wurde die Assoziation der ssRNA-1 nach deren thermodynamischen Parametern aufgeschlüsselt (van't Hoff-Analyse). Demnach ging die Assoziation mit einem hohen Enthalpiegewinn einher, der im Komplex um ca. 6 kcal mol^{-1} stärker als im Monomer ausgeprägt war (**Abb. 27**). Daher lagen in der RNA-Interaktion des Heterodimers mehr begünstigende Wechselwirkungen mit dem Liganden als im Monomer vor. Allerdings charakterisierte die Bindung der Proteine an ssRNA-1 eine signifikante Entropieabnahme, die im Heterodimer größer als im Monomer ausfiel. Diese indizierte eine Abnahme der Anzahl an Mikrozuständen und eine im Vergleich zu den Edukten rigidere Struktur des Binärkomplexes (E-A), die aufgrund bisheriger Daten sowohl das Protein als auch die RNA einschloss. Die Bindung derselben RNA an die HCV Polymerase (NS5B) resultierte in keiner Enthalpieänderung sondern in einem Entropiegewinn, der die Reaktion antrieb (167). Im Gegensatz zu NF90 und NF90-NF45 nahm bei NS5B daher die konformationelle Freiheit (Mikrozustände) des Systems zu und indizierte eine hohe Dynamik des Binärkomplexes, die mit dem Übergang in die flexible offene Konformation der Polymerase korreliert wurde. Dementsprechend könnte die Bindung von NF90 an ssRNA-1 eine Transformation in eine Struktur induzieren, die einer geschlossenen Konformation entspricht. Diese könnte energetisch durch die Bindungsenthalpie realisiert werden. Strukturell wird dieses Szenario durch den hohen Anteil an IDRs (*intrinsically disordered regions*) von NF90 unterstützt, in welchen das RGG-Motiv lokalisiert ist und die generell eine große Assoziationsfläche beschreiben (168,169). Im RNA-freien Zustand würde dies die „offene Konformation“ widerspiegeln. Infolge der RNA-Bindung könnte dieser Zustand an Dynamik verlieren und in die „geschlossene Konformation“ übergehen (s. auch 4.3.3).

ii) Transiente Bindung der zweiten, komplementären RNA im Ternärkomplex (E-A-B)

Die Gleichgewichtsisothermen der Bindung von NF90 an ssRNA-1 deuteten keine erhöhte Stöchiometrie der NF90-ssRNA-Interaktion an. Die simultane Assoziation einer zweiten ssRNA-1 konnte nur über eine aktive-Zentren-Titration von NF90-NF45 unter sehr hoher Konzentration der ssRNA-1 ($10 \times K_D$) identifiziert werden ($n = 0.6$, Daten nicht gezeigt). Daraus kann geschlossen werden, dass NF90-NF45 komplementäre ssRNAs benötigt, um diese simultan zu binden. Das konnte in den einführenden RCA-Experimenten bestätigt werden. NF90-NF45 war nicht in der Lage, nicht-komplementäre ssRNAs in räumliche Nähe zu bringen (**Abb. 20**). Daher scheint nur eine transiente Bindung der zweiten ssRNA vorzuliegen. Eine stabile Assoziation einer zweiten RNA erfolgt daher thermodynamisch kontrolliert durch die Komplementarität zur bereits gebundenen ersten RNA.

iii) NF90-NF45 präsentiert eine *annealing*-kompetente Konformation der Substrate zur Förderung der initialen Basenpaarung ($E-A-B^\#$)

In Anwesenheit von NF90-NF45 blieben die Bimolekularität der RNA-*annealing*-Reaktion und das hyperbolische Verhalten von k_{obs} erhalten. Demnach folgt die Reaktion auch in Anwesenheit des Proteins einem *induced-fit*-Mechanismus. Dabei wurden die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung (von $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, **Abb. 20**) und k_{max} um mindestens eine Größenordnung gesteigert. Entsprechend des vorgeschlagenen RNA-*annealing*-Modells (**Abb. 38**) korreliert die Steigerung der Maximalaktivität in Anwesenheit des Komplexes mit einer Förderung der initialen Basenpaarung oder mit einer Verlagerung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts. Daher kann vermutet werden, dass der Komplex bimolekulare Schritte der Assoziation der RNA-Einzelstränge und monomolekulare Prozesse nach diesem Schritt begünstigt. Als Resultat führt nahezu jeder RNA-RNA-Kontakt zum Doppelstrang. Das unterstützte die Vermutung einer Vorbereitung der RNA-Substrate für die Reaktion in Form der Induktion einer *annealing*-kompetenten Konformation. Wie NF90-NF45 nach Assoziation der beiden ssRNAs die Ausbildung des Duplex begünstigt, wurde über Arrhenius-Analysen charakterisiert (**Abb. 26**). In Anwesenheit des Wildtyp-Komplex konnte eine Reduktion der freien Aktivierungsenthalpie ($\Delta G^\#$) der Reaktion um fast 2 kcal mol^{-1} ermittelt werden, die auf eine Kompensation aller ungünstigen enthalpischen Beiträge zurückging ($\Delta H^\# < 0 \text{ kcal mol}^{-1}$). Folglich schien der Komplex einen hoch-energetischen Zustand im Verlauf der Reaktion zu stabilisieren und somit dessen Lebensdauer zu erhöhen (159-161). Analog der Bindung an ssRNA-1 resultierte jedoch eine Abnahme der Entropie im Übergangszustand und damit eine Reduktion der Mikrozustände im Vergleich zum Ausgangszustand der Reaktion. Für diesen Effekt können eine geringere Anzahl reaktiver Kollisionen oder eine eingeschränkte Dynamik bzw. Diffusion des Systems verantwortlich sein (159). Für die Bindung des Komplexes an ssRNA wurde bereits der Übergang des Proteins in eine „geschlossene Konformation“ diskutiert. Diese Hypothese aufgreifend könnte somit eine Vorbereitung der Substrate durch den Komplex erfolgen, die sich vor allem auf den Übergangszustand der RNA-*annealing*-Reaktion auswirkt. NF90-NF45 verhält sich somit analog zum RNA-*annealer* gBP21 (166). Ähnlich diesem Protein induziert NF90-NF45 eine *annealing*-kompetente Konformation der ssRNAs. Die Vorbereitung der ssRNA in Form einer solchen Konformation würde folglich eine beschleunigte Basenpaarung der RNA-Einzelstränge im Übergangszustand ermöglichen. Diese Vermutung wird durch die gesteigerte Maximalaktivität unterstützt. Somit wird nahe gelegt, dass im Mittelpunkt des Mechanismus der NF90-NF45-katalysierten RNA-*annealing*-Reaktion das Bereitstellen einer *annealing*-kompetenten Konformation der RNA ist. Nach dem Hammond-Postulat entspricht diese Situation

einem früheren Übergangszustand der Reaktion in Anwesenheit des Heterodimers, der strukturell mehr den ssRNAs als dem dsRNA-Produkt entspricht.

iv) Die Affinität zur dsRNA bestimmt den Grad der Produkt-Freisetzung (E-P)

Nach der Bildung der Protein-gebundenen dsRNA wird diese über die RNA-bindenden Motive von NF90-NF45 stabilisiert. Weil NF90-NF45 eine sehr hohe Affinität zu dsRNA zeigt, verbleibt der Großteil der durch die RCA entstehenden dsRNA Protein-gebunden. Der Anteil an freigesetzter dsRNA wird durch die Affinität der Protein-dsRNA-Interaktion determiniert.

4.3.3 Die RNA-bindenden Motive von NF90 sind in verschiedener Weise an der Katalyse beteiligt

Die Funktionen der RNA-bindenden Motive von NF90 im Prozess des RNA-*annealing* wurden u.a. durch Arrhenius-Analysen von NF90, NF90-NF45 und der pseudophosphorylierten Komplex-Variante NF90^{S651E}-NF45 adressiert (**Abb. 26**). Die bereits präsentierten Daten indizierten keinen Unterschied der Varianten im RNA-*annealing*, wenn die Auswertung nach Doetsch *et al.* erfolgte (121). Bei dieser Form der Auswertung wurde der Referenzpunkt der Analyse auf den RNA-gebundenen Zustand unmittelbar vor dem RNA-*annealing* gesetzt (E-A oder E-A-B), und Konzentrationsunterschiede der Proteine vernachlässigt. Der Vorteil dieser Normierung ist, dass ausgehend von der letzten Vorstufe (E-A oder E-A-B) der direkte Produktbildungsprozess zu E-P ausgewertet werden kann. Dementsprechend folgten alle Varianten ab dieser Stufe demselben Mechanismus. Da jedoch Aktivitätsunterschiede der Varianten quantifiziert wurden, wurde somit auf Unterschiede im Zustand E-A im Kontext der vollständigen Reaktion hingewiesen, die bereits durch die RNA-Bindungsstudien der Varianten belegt wurden. Eine Normierung von k_{obs} auf die eingesetzte Proteinkonzentration verlagert den Referenzpunkt der Analyse auf E, sodass Unterschiede in den Zuständen E-A und E-A-B identifiziert werden können (**Tabelle A - 7**). Diese Betrachtung hat allerdings den Nachteil, dass kein direkter Vergleich zur unkatalysierten Reaktion möglich ist. Diese Auswertung machte auf unterschiedliche Änderungen der freien Aktivierungsenthalpie im Reaktionsprogress der Varianten aufmerksam, die jeweils verschiedene Entropieänderungen charakterisierten (s. folgenden Abschnitt).

Anhand der gesammelten thermodynamischen (Bindung) sowie kinetischen Daten (*annealing*) können hypothetische Energiediagramme von NF90, NF90-NF45 und der pseudophosphorylierten Variante zusammengestellt werden, die eine intrinsische Konsistenz nur unter Berücksichtigung des Zustands E-A-B erhalten (**Abb. 40**). Demnach unterscheiden sich die jeweiligen Energieinhalte der Zustände E-A, E-A-B und

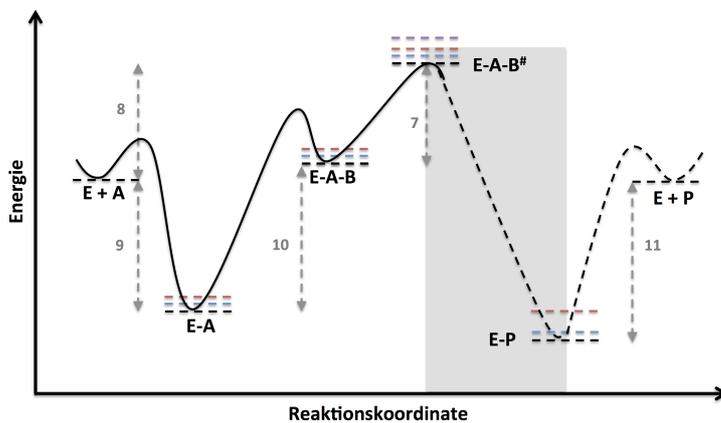


Abbildung 40: Vergleich der Energie-Reaktionsprofile der RNA *annealing*-Prozesse verschiedener Varianten von NF90 und der unkatalysierten Reaktion. Das Reaktionsprofil der *annealing*-Reaktion von NF90 (rot), NF90-NF45 (schwarz) und NF90^{S651E}-NF45 (blau) im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion wurde gemäß dem genannten Reaktionsschema und den präsentierten experimentellen Daten zusammengestellt. In grau sind die Unterschiede der freien Enthalpie für die Reaktion von NF90wt-NF45 zwischen den verschiedenen Zuständen in kcal mol⁻¹ angegeben. Die Reaktion verläuft über mindestens ein Intermediat (E-A-B).

Der Übergangszustand wurde mittels Arrhenius-Analysen adressiert. Die Pfeile entsprechen den Beträgen der Änderungen der freien Enthalpie zwischen den indizierten Zuständen entlang der Reaktionskoordinate. Für die grau gekennzeichnete Position der Reaktionskoordinate kann keine Relation zwischen E-A-B[#] und E-P angegeben werden. Der relative Energieinhalt von E-P ist daher auf E + P bezogen und der Reaktionsverlauf von E-A-B[#] zu E + P gestrichelt dargestellt. Im Vergleich zu NF90wt-NF45 prägen NF90 und die pseudophosphorylierte Komplex-Variante Defizite in der Ausbildung einer *annealing*-kompetenten Konformation der RNA aus, die in erhöhten Energieniveaus der Zustände E-A, E-A-B und des Übergangszustands E-A-B[#] resultieren. Dadurch wird indiziert, dass der C-Terminus von NF90 mechanistisch in die Reaktion und in der Induktion dieser Konformation involviert ist. Charakteristisch für die katalysierte Reaktion aller Varianten ist das niedrigere Energieniveau des E-P-Komplexes gegenüber dem freien Produkt. Das bedingt eine geringe Produkt-Freisetzung.

E-A-B[#] zwischen NF90, NF90-NF45 und der pseudophosphorylierten Komplex-Variante, welche mit der Effizienz der RCA korrelieren. Des Weiteren folgt, dass i) die Heterodimerisierung zu einer katalytischen Verbesserung führt und ii) die Pseudophosphorylierung eine Verschlechterung der Katalyse induziert. Diese gehen ausschließlich auf eine verringerte Anzahl der Mikrozustände im Vergleich zum Wildtyp zurück ($\Delta H^\ddagger < 0$ kcal mol⁻¹ bei allen Varianten) und indizieren entsprechend der Arrhenius-Theorie eine geringere Häufigkeit an Begegnungskomplexen, an reaktiven Kollisionen oder größere sterische Hinderungen als im Wildtyp-Komplex. In Korrelation zur aufgestellten Theorie könnten sich in den Varianten Schwächen in der Induktion oder Präsentation einer *annealing*-kompetenten Konformation der ssRNAs manifestieren. Daraus kann unmittelbar geschlossen werden, dass der C-Terminus von NF90 in der Ausbildung dieser Konformation und in der Assoziation der zweiten RNA stark involviert ist (**Abb. 41**).

Aufgrund der geringen Datenmenge über die Funktion der anderen RNA-bindenden Motive von NF90 innerhalb der RNA-*annealing*-Aktivität kann über deren Bedeutung für diesen Prozess nur spekuliert werden. Über die Untersuchungen an NF90 Δ C63 wurde deutlich, dass die dsRBMs von NF90 *per se* kein RNA-*annealing* katalysieren (**Abb. 24**). Zusätzlich lässt der marginale Einfluss der dsRBM-Perturbation in NF90^{F432, 559A}-NF45 auf das RNA-*annealing* einen sehr geringen Beitrag dieser Motive bis einschließlich des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes vermuten. Die identifizierte Strukturspezifität der RCA von NF90-NF45, weist auf eine Stabilisierung des initialen Duplex oder

Ausübung eines konformationellen Drucks zur Induktion einer helikalen Struktur durch die dsRBMs hin (**Abb. 41**). Das YGG-Motiv des C-Terminus hingegen könnte im Zusammenspiel mit dem RGG-Motiv zur Ausbildung der *annealing*-kompetenten Konformation oder zur Assoziation der zweiten ssRNA beitragen. Es ist anzunehmen dass RGG- bzw. YGG-Motive unterschiedlich mit ssRNA interagieren (170-172). Das könnte zur Förderung der initialen Basenpaarung führen und dem Zustand der *annealing*-kompetenten Konformation entsprechen. Aus den gesammelten Daten und Theorien ergibt sich ein Modell des NF90-NF45-katalysierten RNA-*annealing* (**Abb. 41**).

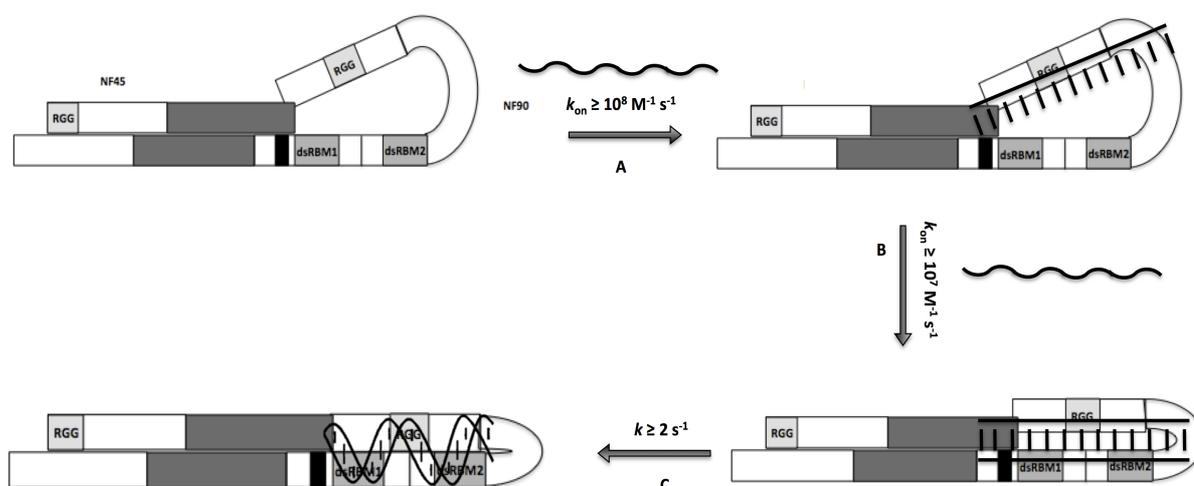


Abbildung 41: Hypothetisches Modell des NF90-NF45-katalysierten RNA-*annealing*. (A) Die Bindung der ersten ssRNA an NF90-NF45 resultiert unter Beteiligung des C-Terminus in einer *annealing*-kompetenten Konformation der RNA, die eine optimierte Präsentation der Basen induziert. (B) Simultan mit der Assoziation der zweiten ssRNA geht das System in eine geschlossene Konformation über, wodurch die Dissoziation des Begegnungskomplexes minimiert und entsprechend stabilisiert wird. Aufgrund der limitierten Diffusion der RNA-Stränge innerhalb der geschlossenen Konformation und der Exposition der Basen wird eine signifikant schnellere Ausbildung der initialen Basenpaarung erreicht. (C) Der Komplex induziert einen schnelleren Übergang in die Duplex- und somit Produktbildung, indem die dsRBMs einen strukturellen / konformationellen Druck auf die initial gepaarten Stränge ausüben und die Rückreaktion minimieren.

Die Effizienz der katalysierten Reaktion könnte auf einer Kanalisierung der Substrate beruhen: Die Assoziation der ssRNAs verläuft zu Beginn zum Großteil über den C-Terminus von NF90 und je mehr der Komplex beider Einzelstränge im Verlauf der Reaktionskoordinate der Struktur eines Doppelstrangs ähnelt, umso mehr verlagert sich der Bindungsort zu den dsRBMs, die dann entsprechend Hauptbeiträge zur Bindung liefern.

4.3.4 Die Aktivität von NF90-NF45 als RNA-*annealer* im Vergleich anderer RNA-*annealer*

Der präsentierte Mechanismus der NF90-NF45-katalysierten Reaktion kombiniert einige Aspekte bisher diskutierter Funktionsweisen chemischer Substanzen und anderer Proteine mit RNA-*annealing*-Aktivität (**Tabelle A - 8**). So wurde beispielsweise für p53 gezeigt, dass es wie NF90-NF45 eine Reduktion der Aktivierungsenthalpie induziert, aber zusätzlich auch entropische Beiträge verbessert (159,161). Die Autoren interpretieren, dass p53 den basenspezifischen RNA-RNA-Komplex der initialen

Basenpaarung stabilisiert, gehen aber auf die Entropieveränderung nicht weiter ein. In einer anderen Arbeit der gleichen Autoren wurde die Wirkung von Cetyl-trimethylammoniumbromid (CTAB) auf das RNA-*annealing* der mit p53 eingesetzten RNAs analysiert (160). In einem zu p53 vergleichbaren Puffersystem reduzierte CTAB die Aktivierungsenthalpie in ähnlichem Ausmaß wie p53 ohne dabei die Entropie signifikant zu verändern. Die Autoren diskutierten in diesem Zusammenhang einen entropiesteigernden Effekt (des p53) als eine Stabilisierung des Begegnungskomplexes. In Arbeiten von Doetsch *et al.* wurde die RNA-*annealing*-Aktivität des Tat-1 Peptids (44-61) analysiert, die signifikante Unterschiede zu vorherigen Mechanismen demonstrierte (121). Das Peptid erhöhte sowohl die Aktivierungsenthalpie als auch –entropie der RNA-*annealing*-Reaktion. Die Autoren diskutierten nur die Entropiezunahme und interpretierten eine erhöhte Freisetzung von Ionen sowie der Hydrathülle der RNA durch Assoziation des Peptids. Diese Effekte wurden von den Autoren auf die Nettoladung des Peptids zurückgeführt. Unter Beibehaltung der Nettoladung zeigten jedoch Peptid-Varianten keine RNA-*annealing*-Aktivität. Daher scheint das Modell der RCA des nativen Tat-1 Peptids unausgereift.

Aufgrund der mechanistischen Erkenntnisse anderer RNA-*annealer* existiert scheinbar kein Zusammenhang zwischen einer lokalen positiven Ladungsdichte des Katalysators und einer Reduktion der Aktivierungsenthalpie. Entropieerhöhungen werden vor allem als Stabilisierung des Begegnungskomplexes interpretiert. Der individuelle Beitrag *annealing*-kompetenter Konformationen oder limitierter, gelenkter Diffusion wird unterschiedlich bewertet.

Die größte mechanistische Besonderheit von NF90-NF45 besteht in seiner strukturspezifischen RNA-*annealing*-Aktivität, die das Heterodimer als echtes RNA-Chaperon klassifiziert. Das am weitesten diskutierte mechanistische Modell echter RNA-Chaperone beruht auf einer besonderen strukturellen Eigenschaft solcher Proteine. Diese Proteine besitzen einen hohen Strukturanteil konformationell undefinierter Regionen (IDRs) (168,169). Folgende Aspekte werden vorgeschlagen wie IDRs den Faltungsprozess von RNAs unterstützen könnten: i) IDRs ermöglichen eine gelockerte Spezifität bei der Bindung an allgemeinen konformationell sehr flexible RNA, ii) die größere Assoziationsoberfläche von IDRs kann einen destabilisierenden Effekt auf die RNA ausüben und somit eine Faltungsplattform für die RNA darstellen, die thermodynamisch günstigste Konformation einzunehmen, und iii) IDRs stellen eine Basis zur Erklärung der ATP-unabhängigen Destabilisierung von RNA-Strukturen unter Anwendung eines Entropie-Transfer-Modells dar. In diesem Modell wird die zur Auflösung von RNA-Strukturen benötigte Energie aus der RNA-Protein-Interaktion induzierten transienten Faltung von IDRs gewonnen („*fly casting*“-Mechanismus (173)).

Demnach wird die Abnahme der Mikrozustände der IDRs in Form einer Zunahme dieser Zustände in der RNA kompensiert.

Die Vorhersage der Sekundärstrukturtopologie von NF90-NF45 und der gemessene Fern-UV CD indizieren in der Tat einen hohen Anteil an IDRs. Diese könnten die hohe Geschwindigkeit der RNA-Assoziation erklären, indem sie analog anderer Proteine mit ihrer großen Assoziationsoberfläche die Häufigkeit einer erfolgreichen Bindung erhöhen und im RNA-freien Zustand die vorgeschlagene „offene Konformation“ von NF90-NF45 repräsentieren. Im Gegensatz zu anderen RNA-Chaperonen basiert das vom Heterodimer katalysierte *chaperoning* allerdings nicht auf einer Destabilisierung von RNA-Strukturen sondern auf einer Instabilität bestimmter dsRNA-Strukturen selbst. Dies äußerte sich darin, dass der Komplex nur auf den unvollständig komplementären HCV-SL3-*bubble* ein *strand displacement* katalysieren konnte. Ohne diese besondere strukturelle Organisation konnte diese Aktivität nicht beobachtet werden. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur RCA von NF90-NF45 geben Grund zur Vermutung, dass das Entropie-Transfermodell in dieser Form keine Anwendung bei NF90-NF45 findet. Vielmehr wird entgegen dem Modell und aufgrund der ermittelten Entropieabnahme der katalysierten Reaktion eine bestimmte Konformation in beiden Komponenten (RNA und Protein) im Verlauf der Reaktion induziert.

Zusammenfassend ergibt sich auf Grundlage der einzelnen Reaktionsschritte der Hybridisierung von RNAs sowie der Gegenüberstellung verschiedener Proteine mit RCA eine Vielzahl an möglichen Interferenzpunkten im Reaktionsprozess, sodass scheinbar jedes Protein mit RCA individuelle Strategien entwickelt hat, das *annealing* bzw. *chaperoning* zu realisieren.

4.4 Die biologische Relevanz der RNA-Chaperon-Aktivität

Es wurde bereits ausführlich auf die Funktion von NF90 als RNA-bindendes Protein (RBP) eingegangen. Dabei wurde diskutiert, dass die individuellen RNA-Bindungseigenschaften eines RBPs dessen resultierende Bindungsspezifität und somit dessen spezifische Funktion(en) im RNA-Metabolismus determinieren (22). In diesem Zusammenhang wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nun eine RNA-Chaperon-Aktivität von NF90 identifiziert. Daher sollte die Frage geklärt werden, welche Bedeutung diese Aktivität für die beschriebenen Funktionen von NF90 hat. Für diese Analysen wurden zwei Funktionen von NF90 ausgewählt, die in der Literatur gut dokumentiert sind: Die Wirtsfaktorfunktion von NF90 im HCV-Lebenszyklus und die Stabilisierung der VEGF-mRNA (s. u.).

4.4.1 NF90 ist ein *host factor* der Replikation des Hepatitis C-Virus

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurde NF90 als Wirtsfaktor des Lebenszyklus von HCV identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein spezifisch an die 3'-UTR der viralen RNA assoziiert (**Abb. 3** und **Abb. 42**). Dabei sind experimentelle Hinweise gewonnen worden, dass NF90 die Replikation des Virus stimuliert (58,59). Diese Beobachtungen stehen möglicherweise im Zusammenhang mit den in der 3'-UTR des viralen Genoms lokalisierten regulatorischen RNA-Elementen. Besonders hervorzuheben ist dabei der *stem-loop* 5BSL3.2 der 5BSL3-Region, der mehrfach als essentiell für die Regulation der Translation und Replikation der viralen RNA *in cellulo* beschrieben wurde (72,73,76,125). Strukturanalysen belegten, dass dieser SL Teil einer besonderen *pseudoknot*-Struktur der viralen RNA ist (s. 1.2.3.1). Ausgehend von 5BSL3.2 schlugen Tuplin und Mitarbeiter ein *riboswitch*-Modell vor, das eine „geschlossene“ und „offene“ Konformation der viralen RNA definiert (74,75). Dem Modell zufolge induziert die Ausbildung der *kissing-loop*-Interaktion zwischen 5BSL3.2 und SL2 die geschlossene Form der RNA und vermittelt eine Stimulation der Translation sowie Inhibierung der Replikation (**Abb. 42**). Die Autoren stellten fest, dass in dieser Konformation die *kissing-loop*-Interaktion zu einer Destabilisierung des SL2 des X-tail führt. Eine Störung der *kissing-loop*-Interaktion induziert dagegen die offene Konformation der RNA, in der SL2 präsent ist. Die offene Konformation stimuliert die Replikation und inhibiert die Translation (74). Wie diese unterschiedlichen Aktivitäten der beiden Konformere vermittelt werden, ist größtenteils unklar. SL2 stellt zusammen mit SL1 die Bindestelle der viralen Polymerase auf dem Genom dar (174,175). Es konnte gezeigt werden, dass deren Aktivität sehr sensitiv auf Veränderungen dieser RNA-Strukturen reagiert (176-178). Möglicherweise führt die Destabilisierung von SL2 innerhalb der geschlossenen Konformation der viralen RNA demnach zu einer reduzierten Initiationseffizienz der viralen Polymerase bei der RNA-Synthese. Isken *et al.* konnten nun zeigen, dass NF90 mit sehr hoher Affinität an die Struktureinheit SL3-polyU assoziiert, die in unmittelbarer Nähe zu SL2 lokalisiert ist und einen Teil des X-tail darstellt. Diese Situation legt eine Interferenz mit der *kissing-loop*-Interaktion nahe. Auf dieser Grundlage wurde unter Berücksichtigung des *riboswitch*-Modells in der vorliegenden Arbeit die spezifische Funktion von NF90 bzw. NF90-NF45 bei der Replikation von HCV analysiert.

Für diese Untersuchung wurde ein RdRP-Assay etabliert der den ersten Schritt der viralen Replikation mit viralem Templat 5BSL3.1_3'-UTR rekonstituiert. Dieses Templat enthielt die oben beschriebenen *pseudoknot*-Strukturelemente. Nach Komplementation mit NF90, NF90wt-NF45 bzw. NF90^{S651E}-NF45 konnte ausschließlich mit NF90wt-NF45 eine Stimulation der RdRP-katalysierten (-)-Strang-RNA-Synthese quantifiziert werden (**Abb. 31**). Eine allgemeine Stimulation der RdRP-Aktivität durch NF90wt-NF45 konnte

unter Verwendung anderer RNA-Templates ausgeschlossen werden. Diese Situation demonstriert zwei Aspekte. Zum einen muss NF90wt-NF45 im Gegensatz zu NF90 und NF90^{S651E}-NF45 Eigenschaften besitzen, die für den stimulierenden Effekt essentiell sind. Zum anderen wird angedeutet, dass auch innerhalb des Templates 5BSL3.1_3'-UTR bestimmte Determinanten vorliegen mussten, die für die Funktion von NF90wt-NF45 benötigt werden. Da nur dieses Template die 5BSL3-Region enthielt, wurde an dieser Stelle vermutet, dass der *pseudoknot* der RNA und die RCA von NF90wt-NF45 ausschlaggebend für die beobachteten Effekte sind. Deswegen wurde die Hypothese verfolgt, dass NF90wt-NF45 die Struktur der RNA verändert.

Die Struktur von 5BSL3.1_3'-UTR wurde über Schmelzkurven-Analysen in An- und Abwesenheit von NF90, NF90wt-NF45 und NF90^{S651E}-NF45 untersucht (**Abb. 32**). Es zeigte sich, dass die Proteine die Struktur von 5BSL3.1_3'-UTR unterschiedlich veränderten, indem sie unterschiedliche Strukturgehalte der RNA induzierten. Interessanterweise wurden nur in Anwesenheit von NF90wt-NF45 Strukturelemente von

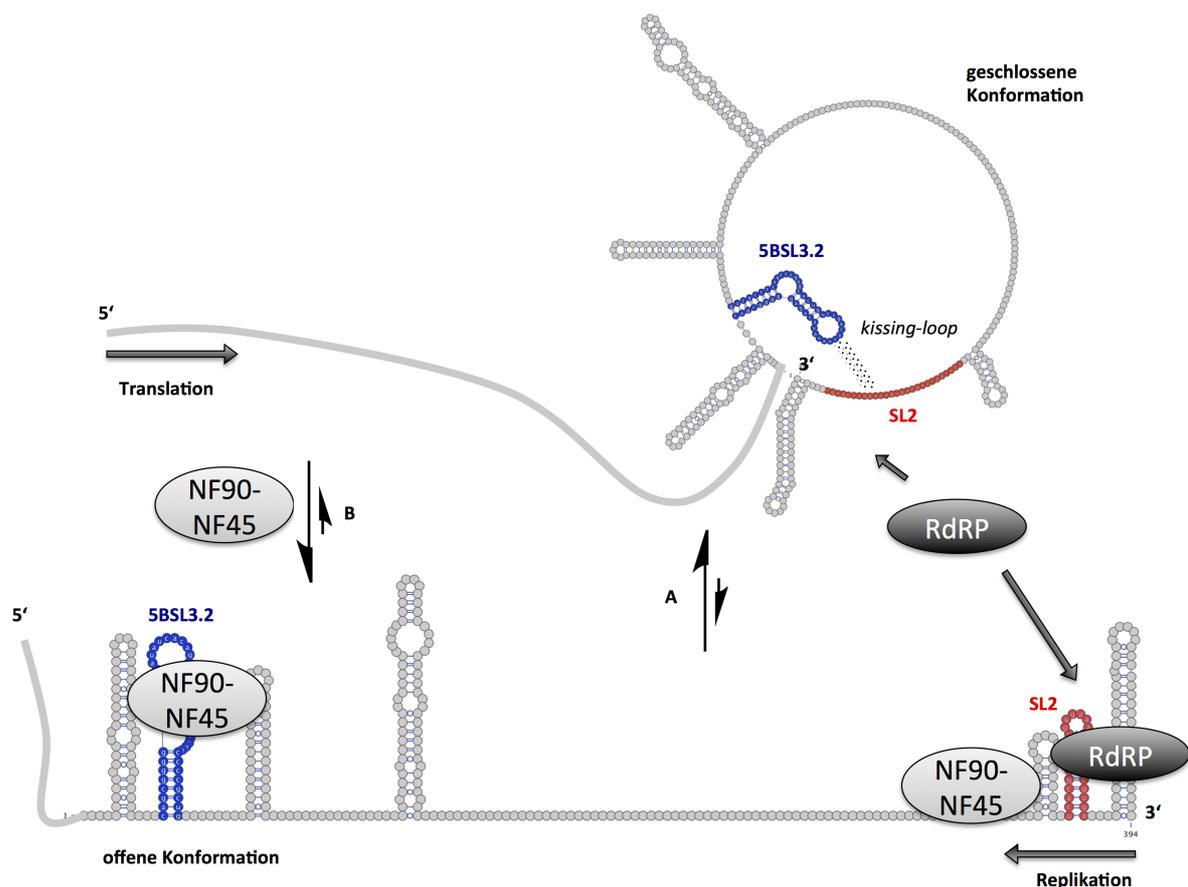


Abbildung 42: Modell der Stimulation der viralen (-)-Strang-RNA-Synthese von HCV durch NF90-NF45. (A) Entsprechend des von Tuplin *et al.* vorgeschlagenen Modells liegt die virale RNA unter Gleichgewichtsbedingungen in der geschlossenen Konformation vor, die durch die *kissing-loop*-Interaktion zwischen den terminalen *loops* von 5BSL3.2 (blau) und SL2 (rot) induziert wird (74, 75). Diese Konformation fördert die Translation der viralen Proteine und führt zur Destabilisierung von SL2, die eine effektive, zur Initiierung führende Bindung der viralen RdRP verhindert. (B) NF90-NF45 vermittelt durch seine RNA-Chaperon-Aktivität die Initiierung der (-)-Strang-RNA-Synthese durch die Umwandlung der RNA in die offene Konformation, welche die Translationsaktivität einschränkt, und durch die Ausbildung des SL2, der eine Initiierung der RdRP ermöglicht.

5BSL3.1_3'-UTR populiert, die einen spezifischen Schmelzpunkt von $T_M > 80$ °C aufwiesen. Daher wird nahe gelegt, dass i) die Induktion spezifischer Strukturelemente mit der Effizienz der RCA des jeweiligen Proteins korreliert, und ii) dass die beobachtete Stimulation der RdRP-Aktivität im RdRP-Assay mit der Präsenz dieser spezifischen Strukturelemente in Zusammenhang steht. Eine parallel durchgeführte Strukturanalyse der X-tail-RNA in Anwesenheit der verschiedenen Proteine konnte jedoch nicht ausgewertet werden, da ab ca. 50 °C starke Präzipitationen der Proteine auftraten. Diese Situation weist erneut darauf hin, dass bestimmte Strukturelemente in 5BSL3.1_3'-UTR essentiell für die Funktion von NF90wt-NF45 sind.

Um nun Hinweise zu erhalten, welche Strukturelemente von 5BSL3.1_3'-UTR durch NF90wt-NF45 tatsächlich induziert werden, wurden die erhaltenen Ergebnisse mit den Schmelzkurven und -punkten von 3'-Fragmenten von 5BSL3.1_3'-UTR verglichen (**Abb. 33**). Dieser Vergleich deutete an, dass es sich bei den durch NF90wt-NF45 induzierten Elementen in 5BSL3.1_3'-UTR um Strukturen des X-tail handelt. Insbesondere fällt dabei auf, dass der spezifische Schmelzpunkt von 5BSL3.1_3'-UTR bei $T_M > 80$ °C in Anwesenheit von NF90wt-NF45 mit der für SL1 des X-tail ermittelten Schmelztemperatur $T_M = 86$ °C korreliert. Somit scheint NF90wt-NF45 im Unterschied zu NF90 und NF90^{S651E}-NF45 die Struktur von SL1 zu induzieren. Dadurch werden möglicherweise auch SL2 und SL3 des X-tails ausgebildet. Dies wird dadurch unterstützt, dass die gesamte Transition von 5BSL3.1_3'-UTR in Anwesenheit von NF90wt-NF45 der Transition der RNA polyU, die nur die Strukturelemente des X-tails enthält, sehr ähnlich war. Insgesamt konnten somit mehrere Hinweise gewonnen werden, welche Faktoren mit dem stimulierenden Effekt von NF90wt-NF45 auf die RdRP-Aktivität auf 5BSL3.1_3'-UTR in Zusammenhang stehen: i) die 5BSL3-Region der RNA, ii) die RCA des Proteins und iii) die Induktion von Strukturelementen des X-tails.

Interessanterweise stellen Punkt i) und iii) auch zentrale Aspekte des präsentierten *riboswitch*-Modells dar. Unter Einbezug dieses Modells könnte demnach die Bindung von NF90wt-NF45 an 5BSL3.1_3'-UTR die *kissing-loop*-Interaktion zwischen 5BSL3.2 und SL2 perturbieren und folglich SL1 und damit SL2 des X-tails induzieren, die zusammen eine verbesserte Initiation der Polymerase ermöglichen (**Abb. 42**). Ein ähnliches Modell wurde von Oakland *et al.* für das Protein EWSR1 vorgeschlagen (126), das spezifisch an die offene Konformation der HCV-RNA assoziiert, folglich dieses Konformer populierte und so die Replikation stimuliert. Für NF90wt-NF45 kann allerdings vermutet werden, dass es die offene Konformation sowie die Struktur des X-tail aktiv induziert. Gründe hierfür sind, dass weder das NF90-Monomer noch die pseudophosphorylierte Komplex-Variante i) die Aktivität der RdRP stimulierten und ii) auch nicht die Strukturelemente der RNA mit dem spezifischen $T_M > 80$ °C induzierten. In diesem Zusammenhang kann die

These aufgestellt werden, dass die *in cellulo* beobachtete Stimulation der HCV-Replikation durch NF90 tatsächlich vom Heterodimer NF90-NF45 vermittelt wird. Des Weiteren kann daraus geschlossen werden, dass NF90-NF45 die Verteilung zwischen den beiden Konformeren der viralen RNA beeinflusst. Unter der Annahme, dass NF90wt-NF45 diese Funktion auch auf dem vollständigen viralen Genom übernimmt, könnte NF90-NF45 somit eine wichtige Rolle in der Organisation des viralen Lebenszyklus einnehmen, indem es basierend auf dem *riboswitch*-Modell einen Wechsel von viraler Translation zur RNA-Replikation vermittelt. Eine ähnliche Situation wurde bereits für EWSR1 beschrieben (126). Demnach liegt zu Beginn der viralen Infektion die HCV-RNA in der geschlossenen Konformation vor, die die Produktion viraler Proteine fördert (74) und durch Destabilisierung des X-tails die Replikation unterdrückt (75). NF90-NF45 liegt zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich kernständig vor (48,59), so dass das Konformationsgleichgewicht der viralen RNA auf Seite der geschlossenen Form verbleibt. Die zelluläre Immunantwort induziert im Verlauf der Infektion durch verschiedene Mechanismen eine Translokation von NF90-NF45 in das Cytoplasma der Zelle (16,48). Der nun cytoplasmatische Komplex induziert aufgrund dessen RCA die offene Konformation der viralen RNA. Daraus resultiert eine Reduktion der viralen Translation und eine Stimulation der Replikation (72-74,76). Es ist anzunehmen, dass eine Reihe weiterer zellulärer und viraler Faktoren an diesen Prozessen beteiligt sind. Außerdem deuten die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse an, dass bei diesen Prozessen der Phosphorylierungszustand von NF90-NF45 regulatorische Funktionen übernehmen könnte.

4.4.2 Die RNA-Chaperon-Aktivität von NF90-NF45 hat eine wichtige Funktion bei der Stabilisierung von mRNAs

Wie oben beschrieben, wurden Hinweise erhalten, dass die RCA von NF90wt-NF45 zur Wirtsfaktorfunktion des Proteins im HCV-Lebenszyklus beiträgt. Daher wurde auch die These verfolgt, dass die RCA von NF90 ebenfalls für dessen Hauptfunktion, die Stabilisierung von mRNAs (s. 1.2.1), von zentraler Bedeutung ist. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde die Interaktion von NF90 mit der VEGF-mRNA gewählt (**Abb. 34A**), Grundlage dieser Auswahl war, dass NF90 an ein bestimmtes RNA-Element bindet (24), das HsR-Element, für das gezeigt werden konnte, dass es ähnlich wie 5BSL3.2 der HCV-RNA Teil eines *riboswitch* ist (44). Dabei wird eine *translation-permissive*- und *translation-silencing*-Konformation unterschieden, bei denen ein bestimmter *stem-loop* des HsR-Elements (HsR-SL) vollständig bzw. nur partiell ausgebildet ist (s. 1.2.1). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun ein Zusammenhang zwischen der dokumentierten Funktion von NF90 und der HsR-SL-Konformation verfolgt.

Die durchgeführten Strukturanalysen des HsR-SL bestätigten zunächst, dass unter Assay-Bedingungen mindestens zwei Konformationen des HsR-SL vorlagen. Die Konformere waren durch die Ausbildung von ca. 13 bzw. 18 bp charakterisiert. Entsprechend der *mfold*-Vorhersage wären 24 bp für einen vollständigen HsR-SL zu erwarten. Die Anzahl der Basenpaare des HsR-SL aus den Schmelzkurven wurde anhand von Durchschnittswerten von Schmelzenthalpien von einzelnen Basenpaaren berechnet. Aus Differenzen zwischen dem verwendeten und tatsächlich vorliegenden Wert resultieren daher Abweichungen in der Anzahl der Basenpaare. Folglich wurde angenommen, dass die 13 bp einem partiell ausgebildetem HsR-SL und die 18 bp dem vollständig ausgebildetem HsR-SL entsprechen und damit die *translation-silencing*- bzw. *translation-permissive*-Konformation widerspiegeln (**Abb. 43**).

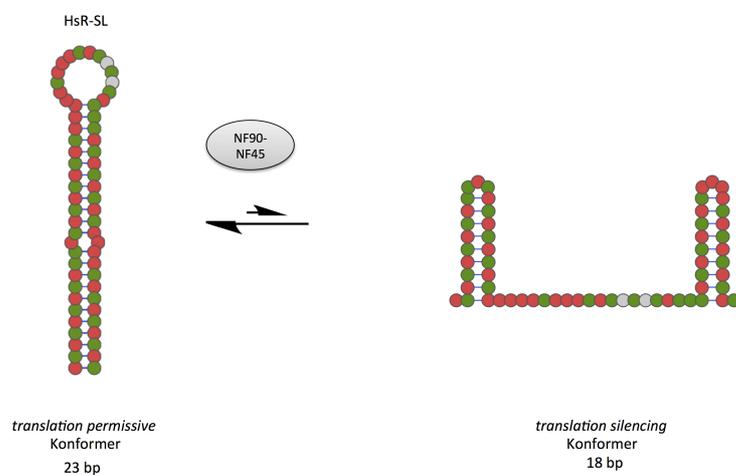


Abbildung 43: NF90-NF45 beeinflusst die Konformation des HsR-SL.

Schematische Darstellung der Konformationsänderungen des zentralen *stem-loop* der AU-reichen HsR-Region (HsR-SL, A – rot, U – grün, G/C grau) in Anwesenheit von NF90-NF45. In der *translation-permissive*-Konformation ist der HsR-SL voll ausgebildet, was die Translation fördert. Im *translation-silencing*-Konformer ist der HsR-SL nicht präsent. Diese Konformation inhibiert die Translation der VEGF-mRNA. NF90-NF45 induziert die *translation-permissive*-Konformation und könnte so die erhöhte Stabilität sowie Translationsaktivität der VEGF-mRNA *in cellulo* vermitteln. Konformationsmodell modifiziert nach Ray *et al.* (44).

In Anwesenheit von NF90-NF45 zeigte sich nun eine Strukturveränderung von HsR-SL, die zu einer thermodynamischen Stabilisierung der RNA führte (**Abb. 34**). Die durch NF90-NF45 induzierte Struktur von HsR-SL korrelierte mit dem 18 bp Konformer. Daraus kann geschlossen werden, dass NF90wt-NF45 die *translation-permissive*-Konformation des SL induziert (**Abb. 43**). Diese Feststellung ist in Übereinstimmung mit Beobachtungen aus der Literatur. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von NF90 an VEGF-mRNA unter Hypoxie zu einer erhöhten Translationsaktivität und erhöhten Stabilität der mRNA führt (24). Unter Berücksichtigung des *riboswitch*-Modells korreliert diese Situation mit der Präsenz der thermodynamisch stabileren *translation-permissive*-Konformation des HsR-Elements (44). Daher legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahe, dass die beobachtete Funktion von NF90 bzw. NF90-NF45 bei der Interaktion mit der VEGF-mRNA *in cellulo* auf die Induktion der *translation-permissive*-Konformation des HsR-Elements zurückzuführen ist.

Strukturveränderungen von HsR-SL nach Komplementationen mit NF90wt bzw. NF90^{S651E}-NF45 konnten nicht ausgewertet werden, da Präzipitationen auftraten. Daher kann vermutet werden, dass NF90wt-NF45 bestimmte Eigenschaften besitzt, die essentiell für die thermodynamische Stabilität der HsR-Protein-Interaktion sind. Dabei könnte es sich um die RCA des Komplexes handeln.

Am Beispiel des HsR-Elements der VEGF-mRNA können eine Reihe an weiteren putativen Konsequenzen dieser NF90-NF45 vermittelten Konformationsänderung und damit verbundenen Stabilisierung der VEGF-mRNA *in vivo* diskutiert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das HsR-Element der VEGF-mRNA eine Zielsequenz von mindestens vier miRNAs darstellt (179). Die identifizierten miRNAs führen unter normoxischen Bedingungen zu einer effektiven Inhibierung der Translation der VEGF-mRNA. Dies könnte auf die Präsenz der *translation-silencing*-Konformation des HsR-Elements zurückzuführen sein, da die Bindestelle der miRNAs in dieser Struktur zugänglich ist. Unter Hypoxie induziert NF90wt-NF45 durch Bindung an das HsR-Element der VEGF-mRNA die *translation-permissive*-Konformation, bei der die Bindestelle der spezifischen miRNAs nicht zugänglich ist. Daraus ergibt sich eine erhöhte Translationsaktivität auf der mRNA. Folglich könnte die Bindung von NF90-NF45 an die VEGF-mRNA neben den beschriebenen Funktionen auch zusätzlich in die miRNA-vermittelte Regulation der VEGF-Expression eingreifen. Ein entsprechendes Szenario wurde bereits von Jafarifar *et al.* für hnRNP L diskutiert (179). Darüber hinaus könnte die Konformationsänderung des HsR-Elements durch die Interaktion mit NF90-NF45 allgemein mit der Bindung anderer Proteinfaktoren an diese Region interferieren und somit deren vermittelnde Funktion beeinflussen.

Viele zelluläre und virale mRNAs enthalten regulatorische Strukturelemente, wie das HsR-Element der VEGF-mRNA oder den 5BSL3.2 der HCV-RNA (26,180). Folglich könnte die Assoziation von NF90-NF45 an solche Strukturelemente von RNAs ähnliche Effekte hervorrufen, wie sie in den vorherigen Abschnitten diskutiert wurden. Demnach kann das Protein durch seine spezifische RNA-*annealing*-Aktivität und hohe RNA-Bindungsaffinität *riboswitch*- oder andere RNA-Elemente in thermodynamisch stabile Konformere überführen und damit entsprechende Funktionen vermitteln. RNA-Chaperone besitzen aber in der Regel keine so hohe Affinität wie NF90 zu der RNA-Struktur, die aus der RNA-Protein-Interaktion hervorgeht. Die sehr hohe Affinität von NF90-NF45 zur produzierten dsRNA könnte allerdings zur Funktion des Komplexes beitragen. Demnach bleibt NF90-NF45 nach dem *chaperoning* zum Großteil RNA gebunden. Das würde eine thermodynamische Stabilisierung der RNA und die mit der RNA-Konformation verbundene Funktion der RNA solange aufrechterhalten wie die Bindung von NF90-NF45 an die RNA gewährleistet ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit allgemeine Funktionsweisen von NF90-NF45 auf. Die Architektur von NF90 ermöglicht eine starke Kooperativität aller RNA-bindenden Motive und ermöglicht somit eine spezifische Erkennung und Diskriminierung struktureller Eigenschaften des RNA-Substrats. Die differentielle RNA-Bindung des Heterodimers unterstützt eine RNA-Chaperon-Aktivität, welche zu Konformationsänderungen der gebundenen RNA führt. Damit ist das Heterodimer in der Lage, inter- oder intramolekulare RNA-RNA-Wechselwirkungen zu beeinflussen. Je nach Funktion der RNA-Struktur resultieren daraus positive oder negative Auswirkungen für Prozesse, in der diese RNA-Struktur involviert ist. Post-translationale Modifikationen, Proteininteraktionspartner und die RNA-Konformation selbst verändern dabei die Eigenschaften der differentiellen RNA-Bindung und somit der Spezifität von NF90. Dieses Konzept liefert eine Grundlage, die Multifunktionalität von NF90 zu erklären.

4.5 Ausblick

Unter Verwendung der RNA-Substrate 5BSL3.1_3'-UTR der HCV-RNA und des HsR-Elements der VEGF-mRNA konnte für NF90-NF45 nachgewiesen werden, dass der Komplex mit dessen RNA-Chaperon-Aktivität Konformationsänderungen der assoziierten RNAs hervorruft. In Zusammenhang mit den für diese RNAs beschriebenen *riboswitch*-Modellen (44,75) sollte zunächst geklärt werden, welche Konformationen der RNAs in Anwesenheit von NF90-NF45 tatsächlich vorliegen. Für diese Strukturanalyse bietet sich die SHAPE-Methode (*selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*) an, mit der die zeitabhängige Faltung der RNA mit Nukleotidauflösung verfolgt werden kann (181,182). Transiente Konformationsänderung der RNAs in Anwesenheit von NF90-NF45 könnten durch Messungen der Fluoreszenz-Lebensdauer entsprechend Fluorophor-markierter RNAs aufgelöst werden. Diese Strategie könnten einen Einblick liefern, wie NF90-NF45 die Konformationsänderungen von HsR-Element und 5BSL3.1_3'-UTR mechanistisch realisiert.

In diesem Zusammenhang sollten Experimente die Rolle von NF90-NF45 im Lebenszyklus von HCV weiter verfolgen. Entsprechend des von Tuplin *et al.* vorgeschlagenen *riboswitch*-Modells, vermitteln die Konformere der viralen RNA auch unterschiedliche Aktivitäten der IRES-vermittelte Translation der RNA (74,75). Es konnte bereits eine Beteiligung von NF90 in der IRES-abhängigen Translation verschiedener zellulärer mRNAs nachgewiesen werden (183). Daher sollte die Funktion von NF90-NF45 als *host factor* des Hepatitis C-Virus innerhalb der viralen Translation noch einmal analysiert werden, auch wenn Li *et al.* keinen Einfluss einer NF90-Depletion auf die virale Translation *in cellulo* feststellen konnten (59). Weil sich IRES auch aus komplexen RNA-Strukturen zusammensetzen, kann postuliert werden, dass die RNA-Chaperon-

Aktivität von NF90-NF45 auch an Konformationsänderungen dieser Strukturen beteiligt ist.

In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erhebliche Veränderungen der Eigenschaften von NF90 durch die Heterodimerisierung mit NF45 deutlich. In weiteren Experimenten sollte daher die Relevanz dieser Beobachtung *in vivo* insofern adressiert werden, welche spezifischen Funktionen die Spezies NF90-, NF45-Monomer und das Heterodimer NF90-NF45 tatsächlich *in vivo* einnehmen. Dabei ist vor allem interessant, welche Faktoren die Komplexbildung von NF90-NF45 und damit dessen Funktion *in vivo* beeinflussen. Dieser Sachverhalt ist bisher ungeklärt.

Des Weiteren sollte die vermutete Kooperativität der RNA-bindenden Motive von NF90 bei der RNA-Bindung durch strukturaufklärende Methoden unterstützt werden. Bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass der RNA-gebundene Zustand des Komplexes gegenüber dem RNA-freien Zustand erheblich stabilisiert ist (Daten nicht gezeigt). Daher sollten Kristallisationsversuche des Heterodimers NF90-NF45 im ssRNA- und dsRNA-gebundenen Zustand durchgeführt werden. In Korrelation zum Homologie-Modell (s. Anhang 7.4) könnten diese Daten Struktur-Funktionsbeziehungen des Proteins offenlegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isoform NF90 des *ILF3*-Gens charakterisiert. Interessanterweise soll die Isoform NF110 z.T. andere biologische Funktionen übernehmen (17). Daher bietet sich an, NF110 und NF110-NF45 in den wichtigsten Eigenschaften wie thermodynamische Stabilität, RNA-Bindung und RNA-Chaperon-Aktivität vergleichend zur NF90-Isoform zu analysieren.

V. ZUSAMMENFASSUNG

NF90 ist ein multifunktionales, zelluläres RNA-bindendes Protein, das in vielen Ebenen des RNA-Metabolismus involviert ist. Dabei liegt das Protein *in cellulo* in der Regel im Komplex mit NF45 vor. In der vorliegenden Arbeit konnten zentrale Eigenschaften von NF90 und NF90-NF45 charakterisiert und eine RNA-Chaperon-Aktivität identifiziert werden, mit der die Proteine RNA-Konformationen beeinflussen können. Es wurden Hinweise erhalten, dass die Konformationsänderung von RNA eine zentrale Rolle der biologischen Funktion der Proteine darstellen könnte.

1. NF90 und NF45 (*Homo sapiens*) konnten durch heterologe Genexpression in *E. coli* hergestellt und aus *inclusion bodies* unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden. Es wurde ein Renaturierungsprotokoll etabliert und der Oligomierzustand als Monomer definiert.
2. Zur Charakterisierung der RNA-Bindung der Proteine wurde eine Strategie etabliert, die eine Unterscheidung zwischen der RNA-Affinität und dem Bindungsmodus (Bedeutung ionischer und nicht-ionische Wechselwirkungen) ermöglicht. Diese Analyse basiert auf der Auswertung von linearen freien Enthalpiebeziehungen der RNA-Bindung unter der Störung ionischer Wechselwirkungen durch NaCl.
3. Die Analyse des RNA-Bindungsmodus von NF90 belegte eine differentielle RNA-Bindung des Proteins, das zwischen Strukturmerkmalen der RNA, wie einzel-, doppelsträngig, und Länge der RNA, unterscheiden kann.
4. Die Charakterisierung verschiedener NF90-Varianten, die Mutationen in den RNA-bindenden Motive (RbMs) enthielten, belegte unterschiedliche Funktionen dieser Motive innerhalb des Proteins: dsRBM1 trägt kaum zur RNA-Bindung und dsRBM2 hauptsächlich zur Bindung von dsRNA bei. Der C-Terminus (vor allem das RGG-Motiv) ist essentiell für die ssRNA-Bindung.
5. Die Kinetik der RNA-Bindung lässt vermuten, dass NF90 die Konformation der gebundenen RNA in Abhängigkeit vom C-Terminus verändert.
6. Die Charakterisierung der Variante NF90^{F432, 559A} und der pseudophosphorylierten Variante NF90^{S651E} legte nahe, dass die RbMs von NF90 kooperativ an dasselbe RNA-Molekül binden. Dabei beeinflusste die Pseudophosphorylierung des RGG-Motivs von NF90 die gesamte RNA-Bindung des Proteins
7. Es wurde ein Protokoll zur Rekonstitution des NF90-NF45 Komplexes etabliert, der als Heterodimer definiert werden konnte.

8. Die thermodynamischen Stabilitäten von NF90, NF45 und NF90-NF45 demonstrierten eine Stabilisierung von NF90 und NF45 infolge der Heterodimerisierung.
9. Analysen der RNA-Bindung von NF90-NF45 belegten verbesserte RNA-Affinitäten des Komplexes im Vergleich zum Monomer. Durch die Analyse von Komplex-Varianten konnte das auf eine NF45-abhängige Reorientierung der RbMs von NF90 zurückgeführt werden, die eine gesteigerte Kooperativität der RbMs von NF90 ermöglicht. Die Analyse der RNA-Bindungsmodi des Heterodimers zeigte, dass auch bei der RNA-Bindung des Komplexes eine Unterscheidung von Strukturmerkmalen der RNA erfolgt.
10. Es wurde eine RNA-Chaperon-Aktivität (RCA) von NF90 bzw. NF90-NF45 identifiziert, bei der die Proteine das RNA-*annealing* beschleunigen. Dabei ist das Heterodimer um Faktor 13-70 effizienter als NF90 Monomer. Es wurde festgestellt, dass die strukturelle Organisation der RNA die Aktivität von NF90-NF45 und NF90 beeinflusst. Anhand dieser Analysen konnte NF90 bzw. NF90-NF45 als RNA-Chaperon klassifiziert werden.
11. Es wird eine Beteiligung der C-terminalen Region von NF90 in der Komplexbildung mit NF45 und in der RNA Chaperon-Aktivität belegt.
12. Mechanistische Untersuchungen zur RCA von NF90 weisen darauf hin, dass während der proteinkatalysierten RNA-*annealing*-Reaktion eine *annealing*-kompetenten Konformation der RNA induziert wird, die zur Beschleunigung der Reaktion in Anwesenheit des Proteins beiträgt. Es wurden Hinweise erhalten, dass der C-Terminus von NF90 dabei wichtig ist.
13. Die biologische Relevanz der RCA konnte in mehreren Untersuchungen belegt werden. In einem *in-vitro*-Assay, in dem der erste Schritt des HCV-Replikationsprozesses nachgestellt wurde, konnte gezeigt werden, dass NF90-NF45 die Aktivität der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase stimuliert. Die Stimulation konnte ausschließlich durch NF90wt-NF45 und nur auf dem Templat 5BSL3.1_3'-UTR beobachtet werden, das essentielle Replikationssignale enthält. Weiterführende Analysen belegten einen Einfluss des Heterodimers auf die Konformation dieses viralen Templats und eines weiteren nativen Substrats (VEGF).
14. Die Untersuchungen zur biologischen Relevanz der RCA geben Hinweise, wie NF90 bzw. NF90-NF45 als RBPs, ihre Funktionen *in vivo* vermitteln könnten. NF90 bzw. NF90-NF45 führen durch die RCA zu Konformationsänderungen der gebundenen RNA. Die Proteine können über ihre RCA somit Prozesse beeinflussen, die durch die Struktur von RNA-Elementen reguliert werden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Saunders, L. R., Perkins, D. J., Balachandran, S., Michaels, R., Ford, R., Mayeda, A., and Barber, G. N. (2001) Characterization of two evolutionarily conserved, alternatively spliced nuclear phosphoproteins, NFAR-1 and -2, that function in mRNA processing and interact with the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *The Journal of biological chemistry* **276**, 32300-32312
2. Duchange, N., Pidoux, J., Camus, E., and Sauvaget, D. (2000) Alternative splicing in the human interleukin enhancer binding factor 3 (ILF3) gene. *Gene* **261**, 345-353
3. Saunders, L. R., Jurecic, V., and Barber, G. N. (2001) The 90- and 110-kDa human NFAR proteins are translated from two differentially spliced mRNAs encoded on chromosome 19p13. *Genomics* **71**, 256-259
4. Wolkowicz, U. M., and Cook, A. G. (2012) NF45 dimerizes with NF90, Zfr and SPNR via a conserved domain that has a nucleotidyltransferase fold. *Nucleic acids research* **40**, 9356-9368
5. Shim, J., Lim, H., J, R. Y., and Karin, M. (2002) Nuclear export of NF90 is required for interleukin-2 mRNA stabilization. *Molecular cell* **10**, 1331-1344
6. Nakamura, N., Yamauchi, T., Hiramoto, M., Yuri, M., Naito, M., Takeuchi, M., Yamanaka, K., Kita, A., Nakahara, T., Kinoyama, I., Matsuhisa, A., Kaneko, N., Koutoku, H., Sasamata, M., Yokota, H., Kawabata, S., and Furuichi, K. (2012) Interleukin enhancer-binding factor 3/NF110 is a target of YM155, a suppressant of survivin. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **11**, M111 013243
7. Shiina, N., and Nakayama, K. (2014) RNA Granule Assembly and Disassembly Modulated by Nuclear Factor Associated with Double-stranded RNA 2 and Nuclear Factor 45. *The Journal of biological chemistry* **289**, 21163-21180
8. Marcoulatos, P., Koussidis, G., Mamuris, Z., Velissariou, V., and Vamvakopoulos, N. C. (1996) Mapping interleukin enhancer binding factor 2 gene (ILF2) to human chromosome 1 (1q11-qter and 1p11-p12) by polymerase chain reaction amplification of human-rodent somatic cell hybrid DNA templates. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **16**, 1035-1038
9. Zhao, G., Shi, L., Qiu, D., Hu, H., and Kao, P. N. (2005) NF45/ILF2 tissue expression, promoter analysis, and interleukin-2 transactivating function. *Experimental cell research* **305**, 312-323
10. Corthesy, B., and Kao, P. N. (1994) Purification by DNA affinity chromatography of two polypeptides that contact the NF-AT DNA binding site in the interleukin 2 promoter. *The Journal of biological chemistry* **269**, 20682-20690
11. Kao, P. N., Chen, L., Brock, G., Ng, J., Kenny, J., Smith, A. J., and Corthesy, B. (1994) Cloning and expression of cyclosporin A- and FK506-sensitive nuclear factor of activated T-cells: NF45 and NF90. *The Journal of biological chemistry* **269**, 20691-20699
12. Karmakar, S., Mahajan, M. C., Schulz, V., Boyapaty, G., and Weissman, S. M. (2010) A multiprotein complex necessary for both transcription and DNA replication at the beta-globin locus. *The EMBO journal* **29**, 3260-3271
13. Kiesler, P., Haynes, P. A., Shi, L., Kao, P. N., Wysocki, V. H., and Vercelli, D. (2010) NF45 and NF90 regulate HS4-dependent interleukin-13 transcription in T cells. *The Journal of biological chemistry* **285**, 8256-8267
14. Sakamoto, S., Morisawa, K., Ota, K., Nie, J., and Taniguchi, T. (1999) A binding protein to the DNase I hypersensitive site II in HLA-DR alpha gene was identified as NF90. *Biochemistry* **38**, 3355-3361
15. Rigo, F., Hua, Y., Chun, S. J., Prakash, T. P., Krainer, A. R., and Bennett, C. F. (2012) Synthetic oligonucleotides recruit ILF2/3 to RNA transcripts to modulate splicing. *Nature chemical biology* **8**, 555-561
16. Pfeifer, I., Elsby, R., Fernandez, M., Faria, P. A., Nussenzveig, D. R., Lossos, I. S., Fontoura, B. M., Martin, W. D., and Barber, G. N. (2008) NFAR-1 and -2 modulate translation and are required for efficient host defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 4173-4178
17. Castella, S., Bernard, R., Corno, M., Fradin, A., and Larcher, J. C. (2015) Ilf3 and NF90 functions in RNA biology. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* **6**, 243-256

18. Masuda, K., Kuwano, Y., Nishida, K., Rokutan, K., and Imoto, I. (2013) NF90 in posttranscriptional gene regulation and microRNA biogenesis. *International journal of molecular sciences* **14**, 17111-17121
19. Abdelmohsen, K. (2012) Modulation of Gene Expression by RNA Binding Proteins: mRNA Stability and Translation. in *Binding Protein* (Abdelmohsen, K. ed.), InTech. pp
20. Pullmann, R., Jr., Kim, H. H., Abdelmohsen, K., Lal, A., Martindale, J. L., Yang, X., and Gorospe, M. (2007) Analysis of turnover and translation regulatory RNA-binding protein expression through binding to cognate mRNAs. *Molecular and cellular biology* **27**, 6265-6278
21. Shi, L., Zhao, G., Qiu, D., Godfrey, W. R., Vogel, H., Rando, T. A., Hu, H., and Kao, P. N. (2005) NF90 regulates cell cycle exit and terminal myogenic differentiation by direct binding to the 3'-untranslated region of MyoD and p21WAF1/CIP1 mRNAs. *The Journal of biological chemistry* **280**, 18981-18989
22. Mackereth, C. D., and Sattler, M. (2012) Dynamics in multi-domain protein recognition of RNA. *Current opinion in structural biology* **22**, 287-296
23. Kuwano, Y., Pullmann, R., Jr., Marasa, B. S., Abdelmohsen, K., Lee, E. K., Yang, X., Martindale, J. L., Zhan, M., and Gorospe, M. (2010) NF90 selectively represses the translation of target mRNAs bearing an AU-rich signature motif. *Nucleic acids research* **38**, 225-238
24. Vumbaca, F., Phoenix, K. N., Rodriguez-Pinto, D., Han, D. K., and Claffey, K. P. (2008) Double-stranded RNA-binding protein regulates vascular endothelial growth factor mRNA stability, translation, and breast cancer angiogenesis. *Molecular and cellular biology* **28**, 772-783
25. Ross, J. (1995) mRNA stability in mammalian cells. *Microbiological reviews* **59**, 423-450
26. Chen, C. Y., and Shyu, A. B. (1995) AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in biochemical sciences* **20**, 465-470
27. Barreau, C., Paillard, L., and Osborne, H. B. (2005) AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic acids research* **33**, 7138-7150
28. Pei, Y., Zhu, P., Dang, Y., Wu, J., Yang, X., Wan, B., Liu, J. O., Yi, Q., and Yu, L. (2008) Nuclear export of NF90 to stabilize IL-2 mRNA is mediated by AKT-dependent phosphorylation at Ser647 in response to CD28 costimulation. *J Immunol* **180**, 222-229
29. Zhu, P., Jiang, W., Cao, L., Yu, W., Pei, Y., Yang, X., Wan, B., Liu, J. O., Yi, Q., and Yu, L. (2010) IL-2 mRNA stabilization upon PMA stimulation is dependent on NF90-Ser647 phosphorylation by protein kinase Cbeta1. *J Immunol* **185**, 5140-5149
30. Shi, L., Godfrey, W. R., Lin, J., Zhao, G., and Kao, P. N. (2007) NF90 regulates inducible IL-2 gene expression in T cells. *The Journal of experimental medicine* **204**, 971-977
31. Corso, C., Pisapia, L., Citro, A., Cicatiello, V., Barba, P., Cigliano, L., Abrescia, P., Maffei, A., Manco, G., and Del Pozzo, G. (2011) EBP1 and DRBP76/NF90 binding proteins are included in the major histocompatibility complex class II RNA operon. *Nucleic acids research* **39**, 7263-7275
32. Tran, H., Maurer, F., and Nagamine, Y. (2003) Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Molecular and cellular biology* **23**, 7177-7188
33. Yao, P., Potdar, A. A., Ray, P. S., Eswarappa, S. M., Flagg, A. C., Willard, B., and Fox, P. L. (2013) The HILDA complex coordinates a conditional switch in the 3'-untranslated region of the VEGFA mRNA. *PLoS biology* **11**, e1001635
34. Larcher, J. C., Gasmi, L., Viranaicken, W., Edde, B., Bernard, R., Ginzburg, I., and Denoulet, P. (2004) Ilf3 and NF90 associate with the axonal targeting element of Tau mRNA. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 1761-1763
35. Tominaga-Yamanaka, K., Abdelmohsen, K., Martindale, J. L., Yang, X., Taub, D. D., and Gorospe, M. (2012) NF90 coordinately represses the senescence-associated secretory phenotype. *Aging* **4**, 695-708
36. Kuwano, Y., Kim, H. H., Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Jr., Martindale, J. L., Yang, X., and Gorospe, M. (2008) MKP-1 mRNA stabilization and translational control by RNA-binding proteins HuR and NF90. *Molecular and cellular biology* **28**, 4562-4575
37. Xu, Y. H., and Grabowski, G. A. (1999) Molecular cloning and characterization of a translational inhibitory protein that binds to coding sequences of human acid beta-glucosidase and other mRNAs. *Molecular genetics and metabolism* **68**, 441-454
38. Hoque, M., Shamanna, R. A., Guan, D., Pe'ery, T., and Mathews, M. B. (2011) HIV-1 replication and latency are regulated by translational control of cyclin T1. *Journal of molecular biology* **410**, 917-932

39. Hu, Q., Lu, Y. Y., Noh, H., Hong, S., Dong, Z., Ding, H. F., Su, S. B., and Huang, S. (2013) Interleukin enhancer-binding factor 3 promotes breast tumor progression by regulating sustained urokinase-type plasminogen activator expression. *Oncogene* **32**, 3933-3943
40. Oliveira, C. C., and McCarthy, J. E. (1995) The relationship between eukaryotic translation and mRNA stability. A short upstream open reading frame strongly inhibits translational initiation and greatly accelerates mRNA degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **270**, 8936-8943
41. Arcondeguy, T., Lacazette, E., Millevoi, S., Prats, H., and Touriol, C. (2013) VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic acids research* **41**, 7997-8010
42. Claffey, K. P., Shih, S. C., Mullen, A., Dziennis, S., Cusick, J. L., Abrams, K. R., Lee, S. W., and Detmar, M. (1998) Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. *Molecular biology of the cell* **9**, 469-481
43. Goldberg-Cohen, I., Furneaux, H., and Levy, A. P. (2002) A 40-bp RNA element that mediates stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by HuR. *The Journal of biological chemistry* **277**, 13635-13640
44. Ray, P. S., Jia, J., Yao, P., Majumder, M., Hatzoglou, M., and Fox, P. L. (2009) A stress-responsive RNA switch regulates VEGFA expression. *Nature* **457**, 915-919
45. Parker, L. M., Fierro-Monti, I., and Mathews, M. B. (2001) Nuclear factor 90 is a substrate and regulator of the eukaryotic initiation factor 2 kinase double-stranded RNA-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **276**, 32522-32530
46. Garcia, M. A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C., and Esteban, M. (2006) Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **70**, 1032-1060
47. Wen, X., Huang, X., Mok, B. W., Chen, Y., Zheng, M., Lau, S. Y., Wang, P., Song, W., Jin, D. Y., Yuen, K. Y., and Chen, H. (2014) NF90 Exerts Antiviral Activity through Regulation of PKR Phosphorylation and Stress Granules in Infected Cells. *J Immunol*
48. Harashima, A., Guettouche, T., and Barber, G. N. (2010) Phosphorylation of the NFAR proteins by the dsRNA-dependent protein kinase PKR constitutes a novel mechanism of translational regulation and cellular defense. *Genes & development* **24**, 2640-2653
49. Patel, R. C., Stanton, P., and Sen, G. C. (1996) Specific mutations near the amino terminus of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) differentially affect its double-stranded RNA binding and dimerization properties. *The Journal of biological chemistry* **271**, 25657-25663
50. Liao, H. J., Kobayashi, R., and Mathews, M. B. (1998) Activities of adenovirus virus-associated RNAs: purification and characterization of RNA binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 8514-8519
51. Shin, H. J., Kim, S. S., Cho, Y. H., Lee, S. G., and Rho, H. M. (2002) Host cell proteins binding to the encapsidation signal epsilon in hepatitis B virus RNA. *Archives of virology* **147**, 471-491
52. Merrill, M. K., Dobrikova, E. Y., and Gromeier, M. (2006) Cell-type-specific repression of internal ribosome entry site activity by double-stranded RNA-binding protein 76. *Journal of virology* **80**, 3147-3156
53. Merrill, M. K., and Gromeier, M. (2006) The double-stranded RNA binding protein 76:NF45 heterodimer inhibits translation initiation at the rhinovirus type 2 internal ribosome entry site. *Journal of virology* **80**, 6936-6942
54. Krasnoselskaya-Riz, I., Spruill, A., Chen, Y. W., Schuster, D., Teslovich, T., Baker, C., Kumar, A., and Stephan, D. A. (2002) Nuclear factor 90 mediates activation of the cellular antiviral expression cascade. *AIDS research and human retroviruses* **18**, 591-604
55. Urcuqui-Inchima, S., Castano, M. E., Hernandez-Verdun, D., St-Laurent, G., 3rd, and Kumar, A. (2006) Nuclear Factor 90, a cellular dsRNA binding protein inhibits the HIV Rev-export function. *Retrovirology* **3**, 83
56. Wang, P., Song, W., Mok, B. W., Zhao, P., Qin, K., Lai, A., Smith, G. J., Zhang, J., Lin, T., Guan, Y., and Chen, H. (2009) Nuclear factor 90 negatively regulates influenza virus replication by interacting with viral nucleoprotein. *Journal of virology* **83**, 7850-7861
57. Gomila, R. C., Martin, G. W., and Gehrke, L. (2011) NF90 binds the dengue virus RNA 3' terminus and is a positive regulator of dengue virus replication. *PLoS one* **6**, e16687
58. Isken, O., Baroth, M., Grassmann, C. W., Weinlich, S., Ostareck, D. H., Ostareck-Lederer, A., and Behrens, S. E. (2007) Nuclear factors are involved in hepatitis C virus RNA replication. *RNA* **13**, 1675-1692

59. Li, Y., Masaki, T., Shimakami, T., and Lemon, S. M. (2014) hnRNP L and NF90 Interact with Hepatitis C Virus 5'-Terminal Untranslated RNA and Promote Efficient Replication. *Journal of virology* **88**, 7199-7209
60. Isken, O., Grassmann, C. W., Sarisky, R. T., Kann, M., Zhang, S., Grosse, F., Kao, P. N., and Behrens, S. E. (2003) Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus. *The EMBO journal* **22**, 5655-5665
61. Isken, O., Grassmann, C. W., Yu, H., and 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**, 1637-1652
62. Lindenbach, B. D., Thiel, H.J. und Rice, C.M. (2007) Flaviviridae: The viruses and their replication. in *Fields Virology* (Howley, D. M. K. a. P. M. ed.), 5th Ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp
63. Shi, S. T., and Lai, M. M. C. (2006) HCV 5' and 3'UTR: When Translation Meets Replication. in *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology* (Tan, S. L. ed.), Norfolk (UK). pp
64. Jackson, R. J., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 113-127
65. Scheel, T. K., and Rice, C. M. (2013) Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nature medicine* **19**, 837-849
66. Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C. M. (2007) Replication of hepatitis C virus. *Nature reviews. Microbiology* **5**, 453-463
67. Behrens, S. E., Tomei, L., and De Francesco, R. (1996) Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *The EMBO journal* **15**, 12-22
68. Sagan, S. M., Chahal, J., and Sarnow, P. (2015) cis-Acting RNA elements in the hepatitis C virus RNA genome. *Virus research*
69. Wang, C., Sarnow, P., and Siddiqui, A. (1993) Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *Journal of virology* **67**, 3338-3344
70. Friebe, P., and Bartenschlager, R. (2002) Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *Journal of virology* **76**, 5326-5338
71. Bradrick, S. S., Walters, R. W., and Gromeier, M. (2006) The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase. *Nucleic acids research* **34**, 1293-1303
72. Murayama, A., Weng, L., Date, T., Akazawa, D., Tian, X., Suzuki, T., Kato, T., Tanaka, Y., Mizokami, M., Wakita, T., and Toyoda, T. (2010) RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLoS pathogens* **6**, e1000885
73. Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J. P., and Bartenschlager, R. (2005) Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *Journal of virology* **79**, 380-392
74. Tuplin, A., Struthers, M., Cook, J., Bentley, K., and Evans, D. J. (2015) Inhibition of HCV translation by disrupting the structure and interactions of the viral CRE and 3' X-tail. *Nucleic acids research* **43**, 2914-2926
75. Tuplin, A., Struthers, M., Simmonds, P., and Evans, D. J. (2012) A twist in the tail: SHAPE mapping of long-range interactions and structural rearrangements of RNA elements involved in HCV replication. *Nucleic acids research* **40**, 6908-6921
76. You, S., Stump, D. D., Branch, A. D., and Rice, C. M. (2004) A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of virology* **78**, 1352-1366
77. Ahlquist, P., Noueiry, A. O., Lee, W. M., Kushner, D. B., and Dye, B. T. (2003) Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *Journal of virology* **77**, 8181-8186
78. Niepmann, M. (2013) Hepatitis C virus RNA translation. *Current topics in microbiology and immunology* **369**, 143-166
79. Lohmann, V. (2013) Hepatitis C virus RNA replication. *Current topics in microbiology and immunology* **369**, 167-198
80. Villordo, S. M., and Gamarnik, A. V. (2009) Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus research* **139**, 230-239
81. St Johnston, D., Brown, N. H., Gall, J. G., and Jantsch, M. (1992) A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 10979-10983

82. Bycroft, M., Grunert, S., Murzin, A. G., Proctor, M., and St Johnston, D. (1995) NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* staufen protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *The EMBO journal* **14**, 3563-3571
83. Kharrat, A., Macias, M. J., Gibson, T. J., Nilges, M., and Pastore, A. (1995) Structure of the dsRNA binding domain of *E. coli* RNase III. *The EMBO journal* **14**, 3572-3584
84. Masliah, G., Barraud, P., and Allain, F. H. (2013) RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **70**, 1875-1895
85. Gan, J., Tropea, J. E., Austin, B. P., Court, D. L., Waugh, D. S., and Ji, X. (2006) Structural insight into the mechanism of double-stranded RNA processing by ribonuclease III. *Cell* **124**, 355-366
86. Ryter, J. M., and Schultz, S. C. (1998) Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *The EMBO journal* **17**, 7505-7513
87. Stefl, R., Oberstrass, F. C., Hood, J. L., Jourdan, M., Zimmermann, M., Skrisovska, L., Maris, C., Peng, L., Hofr, C., Emeson, R. B., and Allain, F. H. (2010) The solution structure of the ADAR2 dsRBM-RNA complex reveals a sequence-specific readout of the minor groove. *Cell* **143**, 225-237
88. Wu, H., Henras, A., Chanfreau, G., and Feigon, J. (2004) Structural basis for recognition of the AGNN tetraloop RNA fold by the double-stranded RNA-binding domain of Rnt1p RNase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8307-8312
89. Krovat, B. C., and Jantsch, M. F. (1996) Comparative mutational analysis of the double-stranded RNA binding domains of *Xenopus laevis* RNA-binding protein A. *The Journal of biological chemistry* **271**, 28112-28119
90. Hitti, E. G., Sallacz, N. B., Schoft, V. K., and Jantsch, M. F. (2004) Oligomerization activity of a double-stranded RNA-binding domain. *FEBS letters* **574**, 25-30
91. Patel, R. C., and Sen, G. C. (1998) Requirement of PKR dimerization mediated by specific hydrophobic residues for its activation by double-stranded RNA and its antigrowth effects in yeast. *Molecular and cellular biology* **18**, 7009-7019
92. Sohn, S. Y., Bae, W. J., Kim, J. J., Yeom, K. H., Kim, V. N., and Cho, Y. (2007) Crystal structure of human DGCR8 core. *Nature structural & molecular biology* **14**, 847-853
93. Thandapani, P., O'Connor, T. R., Bailey, T. L., and Richard, S. (2013) Defining the RGG/RG motif. *Molecular cell* **50**, 613-623
94. Lischwe, M. A., Cook, R. G., Ahn, Y. S., Yeoman, L. C., and Busch, H. (1985) Clustering of glycine and NG,NG-dimethylarginine in nucleolar protein C23. *Biochemistry* **24**, 6025-6028
95. Kiledjian, M., and Dreyfuss, G. (1992) Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *The EMBO journal* **11**, 2655-2664
96. Burley, S. K., and Petsko, G. A. (1986) Amino-aromatic interactions in proteins. *FEBS letters* **203**, 139-143
97. Phan, A. T., Kuryavyi, V., Darnell, J. C., Serganov, A., Majumdar, A., Ilin, S., Raslin, T., Polonskaia, A., Chen, C., Clain, D., Darnell, R. B., and Patel, D. J. (2011) Structure-function studies of FMRP RGG peptide recognition of an RNA duplex-quadruplex junction. *Nature structural & molecular biology* **18**, 796-804
98. Ghisolfi, L., Joseph, G., Amalric, F., and Erard, M. (1992) The glycine-rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA-helix-destabilizing properties. *The Journal of biological chemistry* **267**, 2955-2959
99. Menon, R. P., Gibson, T. J., and Pastore, A. (2004) The C terminus of fragile X mental retardation protein interacts with the multi-domain Ran-binding protein in the microtubule-organising centre. *Journal of molecular biology* **343**, 43-53
100. Hadian, K., Vincendeau, M., Mausbacher, N., Nagel, D., Hauck, S. M., Ueffing, M., Loyter, A., Werner, T., Wolff, H., and Brack-Werner, R. (2009) Identification of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-recognition region in the HIV Rev protein. *The Journal of biological chemistry* **284**, 33384-33391
101. Kusakawa, T., Shimakami, T., Kaneko, S., Yoshioka, K., and Murakami, S. (2007) Functional interaction of hepatitis C Virus NS5B with Nucleolin GAR domain. *Journal of biochemistry* **141**, 917-927
102. Tang, J., Kao, P. N., and Herschman, H. R. (2000) Protein-arginine methyltransferase I, the predominant protein-arginine methyltransferase in cells, interacts with and is regulated by interleukin enhancer-binding factor 3. *The Journal of biological chemistry* **275**, 19866-19876
103. Mandel, M., and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of molecular biology* **53**, 159-162

104. Sambrook, J., Cold Spring Harbor Laboratory, Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular cloning a laboratory manual ; [prepared for use in the CSH courses on the molecular cloning of eukaryotic genes]*, 2. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY
105. Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H., and Jaenicke, R. (1997) Folding Proteins. in *Protein Function: A practical approach* (Creighton, T. E. ed.), Oxford University Press. pp 57-99
106. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
107. Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophysical journal* **78**, 1606-1619
108. Morjana, N. A., McKeone, B. J., and Gilbert, H. F. (1993) Guanidine hydrochloride stabilization of a partially unfolded intermediate during the reversible denaturation of protein disulfide isomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 2107-2111
109. Fersht, A. R., Leatherbarrow, R. J., and Wells, T. N. (1987) Structure-activity relationships in engineered proteins: analysis of use of binding energy by linear free energy relationships. *Biochemistry* **26**, 6030-6038
110. Wells, T. N., and Fersht, A. R. (1989) Protection of an unstable reaction intermediate examined with linear free energy relationships in tyrosyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **28**, 9201-9209
111. Vogt, A. D., and Di Cera, E. (2012) Conformational selection or induced fit? A critical appraisal of the kinetic mechanism. *Biochemistry* **51**, 5894-5902
112. Reich, S., Golbik, R. P., Geissler, R., Lilie, H., and Behrens, S. E. (2010) Mechanisms of activity and inhibition of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* **285**, 13685-13693
113. Riechmann, L., Lavenir, I., de Bono, S., and Winter, G. (2005) Folding and stability of a primitive protein. *Journal of molecular biology* **348**, 1261-1272
114. Rost, B., Yachdav, G., and Liu, J. (2004) The PredictProtein server. *Nucleic acids research* **32**, W321-326
115. Fasman, G. D. (1996) *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*, Plenum Press, New York
116. Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed., Springer, New York
117. Perez-Iratxeta, C., and Andrade-Navarro, M. A. (2008) K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC structural biology* **8**, 25
118. Rajkowitsch, L., and Schroeder, R. (2007) Coupling RNA annealing and strand displacement: a FRET-based microplate reader assay for RNA chaperone activity. *BioTechniques* **43**, 304, 306, 308 passim
119. Rajkowitsch, L., and Schroeder, R. (2007) Dissecting RNA chaperone activity. *RNA* **13**, 2053-2060
120. Mergny, J. L., and Lacroix, L. (2003) Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides* **13**, 515-537
121. Doetsch, M., Furtig, B., Gstrein, T., Stampfl, S., and Schroeder, R. (2011) The RNA annealing mechanism of the HIV-1 Tat peptide: conversion of the RNA into an annealing-competent conformation. *Nucleic acids research* **39**, 4405-4418
122. Han, M. H. (1972) Non-linear Arrhenius plots in temperature-dependent kinetic studies of enzyme reactions. I. Single transition processes. *Journal of theoretical biology* **35**, 543-568
123. Truhlar, D., and Kohen, A. (2001) Convex Arrhenius plots and their interpretation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 848-851
124. Friedrich, S., Schmidt, T., Geissler, R., Lilie, H., Chabierski, S., Ulbert, S., Liebert, U. G., Golbik, R. P., and Behrens, S. E. (2014) AUF1 p45 promotes West Nile virus replication by an RNA chaperone activity that supports cyclization of the viral genome. *Journal of virology* **88**, 11586-11599
125. Diviney, S., Tuplin, A., Struthers, M., Armstrong, V., Elliott, R. M., Simmonds, P., and Evans, D. J. (2008) A hepatitis C virus cis-acting replication element forms a long-range RNA-RNA interaction with upstream RNA sequences in NS5B. *Journal of virology* **82**, 9008-9022
126. Oakland, T. E., Haselton, K. J., and Randall, G. (2013) EWSR1 binds the hepatitis C virus cis-acting replication element and is required for efficient viral replication. *Journal of virology* **87**, 6625-6634
127. Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* **31**, 3406-3415
128. Tinoco, I., Jr., and Bustamante, C. (1999) How RNA folds. *Journal of molecular biology* **293**, 271-281

129. Draper, D. E., Grilley, D., and Soto, A. M. (2005) Ions and RNA folding. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **34**, 221-243
130. Hargittai, M. R., Gorelick, R. J., Rouzina, I., and Musier-Forsyth, K. (2004) Mechanistic insights into the kinetics of HIV-1 nucleocapsid protein-facilitated tRNA annealing to the primer binding site. *Journal of molecular biology* **337**, 951-968
131. Rouzina, I., and Bloomfield, V. A. (1999) Heat capacity effects on the melting of DNA. 1. General aspects. *Biophysical journal* **77**, 3242-3251
132. Neplioueva, V., Dobrikova, E. Y., Mukherjee, N., Keene, J. D., and Gromeier, M. (2010) Tissue type-specific expression of the dsRNA-binding protein 76 and genome-wide elucidation of its target mRNAs. *PloS one* **5**, e11710
133. Barber, G. N. (2009) The NFAR's (nuclear factors associated with dsRNA): evolutionarily conserved members of the dsRNA binding protein family. *RNA biology* **6**, 35-39
134. Reichman, T. W., and Mathews, M. B. (2003) RNA binding and intramolecular interactions modulate the regulation of gene expression by nuclear factor 110. *RNA* **9**, 543-554
135. Tian, B., Bevilacqua, P. C., Diegelman-Parente, A., and Mathews, M. B. (2004) The double-stranded-RNA-binding motif: interference and much more. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 1013-1023
136. Chaumet, A., Castella, S., Gasmi, L., Fradin, A., Clodic, G., Bolbach, G., Poulhe, R., Denoulet, P., and Larcher, J. C. (2013) Proteomic analysis of interleukin enhancer binding factor 3 (Ilf3) and nuclear factor 90 (NF90) interactome. *Biochimie* **95**, 1146-1157
137. Manche, L., Green, S. R., Schmedt, C., and Mathews, M. B. (1992) Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Molecular and cellular biology* **12**, 5238-5248
138. Tian, B., and Mathews, M. B. (2001) Functional characterization of and cooperation between the double-stranded RNA-binding motifs of the protein kinase PKR. *The Journal of biological chemistry* **276**, 9936-9944
139. Bedford, M. T., and Clarke, S. G. (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Molecular cell* **33**, 1-13
140. Bedford, M. T., and Richard, S. (2005) Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Molecular cell* **18**, 263-272
141. Hammes, G. G., Chang, Y. C., and Oas, T. G. (2009) Conformational selection or induced fit: a flux description of reaction mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13737-13741
142. Guan, D., Altan-Bonnet, N., Parrott, A. M., Arrigo, C. J., Li, Q., Khaleduzzaman, M., Li, H., Lee, C. G., Pe'ery, T., and Mathews, M. B. (2008) Nuclear factor 45 (NF45) is a regulatory subunit of complexes with NF90/110 involved in mitotic control. *Molecular and cellular biology* **28**, 4629-4641
143. Brion, P., and Westhof, E. (1997) Hierarchy and dynamics of RNA folding. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **26**, 113-137
144. Herschlag, D. (1995) RNA chaperones and the RNA folding problem. *The Journal of biological chemistry* **270**, 20871-20874
145. Gruenewald, B., Nicola, C. U., Lustig, A., Schwarz, G., and Klump, H. (1979) Kinetics of the helix-coil transition of a polypeptide with non-ionic side groups, derived from ultrasonic relaxation measurements. *Biophysical chemistry* **9**, 137-147
146. Turner, D. H., Sugimoto, N., and Freier, S. M. (1990) *Thermodynamics and Kinetics of Base-pairing and of DNA and RNA Self-assembly and Helix Coil Transition: Nucleic Acids*, Springer-Verlag, Berlin
147. Treiber, D. K., and Williamson, J. R. (1999) Exposing the kinetic traps in RNA folding. *Current opinion in structural biology* **9**, 339-345
148. Russell, R., and Herschlag, D. (2001) Probing the folding landscape of the Tetrahymena ribozyme: commitment to form the native conformation is late in the folding pathway. *Journal of molecular biology* **308**, 839-851
149. Schroeder, R., Grossberger, R., Pichler, A., and Waldsich, C. (2002) RNA folding in vivo. *Current opinion in structural biology* **12**, 296-300
150. Schroeder, R., Barta, A., and Semrad, K. (2004) Strategies for RNA folding and assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 908-919
151. Pan, J., Thirumalai, D., and Woodson, S. A. (1997) Folding of RNA involves parallel pathways. *Journal of molecular biology* **273**, 7-13
152. Treiber, D. K., Rook, M. S., Zarrinkar, P. P., and Williamson, J. R. (1998) Kinetic intermediates trapped by native interactions in RNA folding. *Science* **279**, 1943-1946
153. Weeks, K. M. (1997) Protein-facilitated RNA folding. *Current opinion in structural biology* **7**, 336-342

154. Rajkowitsch, L., Chen, D., Stampfl, S., Semrad, K., Waldsich, C., Mayer, O., Jantsch, M. F., Konrat, R., Blasi, U., and Schroeder, R. (2007) RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases. *RNA biology* **4**, 118-130
155. Semrad, K. (2011) Proteins with RNA chaperone activity: a world of diverse proteins with a common task-impediment of RNA misfolding. *Biochemistry research international* **2011**, 532908
156. Patzel, V., and Sczakiel, G. (1999) Length dependence of RNA-RNA annealing. *Journal of molecular biology* **294**, 1127-1134
157. Eckardt, S., Romby, P., and Sczakiel, G. (1997) Implications of RNA structure on the annealing of a potent antisense RNA directed against the human immunodeficiency virus type 1. *Biochemistry* **36**, 12711-12721
158. Godet, J., Ramalanjaona, N., Sharma, K. K., Richert, L., de Rocquigny, H., Darlix, J. L., Duportail, G., and Mely, Y. (2011) Specific implications of the HIV-1 nucleocapsid zinc fingers in the annealing of the primer binding site complementary sequences during the obligatory plus strand transfer. *Nucleic acids research* **39**, 6633-6645
159. Nedbal, W., Frey, M., Willemann, B., Zentgraf, H., and Sczakiel, G. (1997) Mechanistic insights into p53-promoted RNA-RNA annealing. *Journal of molecular biology* **266**, 677-687
160. Nedbal, W., Homann, M., and Sczakiel, G. (1997) The association of complementary ribonucleic acids can be strongly increased without lowering Arrhenius activation energies or significantly altering structures. *Biochemistry* **36**, 13552-13557
161. Nedbal, W., and Sczakiel, G. (1996) Facilitators of RNA-RNA annealing: implications for the catalytic cycle of hammerhead ribozymes. *Biochemical Society transactions* **24**, 615-618
162. Eguchi, Y., Itoh, T., and Tomizawa, J. (1991) Antisense RNA. *Annual review of biochemistry* **60**, 631-652
163. Eguchi, Y., and Tomizawa, J. (1990) Complex formed by complementary RNA stem-loops and its stabilization by a protein: function of ColE1 Rom protein. *Cell* **60**, 199-209
164. Porschke, D., and Eigen, M. (1971) Co-operative non-enzymic base recognition. 3. Kinetics of the helix-coil transition of the oligoribouridylic-oligoriboadenylic acid system and of oligoriboadenylic acid alone at acidic pH. *Journal of molecular biology* **62**, 361-381
165. Hammond, G. S. (1955) A Correlation of Reaction Rates. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 334-338
166. Muller, U. F., and Goringer, H. U. (2002) Mechanism of the gBP21-mediated RNA/RNA annealing reaction: matchmaking and charge reduction. *Nucleic acids research* **30**, 447-455
167. Reich, S., Kovermann, M., Lilie, H., Knick, P., Geissler, R., Golbik, R. P., Balbach, J., and Behrens, S. E. (2014) Initiation of RNA synthesis by the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase is affected by the structure of the RNA template. *Biochemistry* **53**, 7002-7012
168. Ivanyi-Nagy, R., Davidovic, L., Khandjian, E. W., and Darlix, J. L. (2005) Disordered RNA chaperone proteins: from functions to disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **62**, 1409-1417
169. Tompa, P., and Csermely, P. (2004) The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 1169-1175
170. Kumar, N. V., and Govil, G. (1984) Theoretical studies on protein-nucleic acid interactions. III. Stacking of aromatic amino acids with bases and base pairs of nucleic acids. *Biopolymers* **23**, 2009-2024
171. Mascotti, D. P., and Lohman, T. M. (1990) Thermodynamic extent of counterion release upon binding oligolysines to single-stranded nucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 3142-3146
172. Mascotti, D. P., and Lohman, T. M. (1992) Thermodynamics of single-stranded RNA binding to oligolysines containing tryptophan. *Biochemistry* **31**, 8932-8946
173. Shoemaker, B. A., Portman, J. J., and Wolynes, P. G. (2000) Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8868-8873
174. Yi, M., and Lemon, S. M. (2003) 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *Journal of virology* **77**, 3557-3568
175. Oh, J. W., Sheu, G. T., and Lai, M. M. (2000) Template requirement and initiation site selection by hepatitis C virus polymerase on a minimal viral RNA template. *The Journal of biological chemistry* **275**, 17710-17717
176. Yi, M., and Lemon, S. M. (2003) Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA* **9**, 331-345

177. Kim, M., Kim, H., Cho, S. P., and Min, M. K. (2002) Template requirements for de novo RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase on the viral X RNA. *Journal of virology* **76**, 6944-6956
178. Kao, C. C., Yang, X., Kline, A., Wang, Q. M., Barket, D., and Heinz, B. A. (2000) Template requirements for RNA synthesis by a recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of virology* **74**, 11121-11128
179. Jafarifar, F., Yao, P., Eswarappa, S. M., and Fox, P. L. (2011) Repression of VEGFA by CA-rich element-binding microRNAs is modulated by hnRNP L. *The EMBO journal* **30**, 1324-1334
180. Goodarzi, H., Najafabadi, H. S., Oikonomou, P., Greco, T. M., Fish, L., Salavati, R., Cristea, I. M., and Tavazoie, S. (2012) Systematic discovery of structural elements governing stability of mammalian messenger RNAs. *Nature* **485**, 264-268
181. Grohman, J. K., Gorelick, R. J., Lickwar, C. R., Lieb, J. D., Bower, B. D., Znosko, B. M., and Weeks, K. M. (2013) A guanosine-centric mechanism for RNA chaperone function. *Science* **340**, 190-195
182. Mortimer, S. A., and Weeks, K. M. (2009) Time-resolved RNA SHAPE chemistry: quantitative RNA structure analysis in one-second snapshots and at single-nucleotide resolution. *Nature protocols* **4**, 1413-1421
183. Faye, M. D., Graber, T. E., Liu, P., Thakor, N., Baird, S. D., Durie, D., and Holcik, M. (2013) Nucleotide composition of cellular internal ribosome entry sites defines dependence on NF45 and predicts a posttranscriptional mitotic regulon. *Molecular and cellular biology* **33**, 307-318

VII. ANHANG

7.1 Material und Methoden (Fortsetzung)

Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in nachfolgenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle A - 1. Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Herkunft
One Shot® TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi80/lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <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(DE3) CodonPlus®-RP	<i>E. coli</i> B F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>dcm</i> ⁺ , Tetr, <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> , Hte [<i>argU proL Cam</i> ^R]	life technologies, Darmstadt

Für die PCR-Amplifikation verwendete Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle A - 2. Plasmide

Name	Charakteristika	Referenz
pET21a(+)-NF90	amp ^r , <i>NF90</i> in pET21(a)+ Expressionsvektor	PD Dr. R. P. Golbik
pET21a(+)-NF90 ^{T188D}	amp ^r , Substitution Asp für Thr in NF45 Homologie Domäne von NF90	P. Knick, T. Schmidt
pET21a(+)-NF90 ^{T315D}	amp ^r , Substitution Asp für Thr in NF45 Homologie Domäne von NF90	P. Knick, T. Schmidt
pET21a(+)-NF90 ^{T188, 315D}	amp ^r , Doppelsubstitution Asp für Thr in NF45 Homologie Domäne von NF90	P. Knick, T. Schmidt
pET21a(+)-NF90 ^{F432A}	amp ^r , Substitution Ala für Phe in dsRBM1 von NF90	P. Knick, T. Schmidt

pET21a(+)-NF90 ^{F559A}	amp ^r , Substitution Ala für Phe in dsRBM1 von NF90	P. Knick, T. Schmidt
pET21a(+)-NF90 ^{F432, 559A}	amp ^r , Substitution Ala für Phe in dsRBM1 und dsRBM2 von NF90	P. Knick, T. Schmidt
pET21a(+)-NF90 ^{S651E}	amp ^r , Substitution Glu für Ser im RGG Motiv von NF90	T. Schmidt
pET21a(+)-NF90ΔC63	amp ^r , C-terminal um 63 Aminosäuren verkürzte Variante von NF90	T. Schmidt
pET21a(+)-NF90ΔC46	amp ^r , C-terminal um 46 Aminosäuren verkürzte Variante von NF90	T. Schmidt
pET-SUMOadapt-NF45	kan ^r , Chloramphenicol, NF45 in pET-SUMOadapt	Constanze Schmotz
pUC19-Con1	amp ^r , cDNA codiertes Replikon HCV 1b Con1-Isolat (Klon 162)	C. Grassmann

Tabelle A - 3. Oligonukleotide für PCR

Name	5' -> 3' Sequenz	Beschreibung
NF90F432A_fw	GCG ACC ATG TCT GTG GAG GTT GAT GGC AAT TCA	<i>forward</i> primer, Substitution im dsRBM1
NF90F432A_rv	GAT GGG GGC ATG GAC GGG CCC	<i>reverse</i> primer, Substitution im dsRBM1
NF90F559A_fw	GCG GTC ATG GAG GTC GAA GTG GAT GGA CAG	<i>forward</i> primer, Substitution im dsRBM2
NF90F559A_rv	GCG CTT GTC GTG GCT GCC CCC	<i>reverse</i> primer, Substitution im dsRBM2
NF90ΔC63_fw	CCC AAC CTT TAG GGG CGG GG	<i>forward</i> primer, Verkürzung <i>upstream</i> des RGG Motiv
NF90ΔC63_rv	CCC CGC CCC TAA AGG TTG GG	<i>reverse</i> primer, Verkürzung <i>upstream</i> des RGG Motiv

NF90ΔC46_fw	GGG CGA GGA TAG GGT GGC GCC AAC CAT	<i>forward</i> primer, Verkürzung <i>downstream</i> des RGG Motiv
NF90ΔC46_rv	ATG GTT GGC GCC ACC CTA TCC TCG CCC	<i>reverse</i> primer, Verkürzung <i>downstream</i> des RGG Motiv
NF90T188D_fw	ATT AGC TGG AGA AGA CCT ATC AGT CAA CG	<i>forward</i> primer, pseudophosphorylierung in NF45 Homologie- Domäne
NF90T188D_rv	CGT TGA CTG ATA GGT CTT CTC CAG CTA AT	<i>reverse</i> primer, pseudophosphorylierung in NF45 Homologie- Domäne
NF90T315D_fw	TGC GCA CTC TGG TCG ATA TCT TCC C	<i>forward</i> primer, pseudophosphorylierung in NF45 Homologie- Domäne
NF90T315D_rv	GGG AAG ATA TCG ACC AGA GTG CGC A	<i>reverse</i> primer, pseudophosphorylierung in NF45 Homologie- Domäne
1b_MiniPCR_rev	ACT TGA TCT GCA GAG AGG CCA G	<i>reverse</i> primer, zur Amplifikation der Fragmente der 3'UTR von HCV-1b
1b_SL1fw_T7	GAA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCT TGA CTG CAG AGA GTG CT	<i>forward</i> primer, zur Amplifikation des SL1- Fragments der 3'UTR von HCV-1b
1b_SL2fw_T7	GAA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG TCA CGG CTA GCT GTG AAA GGT	<i>forward</i> primer, zur Amplifikation des SL2- Fragments der 3'UTR von HCV-1b
1b_X-tail+26fw_T7	GAA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG TCC TCT TTT TTT CCT TTT CTT TCC TTT G	<i>forward</i> primer, zur Amplifikation des X-tail- Fragments der 3'UTR von HCV-1b
1b_polyUfw_T7	GAA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG TAG GCC ATC CTG TTT TTT TCC C	<i>forward</i> primer, zur Amplifikation des polyU- Fragments der 3'UTR von HCV-1b

1b_SLstopfw_T7	GAA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGA TGA ACG GGG AGC TAA AC	<i>forward</i> primer, zur Amplifikation des SLstop- Fragments der 3'UTR von HCV-1b
1b_5BSL3.1fw_T7	GAA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG AAT CCC GGC TGC GTC CCA	<i>forward</i> primer, zur Amplifikation des 5BSL3.1_3UTR- Fragments von HCV-1b

7.1.1 Kultivierungsbedingungen bakterieller Zellen

Kulturmedien und Zusätze

Zur Anzucht von *E.coli*-Stämmen wurde LB-Medium verwendet. Zur Kultivierung auf LB-Platten wurde dem Medium entsprechend Agar (15 g/L) zugeben.

10 g Bacto-Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g Natriumchlorid

ad 1 L H₂O

Zur Selektion Resistenz-vermittelnder Plasmide wurde dem Medium das entsprechende sterilfiltrierte Antibiotikum eingesetzt: 100 µg/mL Ampicillin, 50 µg/mL Kanamycin und 20 µg/mL Chloramphenicol.

Zur Induktion heterologer Genexpression wurde dem Medium gegebenenfalls IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt.

Anzucht und Zellernte

Die Bakterienstämme wurden als Suspensionsschüttelkultur in LB-Medium oder auf LB-Platten aerob bei 37 °C angezogen. Entsprechende Zusätze zur Selektion befanden sich im Medium. Das Wachstum der Suspensionskulturen wurde über die optische Dichte (OD₆₀₀) mit einem Spektrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf) verfolgt. Die Zellernte erfolgte über Zentrifugation (Mikro 200, Eppendorf; Rotina 38R, Hettich).

Für allgemeine Klonierungsarbeiten und präparative Produktion der Plasmide wurde der *E. coli*-Stamm One Shot® TOP10 verwendet. Die heterologe Genexpression erfolgte in BL21(DE3) CodonPlus®-RP.

7.1.2 Herstellung radioaktiv-markierter RNA

Zur Herstellung radioaktiv-markierter RNA wurde der unter 2.2.1 beschriebene Ansatz leicht modifiziert. Die Konzentration von rCTP wurde auf 0.01 mM reduziert und gleichzeitig 0.53 μM [α - ^{32}P]CTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$, 3000 Ci/mmol, Hartmann Analytic, Braunschweig) zugesetzt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C und einstündiger Behandlung mit DNaseI (Roche, Mannheim) bei 37 °C, wurde der Ansatz durch ein 5%iges Harnstoff-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufzutrennt. Die RNA wurde isoliert und mittels 0.5 M Ammoniumacetat, pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.1 % (w/v) SDS eluiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion analog zur Präparation nicht-markierter RNA. Die Präzipitation erfolgte durch Zugabe von 0.1 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5.3 und 2.5 Vol. 100%igem Ethanol zum wässrigen Überstand. Nach 30 min bei -20 °C wurde das Pellet durch Zentrifugation erhalten und weiter analog zur nicht-markierten RNA aufgearbeitet.

7.1.3 Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese

Radioaktiv-markierte RNA aus *in vitro*-Transkriptionen wurden mittels 7%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen gereinigt. Der gewünschte Anteil an Acrylamid des Gels wurde durch Mischung einer 40%igen Acrylamid:Bisacrylamid (19:1) mit 1xTBE-8M Harnstoff (1xTBE: 44.5 mM Tris pH 8.0, 44.5 mM Borsäure, 1mM EDTA) eingestellt. Als Laufpuffer diente 0.5xTBE. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 1 Vol. Formamid-Ladepuffer (97.5% (v/v) Formamid, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau, 0.1 % (w/v) Xylencyanol, 10 mM EDTA) versetzt, für 10 min bei 95 °C erhitzt und auf Eis für 2 min abgekühlt. Die elektrophoretische Auftrennung wurde bei 10 W durchgeführt. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel in 5 % (v/v) Essigsäure fixiert und anschließend vakuumgetrocknet. Radioaktive Transkripte wurden mittels UV-Lampe und einer Dünnschicht-Chromatographie-Platte detektiert (*UV shadowing*) und direkt aus dem nassen Gel ausgeschnitten.

7.1.4 Filterbindungsassay

Ansteigende Konzentration des Proteins wurden mit 0.5 nM ^{32}P -markierter RNA in Filterbindungsassay-Puffer [FBA, 50 mM Natriumphosphat pH 7.2, 150 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin, 1mM TCEP, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA] in einem Gesamtvolumen von 100 μL für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde über eine *dot-blot* Apparatur und unter Anlegung von Vakuum auf eine Nitrocellulosemembran (Protran, Whatman) gesaugt. Die Membran wurde vor dem Beladen mit den Proben mit FBA äquilibriert. Anschließend wurde die

Membran zweimal mit FBA gewaschen, luftgetrocknet und durch Autoradiographie visualisiert. Dazu erfolgte die Exposition der Membran auf einem *Storage-Phosphor-Screen* (GE Amersham Bioscience) für 16 – 24 h. Zur Detektion der radioaktiven Signale diente ein *Phosphor Imager* (Molecular Dynamics, STORM 860). Die Quantifizierung erfolgte mit der Software *ImageQuant 5.0* (GE Healthcare, Uppsala, Schweden). Für die Darstellung wurden die Signale auf den Endwert normiert und anhand Gleichung A1 ausgewertet.

$$S = \frac{[\text{Protein}]_t \cdot S_{\max}}{EC_{50} + [\text{Protein}]_t} \quad (\text{Gleichung A1})$$

S	Signalamplitude bei Proteinkonzentration x
EC ₅₀	Proteinkonzentration bei 50 % Sättigung
S _{max}	Signalamplitude bei maximaler Sättigung
[Protein] _t	Gesamte - Proteinkonzentration

7.2 Ergänzende Ergebnisse

7.2.1 Charakterisierung von NF45

7.2.1.1 Präparation von NF45

Neben NF90 sollte auch der NF90-NF45 Komplex charakterisiert werden. Um den Komplex zu rekonstituieren, musste zunächst NF45 hergestellt werden. Dieses wurde mittels heterologer Genexpression in *Escherichia coli* als SUMO-NF45-Fusionsprotein (*small ubiquitin-like modifier*) über Fermentation produziert. N-terminal des SUMO befand sich ein Hexahistidin-tag. Das SUMO-Protein soll eine erhöhte Löslichkeit des fusionierten Proteins vermitteln und kann dessen Toxizität im Wirtsorganismus vermindern. Das Zielprotein kann in nativer Form durch Abspaltung von SUMO mit der spezifischen SUMO-Protease erhalten werden. Im Falle von SUMO-NF45 konnte keine Steigerung der Löslichkeit beobachtet werden. Deswegen wurde es aus der nicht-löslichen Fraktion unter denaturierenden Bedingungen gereinigt.

Das Protein wurde über mehrere Schritte mittels Säulenchromatographie gereinigt, bevor es zur Abspaltung des SUMO renaturiert wurde. Dazu wurden sehr hohe Salzkonzentrationen verwendet um dem Fusionsprotein eine höhere Löslichkeit zu vermitteln. Trotz dieser ionischen Bedingungen traten z.T. Präzipitationen während der Spaltung auf. Aus diesem Grund konnte nicht gewährleistet werden, dass das im fusionierten Zustand renaturierte NF45 seine native Struktur eingenommen hatte. Folglich wurde es nach der Spaltung erneut denaturiert, final gereinigt und anschließend analog zu NF90 renaturiert.

Die schon für die Präparation von NF90 gestellten Anforderungen mussten auch für NF45 zutreffen. Das so gewonnene Protein wurde in einer 10%igen SDS-PAGE analysiert und war nach Coomassie-Färbung frei von Verunreinigungen (**Abb. A - 1A**). Die Proteinkonzentration wurde spektroskopisch bestimmt (**Abb. A - 1B**). Der Quotient der Absorptionen bei 280 bzw. 260 nm betrug mindestens 1.7 und indizierte somit keine Kontamination durch Nukleinsäuren (**Abb. A - 1B**). Analytische Ultrazentrifugation von NF45 in NF90-Puffer [50 mM Natriumphosphat pH 7.2, 100 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin, 1 mM TCEP] stellte das Protein als Monomer dar (**Abb. A - 1C**, durchgeführt von PD Dr. Hauke Lilie, MLU Halle-Wittenberg).

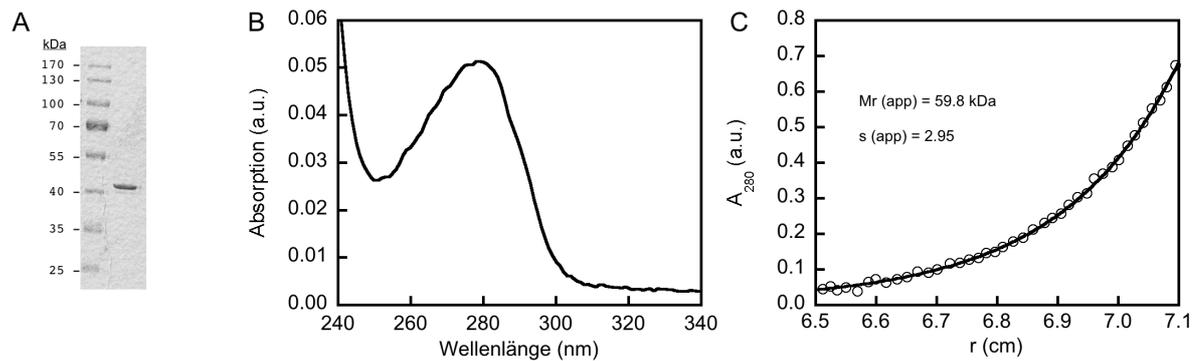


Abbildung A - 1: Reinigung von rekombinanten NF45. (A) Das gereinigte NF45 wurde in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend Coomassie gefärbt. Das Molekulargewicht der Markerbanden ist indiziert. (B) UV-Absorptionsspektrum des gereinigten NF45. (C) Analytische Ultrazentrifugation des gereinigten NF45. Das Sedimentationsgleichgewicht des gereinigten NF45 wurde in NF90-Puffer verfolgt. Die lokale Proteinkonzentration wurde bei 280 nm in Abhängigkeit vom Radius (r) bestimmt. Die Auswertung erfolgte nach der Svedberg-Gleichung. Der ermittelte Sedimentationskoeffizient und das damit korrespondierende Molekulargewicht sind in der Abbildung angegeben.

7.2.1.2 Strukturelle und funktionale Eigenschaften von NF45

Die bereits erwähnte Kristallstruktur eines verkürzten NF90-NF45 Komplexes enthielt Informationen über die Struktur von NF45, dem die N-terminalen ersten 28 Aminosäuren fehlten (4). Diese weisen allerdings ein RGG-Motiv auf, dessen Funktion bisher ungeklärt ist. Des Weiteren war unbekannt, inwiefern sich strukturelle Parameter von NF45 durch die Heterodimerisierung mit NF90 veränderten. Deswegen wurden analog zu NF90 zunächst grundlegende strukturelle sowie funktionale Eigenschaften des NF45 charakterisiert, die eine Basis für einen nachfolgenden Vergleich zum Heterodimer darstellen sollten.

Kalkulationen der Verteilung von Sekundärstrukturelementen (<http://www.predictprotein.org> (114)) ergaben ein nahezu vollständig strukturiertes NF45 und wiesen zugleich auf eine sehr starke Homologie des Proteins zur N-terminalen Hälfte von NF90 hin, die durch eine Sequenzidentität von 28 % unterstützt wurde (**Abb. A - 2A**). Auch die Kristallstruktur belegte eine starke Kongruenz der Tertiärstruktur besagter Proteinabschnitte (4).

Der Circular dichroismus war analog NF90 durch eine positive Bande bei 193 nm und zwei negative Banden bei 208 bzw. 225 nm charakterisiert (**Abb. A - 2B**). Im Allgemeinen verursachte NF45 im CD 1.5-fach größere *mean residue weight* Elliptizitäten als NF90. Das stimmte mit der durch den PredictProtein-Server vorhergesagten hoch definierten Sekundärstruktur des gesamten Proteins überein. Die Intensitäten der beiden negativen Banden waren im Gegensatz zu denen des NF90 fast identisch. Auswertung des CD mit dem Web-basierten Programm K2D2 erzielte ein

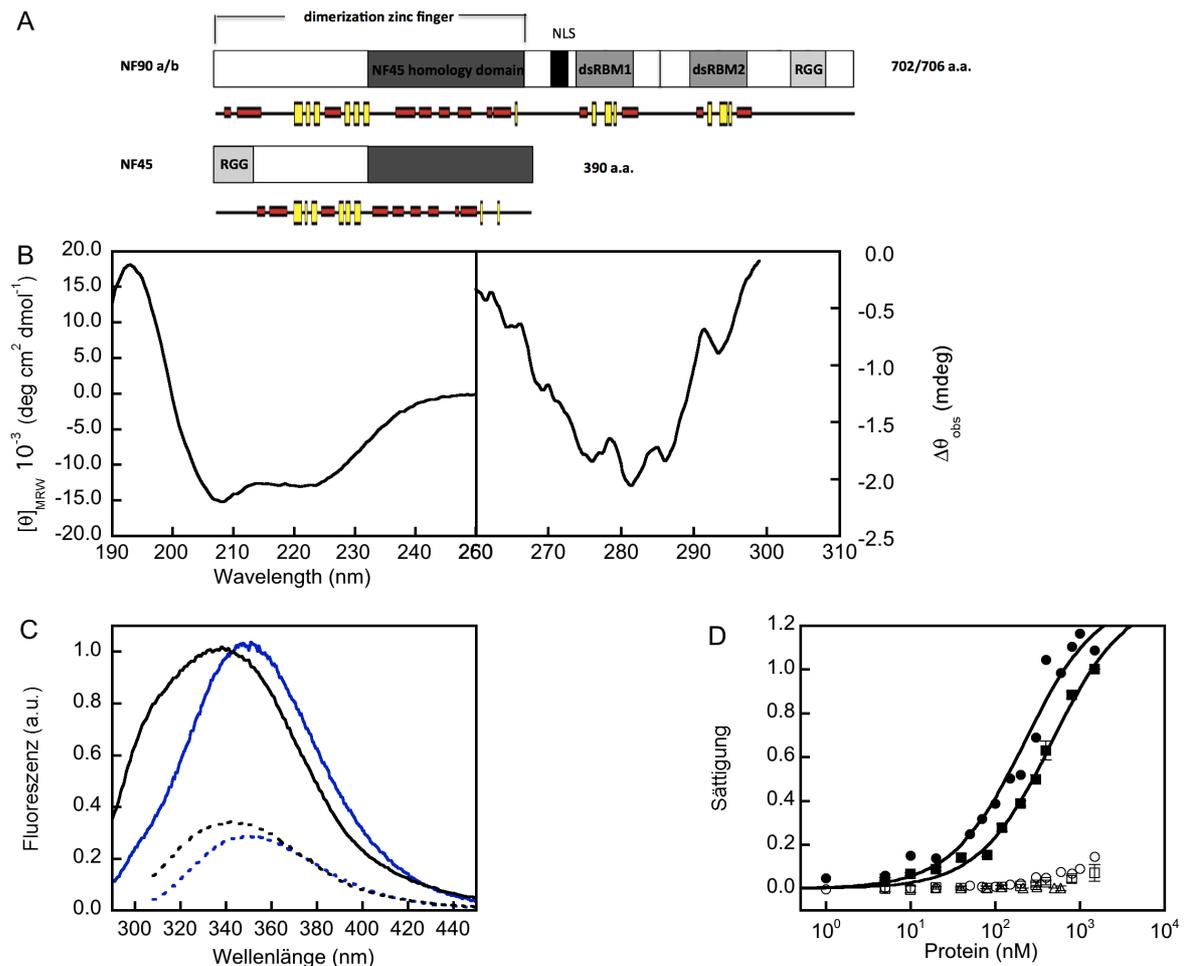


Abbildung A - 2: Strukturelle und funktionale Charakteristika von NF45. (A) Schematische Darstellung der Domänenorganisation von NF90a/b und NF45 vergleichend gegenüber gestellt. Die dsRBM, das RGG-Motiv und der *dimerization zinc finger* (DZF) sind indiziert. Die jeweils darunter liegenden Abbildungen zeigen die Vorhersage der Sekundärstruktur für NF90 bzw. NF45 (PredictProtein-Server, <http://www.predictprotein.org>, 95). α -Helices sind rot und β -Faltblätter gelb dargestellt. (B) Das Fern-UV und Nah-UV Circular dichroismus-Spektrum von NF45 wurde bei 20 °C in NF90-Puffer aufgezeichnet. Gemessene Elliptizitäten im Fern-UV wurden in die *mean residue weight* elliptizitäten umgerechnet. (C) Intrinsische Fluoreszenz von NF90 (schwarz) und NF45 (blau) einer Anregung bei 280 nm (voller Graph) und 295 nm (gestrichelter Graph). Die Signale wurden auf die Intensität des Emissionsmaximums bei einer Anregung bei 280 nm normiert. (D) Quantifizierung der Interaktion von NF45 (grau, offene Symbole) und NF90 (schwarz, volle Symbole) mit 0.5 nM ^{32}P -markierter HCV 5'UTR-RNA (Kreis, Filterbindungsassay), 0.5 nM ^{32}P -markierter 56 bp-DNA (Quadrat, Filterbindungsassay), und 100 nM FAM-EX-markierter RNA (Dreieck, Fluoreszenzassay). Die Signale von NF45 wurden auf den Maximalwert von NF90 normiert. Die radioaktiven Signale der Filter-Bindungs-Assays wurden mit *ImageQuant* quantifiziert, gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und mit Gleichung S1 analysiert. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten gezeigt.

ungenaueres Ergebnis ($\text{max. error} = 1300 \text{ deg cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) und ergab 29.8 % α -Helix und 14.5 % β -Faltblatt-Anteil. Damit ist der Gehalt anderer Strukturelemente bei 55.7 %, die auch bei diesem Protein einen hohen Anteil an konformationell flexiblen Bereichen indizieren.

NF45 zeigte ähnlich wie NF90 auch einen CD im Nah-UV (**Abb. A - 2B**). Das belegte, dass auch NF45 eine ausgeprägte Tertiärstruktur eingenommen haben musste. Die Signale waren im Unterschied zu NF90 nur im Bereich von 280 nm zu detektieren.

NF45 enthält sieben Tyrosine und drei Tryptophane, die die intrinsische Fluoreszenz des Proteins bestimmten (**Abb. A - 2C**). Aus diesem Grund war die Intensität der intrinsischen Fluoreszenz deutlich geringer als die des NF90 und wurde auf ihre maximale Intensität normiert, um die Unterschiede zwischen NF45 und NF90 besser zu verdeutlichen. Beide Proteine wiesen ein Maximum der Tryptophan-Fluoreszenz auf, jedoch war das Maximum bei NF45 bathochrom verschoben. Diese Tryptophane liegen somit in einer stärker polaren Umgebung als die von NF90. Dies wurde auch bei der alleinigen Anregung der Tryptophan-Fluoreszenz deutlich. Außerdem zeigte die intrinsische Fluoreszenz von NF45 keine Tyrosinbande, die im Vergleich bei NF90 signifikant ausgeprägt war.

Nachdem die strukturelle Integrität und Eigenschaften des NF45 belegt werden konnten, wurden funktionale Aspekte des Proteins analysiert. Neben der später zu erfolgenden Komplexbildung mit NF90 musste zunächst geklärt werden, ob NF45 in der Lage war mit Nukleinsäuren zu interagieren. Für NF45 wurden neben dem N-terminalen RGG-Motiv keine weiteren Module zur Nukleinsäure-Bindung beschrieben. Zur Prüfung einer Bindungsaktivität wurden Filterbindungs-Assays mit der HCV 5'UTR und einer DNA durchgeführt (**Abb. A - 2D**). Dabei wird das Protein mit radioaktiv-markierter Nukleinsäure inkubiert und der entstehende Binärkomplex über eine Membran filtriert. Die auf der Membran zurückgehaltene Radioaktivität wurde per Szintillation gemessen. Die durch NF45 erhaltenen Daten wurden auf die parallel erhaltenen Ergebnisse von NF90 normiert, um die Unterschiede in den Intensitäten der auf der Membran detektierten Radioaktivitäten zu verdeutlichen. NF45 erreichte bei gleicher Proteinkonzentration maximal 10 % der Radioaktivität die durch NF90 auf der Membran zurückgehalten wurde. Damit wurde deutlich, dass NF45 eine wesentlich geringere Kapazität an Nukleinsäurebindung als NF90 aufwies. Das Resultat der Filterbindungs-Assays wurde durch fluorimetrische Titrations von NF45 gegen FAM-EX-markierte RNA bestätigt. Auch in diesem Fall war keine Interaktion von NF45 mit der RNA festzustellen. Diese Ergebnisse bestätigten Beobachtungen von Wolcovicz und Cook (4), dass NF45 bzw. die DZF-Domäne von NF45 bzw. NF90 keine signifikante thermodynamisch stabile Interaktion mit Nukleinsäuren einging.

7.2.2 Die Lage nicht-komplementärer Bereiche der dsRNA beeinflussen die thermodynamische Stabilität der Nukleinsäure

Zur Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Paare von ssRNAs wurde deren thermodynamische Stabilität mittels Schmelzkurven in einem Bereich von 10 – 90 °C spektroskopisch analysiert. Die Unterscheidung beim Übergang des nativen (dsRNA) in

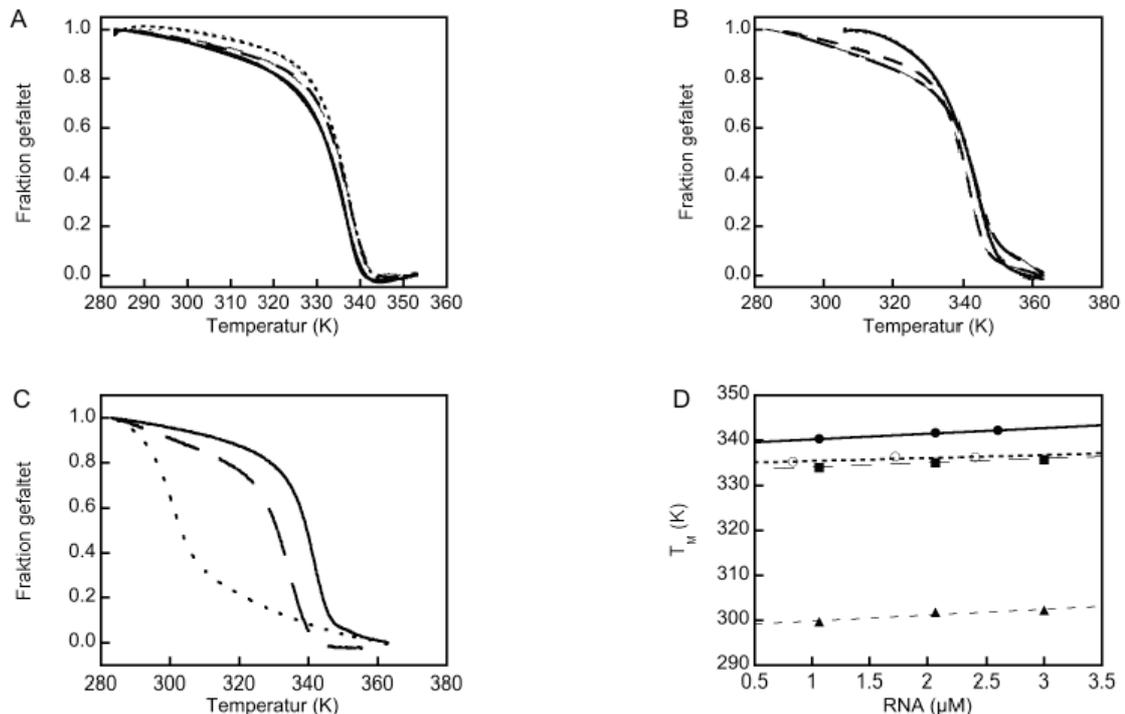


Abbildung A - 3: Schmelzkurvenanalyse verschiedener Nukleinsäuren. Thermische Denaturierung von 1, 2 und 3 μM (A) RaSc, und (B) HCV-SL3. Das Schmelzen der RNAs in NF90-Puffer wurde über die Absorption bei 268 nm in einem Bereich von 10 – 90 °C mit einem Gradienten von 0.4 K min^{-1} verfolgt. Die erhaltenen Kurven wurden normiert und mittels Gleichung 16 quantitativ ausgewertet. Die thermodynamischen Parameter sind in **Tabelle A - 4** zusammengefasst. (C) Vergleich der Schmelzkurven von je 1 μM HCV-SL3-*bubble* (gepunktet), HCV-SL3-*fork* (gestrichelt), und HCV-SL3 (voll) unter den gleichen Bedingungen wie (A). (D) Die ermittelten Schmelzpunkte von HCV-SL3 (ausgefüllter Kreis), HCV-SL3-*fork* (Quadrat) HCV-SL3-*bubble* (Dreieck) und RaSc (leerer Kreis) wurden gegen die eingesetzte RNA-Konzentration aufgetragen. Der Anstieg repräsentiert die Konzentrationsabhängigkeit der Schmelztemperatur der entsprechenden RNA.

den denaturierten Zustand (ssRNA) wird durch einen Hypochromie-Effekt ermöglicht. Im nativen Zustand einer dsRNA bildet sich eine A-helikale Konformation aus, die eine Stapelung der Basen (*base stacking*) und π - π -Elektronen-Wechselwirkungen benachbarter Basen induziert. Das *base-stacking* ist ursächlich für eine den Einzelsträngen gegenüber verminderte Absorption (Hypochromie) des Doppelstranges. Bei keiner der untersuchten Nukleinsäuren wurde eine Hysterese von Faltungs- und Denaturierungskurven festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die Bimolekularität der Faltung erforderte zur Auswertung ein Modell, das die Konzentrationen der Einzelstränge berücksichtigte (Gleichung 17, (113)).

Die Transitionskurven indizierten einen kooperativen Prozess der Dissoziation (bzw. Hybridisierung) aller analysierten RNAs (**Abbildung A - 3**). Unter Verwendung des oben genannten Modells konnten die thermodynamischen Parameter aus den Messkurven berechnet werden (**Tabelle A - 4**). Demnach ging die Hybridisierung aller analysierten RNAs mit einem großen Enthalpiegewinn, aber ebenfalls mit hohem Entropieverlust einher. Diese Beträge gehen vermutlich auf die Ausbildung der Basenpaare bzw. die

Einnahme der A-helikalen Struktur zurück. Darüber hinaus wiesen die untersuchten RNAs eine hohe Stabilität (ΔG) unter den Standard-Assay-Bedingungen bei 20 °C auf. Die Einführung der nicht-komplementären Bereiche modifizierte die thermodynamischen Parameter (**Abb. A-3**). In den Fällen, in denen der nicht-komplementäre Bereich zentral in der Nukleinsäure lokalisiert war (*bubble*), konnte eine deutliche Reduktion der Enthalpie ermittelt werden ($\Delta H = 114.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ für HCV-SL3 vs. $63.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ für HCV-SL3-*bubble*), die eine signifikant geringere thermodynamische Stabilität der *bubble*-RNAs bedingte. Ähnliches konnte für HCV-SL3-*fork* ermittelt werden. Dieser Einfluss konnte durch einen endständigen nicht-komplementären Bereich (HCV-SL3-*fork* und RaSc-*fork*) nicht beobachtet werden.

Neben dem Enthalpie- sowie Entropiebeitrag zog die Hybridisierung der ssRNAs eine große Änderung der Wärmekapazität mit ca. $100 - 200 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \text{ bp}^{-1}$ nach sich.

Die Analyse der Schmelzkurven belegte für alle verwendeten RNAs, dass der doppelsträngige Zustand unter Assay-Bedingungen ausreichend stabilisiert wurde. Die Lage nicht-komplementärer Bereiche hatte einen unterschiedlichen Einfluss auf die thermodynamischen Parameter der Nukleinsäure.

Tabelle A - 4. Thermodynamische Parameter der Entfaltung verschiedener dsRNAs

	T_M (K)	ΔH_{TM} (kcal mol ⁻¹)	ΔS_{TM} (kcal K ⁻¹ mol ⁻¹)	ΔC_p (kcal K ⁻¹ mol ⁻¹)	ΔG (kcal mol ⁻¹)	K_D (M)	dT/dc (K/μM)
16/13 dsRNA (13 bp)	342	93.0	0.272	2.25	13.4	10 ⁻¹⁰	0.9
RaSc (21 bp)	335	111.0	0.331	3.29	13.0	10 ⁻¹⁰	0.7
RaSc- <i>bubble</i> (7 + 8 bp)	311	72.4	0.232	2.60	10.8	10 ⁻⁹	n.b.
RaSc- <i>fork</i> (15 bp)	326	112.3	0.344	4.07	12.3	10 ⁻¹⁰	n.b.
HCV-SL3 (15 bp)	340	114.3	0.336	3.18	13.0	10 ⁻¹⁰	1.3
HCV-SL3- <i>bubble</i> (5 + 6 bp)	299	63.7	0.213	-1.77	9.6	10 ⁻⁸	1.3
HCV-SL3- <i>fork</i> (11 bp)	334	98.9	0.296	1.35	16.6	10 ⁻¹³	0.9

7.2.3 Tabellen

Tabelle A - 5. Kinetische Parameter des RNA annealing von C-terminal modifizierten Varianten von NF90 und NF90-NF45

	nM										k_{on}^a	k_{max} (s^{-1})	k_{max}/K_D ($M^{-1} s^{-1}$)
	5	10	20	50	100	200	300	500	1000	2000			
NF90		1.1	1.3	2.1	3.7			12.4	12.5		0.1	0.1	10^4
NF90-NF45	2	3.3	11.2	36.9	43.2	119	119				5	2.1	10^7
NF90 Δ C63							1.7			2.2	-	-	-
NF90 Δ C63-NF45			2.8	3.1	3.6		11.9	13.6	17.7		0.1	0.18	10^5
NF90 Δ C46				1.6	1.9		2.5	3	5.4		0.04	0.07	10^4
NF90 Δ C46-NF45			2.3	4.1		6.5	11	15	50		0.4	0.7	10^5

Die in der Tabelle angegebenen Werte sind $k_{obs} \cdot 10^{-2}$ (s^{-1}) der Reaktion bei der gekennzeichneten Proteinkonzentration.
^a in $10^6 M^{-1} s^{-1}$

Tabelle A - 6. Kinetische Parameter des RNA annealing von NF90 und NF90-NF45

		nM												k_{on}^a	k_{max} (s^{-1})	k_{max}/K_D ($M^{-1} s^{-1}$)
		0	1	5	10	20	30	50	60	100	200	300	500			
RNA	HCV-SL3				1	4.6		12.8	20	22				2	0.3	$3 \cdot 10^6$
	RaSc				0.6	1.1		3.1	6.2	11	12			0.4	0.2	$8 \cdot 10^5$
NF90	HCV-SL3	1			1.1	1.3		2.1		3.7		12.4	12.5	0.1	0.2	$5 \cdot 10^5$
	RaSc	0.6			1.4		2.9		4.9	7.8		15.1		0.3	0.4	$5 \cdot 10^5$
NF90-NF45	HCV-SL3	1		2	3.3	11.2		36.9		43.2	119			5	2.5	$1 \cdot 10^7$
	RaSc	0.6	2.1	15	32	52		121		141				15	2.1	$5 \cdot 10^7$

Die in der Tabelle angegebenen Werte sind $k_{obs} \cdot 10^{-2}$ (s^{-1}) der Reaktion bei der gekennzeichneten Proteinkonzentration.
^a in $10^6 M^{-1} s^{-1}$

Tabelle A - 7. Thermodynamische Parameter des RNA annealing

	E_A (kcal mol ⁻¹)	$\Delta H^\#$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta S^\#$ (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	$\Delta G^\#_{20^\circ\text{C}}$ (kcal mol ⁻¹)
+ NF90	0	-0.6	-141.2	9.7
+ NF90-NF45	0	-0.6	-117.1	8.1
+ NF90 ^{S651E} -NF45	0	-0.6	-128.9	8.9

k_{obs} in 10⁻² s⁻¹
^a in 10⁶ M⁻¹ s⁻¹

Tabelle A - 8. Thermodynamische Daten anderer RNA-annealer

	eingesetzte Konzentration	E_A^a	$\Delta G^{\#,a}$	$\Delta S^{\#,b}$	RNA-Länge
RNA – Mg ²⁺ (156, 157)		23.9	13.6	131	
RNA + Mg ²⁺ (156, 157)	10 + 0.5 nM	10.3	11.7	-30	(640 + 69)
p53 (156)	+ 1300 nM	18.5	10.3	108	
CTAB (158)	+ 1 mM	17.4	7.6	123	
RNA aus (110)	10 nM	9.5	9.5	-2	(21 + 21)
Tat-1 Peptid (44-61) (110)	300 nM	16.7	8.4	+26.7	
RNA (155)	10 nM + 0.1-1 µM	19.1	13.6	17	(18 + 18) SL
NCP7 (155)	nicht spezifiziert	18.6	10.7	26	

^a in kcal mol⁻¹ ^b in cal mol⁻¹ K⁻¹ ^c in nt SL – stem-loop

7.3 Ergänzende Diskussion

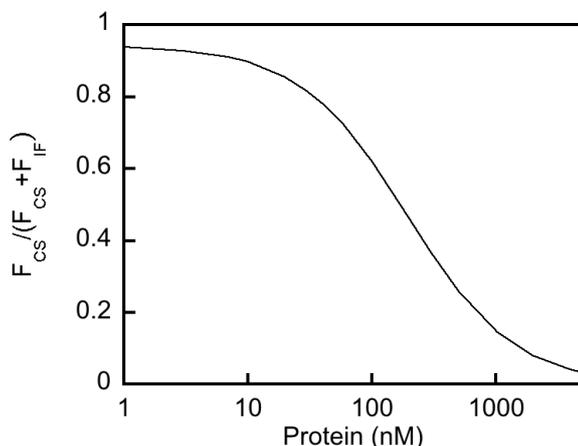


Abbildung A - 4: Fluss-Modell der ssRNA-Bindung von NF90^{S651E}. Partieller Fluss durch den *conformational selection* Weg der Bindung von ssRNA-1 an NF90^{S651E} unter Verwendung der experimentellen Geschwindigkeitskonstanten und Abschätzung fehlender Parameter (Tabelle 22). Zur Berechnung wurden das Modell von Hammes *et al.* verwendet (123).

Tabelle A - 9. Parameter des Fluss-Modells

Mechanismus	k_r (s ⁻¹)	k_{-r} (s ⁻¹)	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_1 (s ⁻¹)	K_D (nM)
<i>conformational selection</i>	0.005	10	10 ^{9 a}	-	10
<i>induced fit</i>	-	-	5 · 10 ⁶	0.03	1000

Im Fall der Bindung von NF90^{S651E} an dsRNA-1 war die Geschwindigkeitskonstante der Bindung etwa 4.5-mal kleiner, aber dennoch in derselben Größenordnung wie die der Bindung des Proteins an ssRNA-1 ($k_{on, dsRNA-1} = 1.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ vs. $k_{on, ssRNA-1} = 5.4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Eine weiterführende Analyse der erhaltenen Parameter und der entsprechenden Affinitäten ($K_{D, ssRNA-1} = 1100 \text{ nM}$, $K_{D, dsRNA-1} = 500 \text{ nM}$) unter Verwendung der Beziehung $K_D = k_{off} / k_{on}$ ergibt folglich $k_{off, ssRNA-1} = 10 k_{off, dsRNA-1}$. Daraus folgt, dass ein Austausch Protein-gebundener ssRNA-1 mit einer 10-mal größeren Geschwindigkeitskonstanten als der der dsRNA-1 abläuft und, dass diese Konstanten unmittelbar die Affinität bestimmen. Weiterhin stimmt die kinetische Dissoziationskonstante in sehr guter Näherung mit der aus den Gleichgewichtstitration bestimmten Konstante überein ($K_{D, Kinetik} = 258 \text{ nM}$ vs. $K_{D, \text{Äquilibrium}} = 500 \text{ nM}$). Diese Tatsache unterstützt die vorgeschlagenen Theorien zur Kinetik. Die Bindung von NF90wt an dsRNA-1 konnte ebenfalls aus technischen Gründen nicht verfolgt werden. Daher kann über die Assoziation des Wildtyp NF90 an dsRNA-1 in Analogie zur Bindung an ssRNA-1 nur vermutet werden, dass die Reaktion sehr schnell erfolgt.

7.4 Homologie-Modell von NF90-NF45

Die publizierte Kristallstruktur umfasst den Dimerisierungskomplex der Proteine, der Aminosäuren 1 – 380 von NF90 und 29 – 390 von NF45 umfasst. Dementsprechend konnten keine strukturellen Informationen über die RNA-bindenden Motive erhalten werden. Die Faltung der DZF-Domäne entspricht der einer Templat-freien Nukleotidyltransferase, wobei weder NF90 noch NF45 katalytisch aktive Aminosäuren besitzen, die für eine Nukleotidyltransferase-Aktivität essentiell sind (4). Entsprechend dieser Struktur werden drei Salzbrücken als Interaktionsstelle zwischen den Proteinen definiert (Seitenkette NF90 – Seitenkette NF45): Glu-Arg, Arg-Asp und Gln-Gln. Obwohl der Dimerisierungskomplex eine hohe Symmetrie aufweist, schließen die Autoren aufgrund der asymmetrischen Organisation der Interaktionsstelle eine Homooligomerisierung aus. Dass die drei identifizierten Salzbrücken die Hauptinteraktionsstelle definieren steht im Widerspruch zu einer Beobachtung der Autoren, dass der Komplex auch unter Bedingungen bis 500 mM NaCl stabil war. Diese Tatsache stimmt mit eigenen Beobachtungen der Proteinpräparationen der vorliegenden Arbeit überein, dass der Komplex auch unter Salzbedingungen bis 1 – 1.5 M NaCl eine gewisse Stabilität aufwies (nicht gezeigt). In der vorliegenden Arbeit wurden Hinweise erhalten, dass weitere Interaktionsstellen als die DZF-DZF-Wechselwirkung zwischen den Proteine vorliegen, die von nicht kristallisierten Regionen ausgehend könnten.

In Kooperation mit PD Dr. Iris Thondorf (AG *molecular modelling*, MLU Halle-Wittenberg) ist im Rahmen der Masterarbeit von Phil-Eric Jentschke „Homologiemodellierung des kernkodierten RNA-bindenden NFAR-Komplexes NF90-NF45“ (2014) auf der Basis der publizierten Kristallstruktur (4) und der in Kooperation mit Prof. Andrea Sinz (MLU Halle-Wittenberg) durchgeführten *crosslink*-Experimente des vollständigen Heterodimers (Durchführung Paul Knick, Auswertung Dr. Sabine Herbst) ein Homologie-Modell für dessen 3D-Struktur entwickelt worden. Die Bezeichnung „Homologie-Modell“ bedeutet, dass aus *alignments* der Primärstruktur von NF90 mit homologen Sequenzen anderer Proteine, deren Strukturen publiziert sind, Struktur-Template für das initiale Modell des Heterodimers ermittelt worden sind. Dieses initiale Modell wurde darauffolgend über verschiedene Algorithmen und Prozeduren unter Berücksichtigung der strukturellen Informationen aus den *crosslink*-Experimenten verfeinert (nachzulesen in der Masterarbeit). Ein finaler Kandidat wurde mittels einer *molecular-dynamics*-Simulation (MD) auf dessen Stabilität innerhalb eines bestimmten Zeitraums überprüft. Im diesem Fall wurde ein Zeitraum von 50 ns in einem NF90-Puffer-analogen Milieu simuliert und die thermodynamische Güte des Modells bestätigt. Unter Berücksichtigung der

enthaltenen eindeutigen Fehler des Modells (C-Terminus von NF90 bzw. N-Terminus von NF45 verlaufen durch das NF90-Protein) werden im nachfolgenden Abschnitt Korrelationen sowie Struktur-Funktionsbeziehungen zwischen dem Modell und den experimentellen Daten zusammengefasst und das Modell mit der publizierten Kristallstruktur verglichen.

I) Das Homologie-Modell von NF90-NF45

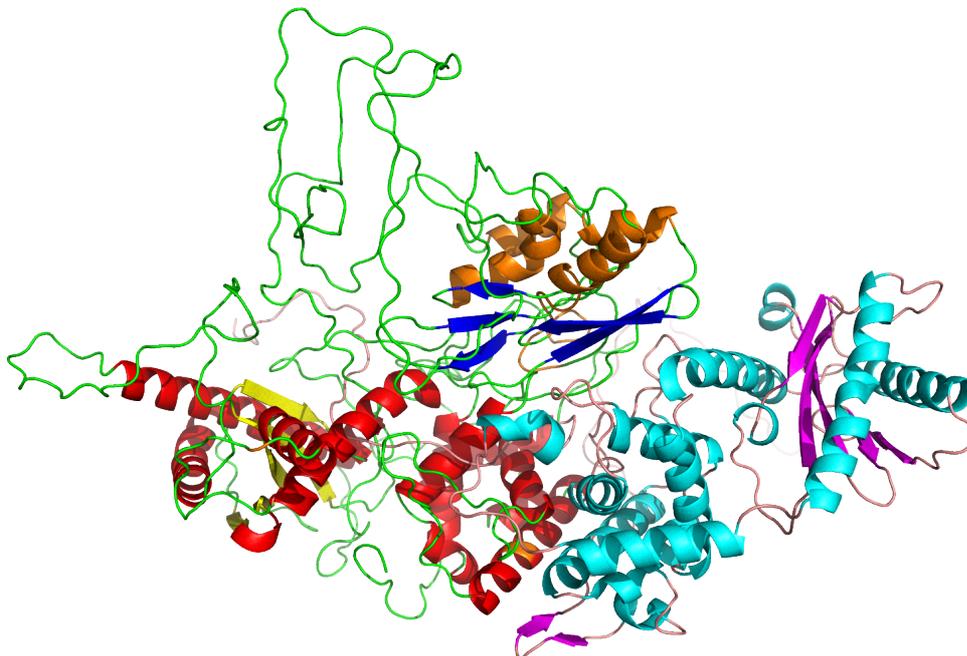


Abbildung A - 5: Das Homologie-Modell von NF90-NF45. Aus *alignments* der Primärstruktur von NF90 mit homologen Sequenzen anderer Proteine wurden Struktur-Template für das initiale Modell des Heterodimers entwickelt. Dieses initiale Modell wurde darauffolgend über verschiedene Algorithmen und Prozeduren unter Berücksichtigung der strukturellen Informationen aus den *crosslink*-Experimenten verfeinert. Das vorläufig finale Modell wurde mittels einer *molecular-dynamics*-Simulation (MD) auf dessen Stabilität innerhalb von 50 ns überprüft. Das Modell enthält noch wenige Fehler, wie z.B. den durch NF90 verlaufenden C-Terminus von NF45. Rot/gelb/grün – α -Helix, β -Faltblatt, *loop* von NF90; orange/blau - α -Helix, β -Faltblatt der dsRBMs von NF90; cyan/magenta/rosa – α -Helix, β -Faltblatt, *loop* von NF45.

- II) Die Interaktionsebene im Homologie-Modell ist gegenüber der Kristallstruktur geneigt.

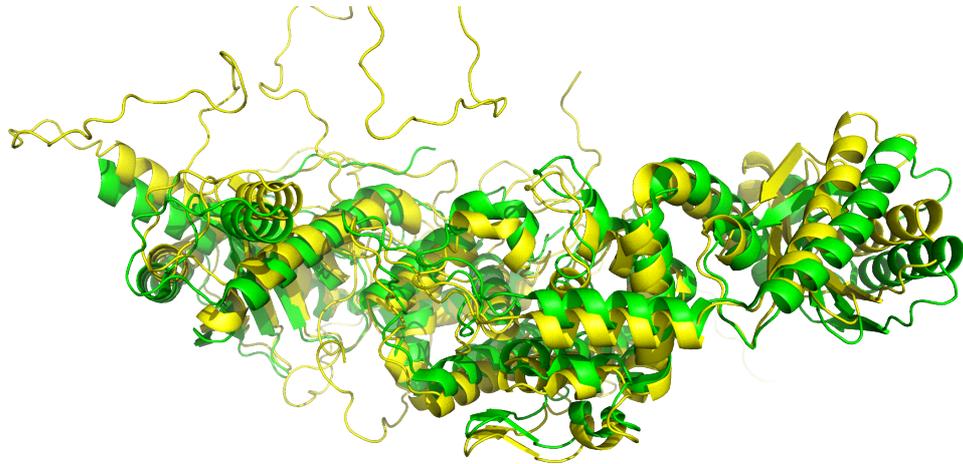


Abbildung A - 6: Die DZF-Domänen des Homologie-Modells sind geneigt. Der Vergleich der Struktur der DZF-Domänen des Modells und der Kristallstruktur (5) indiziert keine signifikanten Unterschiede in den Sekundärstrukturen sowie deren Faltung, außer dass die Achse, die die beiden DZF-Domänen definieren, im Homologie-Modell in der Interaktionsstelle gegen die dsRBMs geneigt ist. Für diese Eigenschaft des Homologie-Modells sind die *crosslink*-Informationen verantwortlich. Gelb – Homologie-Modell, grün - Kristallstruktur

- III) Indizien einer zweiten Interaktionsstelle sowie einer größeren Interaktionsfläche.

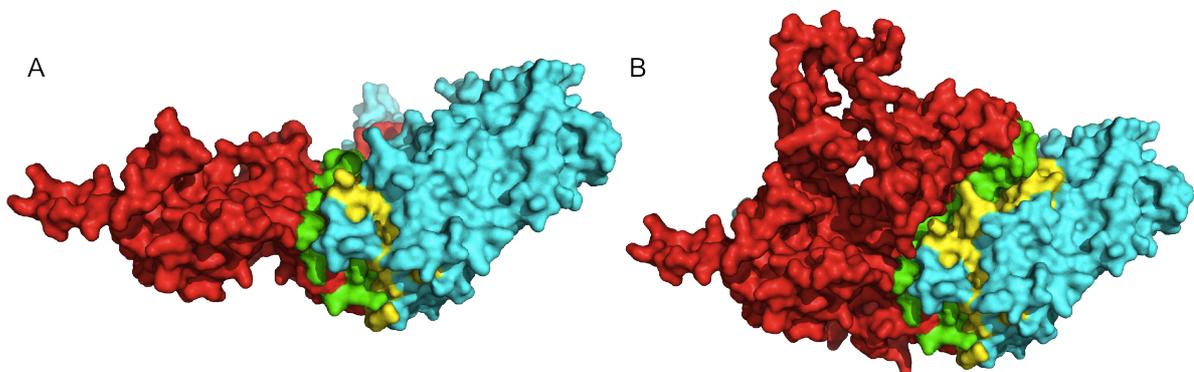


Abbildung A - 7: Das Homologie-Modell charakterisiert eine größere Interaktionsfläche. (A) In der publizierten Kristallstruktur beläuft sich die berechnete Interaktionsfläche auf $\sim 1700 \text{ \AA}^2$ und indiziert nur eine Interaktionsstelle (5). **(B)** Im Modell der vollständigen Proteine kann eine Fläche von $\sim 4000 - 5000 \text{ \AA}^2$ berechnet werden, die vor allem durch den zusätzlichen Beitrag der Faltung der dsRBMs gegen die Oberfläche von NF45 begründet ist (rot/grün – NF90 + Interaktionsfläche, cyan/gelb rot – NF45 + Interaktionsfläche). Die Frage, inwiefern die C-terminale RGG-Region von NF90 durch die Komplexbildung beeinflusst wird bzw. ob sie bei der Interaktion eine Rolle spielt, kann nicht direkt adressiert werden, da der strukturelle Zustand des NF90 Monomer nicht bekannt ist. Entsprechend des Modells scheint diese Region nicht unmittelbar in der Interaktion involviert zu sein, was die nicht-stabilisierende Modulation erklären könnte.

Die Neigung der DZF-Achse und die größere Interaktionsfläche führt zur Ausbildung von mehr Salzbrücken im Vergleich zum publizierten Interaktionsbereich der Kristallstruktur.

IV) Quenching der intrinsischen Trp-Fluoreszenz von NF45 durch die Komplexbildung.

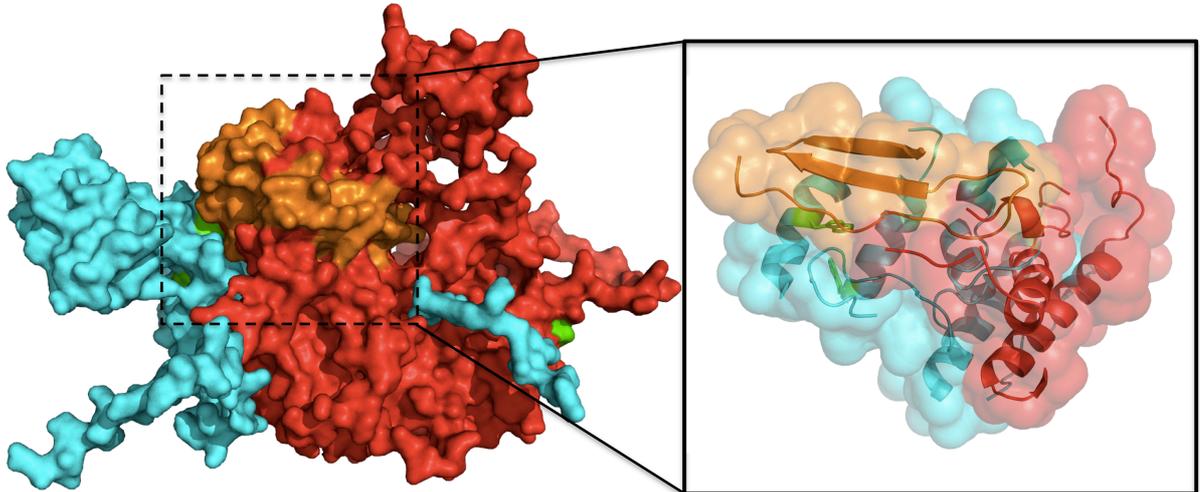


Abbildung A - 8: Quenching eines Tryptophans durch die Komplexbildung. Die Analyse der intrinsischen Fluoreszenz indizierte auf der Oberfläche exponierte Tryptophane von NF45, die infolge der Komplexbildung ein Quenching erfuhren (**Abb. 16**, rot – NF90, cyan – NF45, orange – dsRBMs, grün – Tryptophan; die lösungsmittelzugängliche Oberfläche ist dargestellt). Die modellierten dsRBMs sind in sehr großer räumlicher Nähe zu zwei Trp von NF45 lokalisiert, wodurch eine verminderte Zugänglichkeit und somit Quenching infolge der Komplexbildung indiziert wird. Im Gegensatz dazu scheinen die Trp von NF90 keine Veränderungen durch diesen Prozess zu erfahren.

- V) Die Anordnung der dsRBMs liefert eine Grundlage der Assoziation an dasselbe RNA-Molekül.

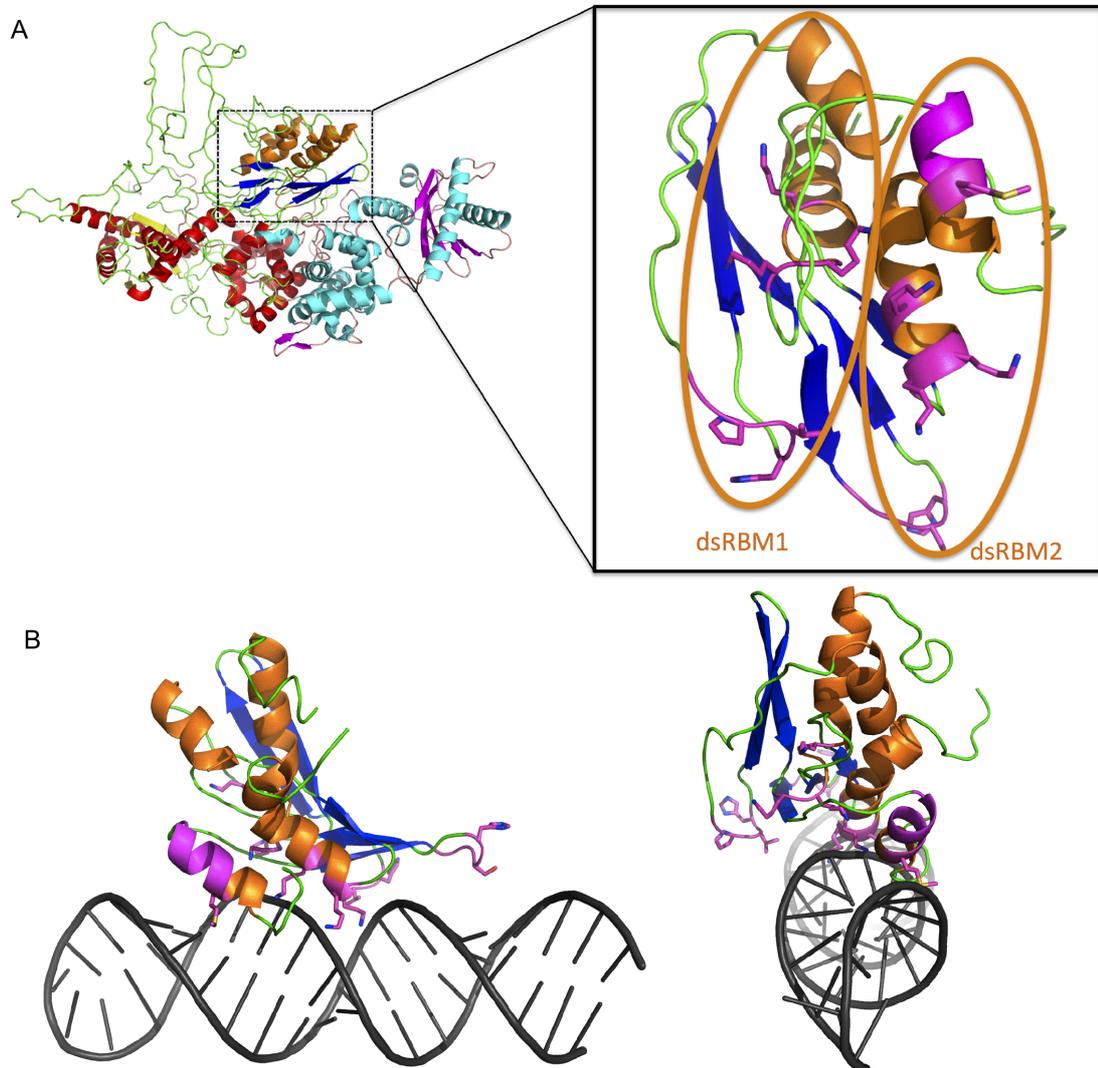


Abbildung A - 9: Parallele Anordnung der dsRBMs ermöglicht eine kooperative Bindung an RNA. Strukturelle Informationen über tandem-dsRBMs sind kaum verfügbar. Die Kristallstrukturen der tandem-dsRBMs von PKR, ADAR2 und DGCR8 charakterisieren unterschiedliche Eigenschaften (72, 79). Die ersten zwei Strukturen wurden im Komplex mit RNA gelöst, in denen die dsRBMs eine voneinander unabhängige Interaktion mit verschiedenen Stellen der RNA eingehen. In der dritten Struktur interagieren die dsRBMs derart miteinander, dass die RNA-bindenden Regionen entgegengesetzt orientiert vorliegen und vermutlich nicht an dasselbe RNA-Molekül binden können. Allen drei Strukturen ist gemeinsam, dass diese isoliert von der Proteinarchitektur gelöst wurden und daher eine mögliche Modulation durch den Proteinkomponente nicht identifiziert werden kann. Insgesamt spiegeln sie Charakteristika in ihrer Orientierung und RNA-Bindung wieder, die nicht im Homologie-Modell auftreten (A). Die dsRBMs von NF90-NF45 im Modell demonstrieren eine bisher nicht beschriebene Orientierung und Lokalisation zueinander. Aufgrund der Proteinarchitektur sind die dsRBMs direkt nebeneinander gepackt, wodurch die RNA-bindenden Regionen parallel und leicht versetzt ausgerichtet werden. (B) Ein *alignment* mit der RNA-dsRBM1-Struktur von ADAR2 verdeutlicht (ADAR2 nicht dargestellt), dass eine Bindung beider dsRBMs von NF90 leicht versetzt hintereinander denkbar ist. Somit würden die dsRBMs wie „ein“ Motiv mit doppelter Interaktionsfläche assoziieren. Diese Situation kann begründen, wie selbst kurze RNA-Moleküle in einer konzertierten Art von beiden dsRBMs assoziiert werden können, da diese nicht auf unterschiedlichen Seiten sondern hintereinander an der RNA angreifen. (rot/gelb/grün – α -Helix, β -Faltblatt, *loop* von NF90; orange/blau - α -Helix, β -Faltblatt der dsRBMs von NF90; cyan/magenta/rosa – α -Helix, β -Faltblatt, *loop* von NF45; magenta in Vergrößerung und (B) - RNA-bindende Region der dsRBMs; RNA aus Stefi *et al.* PDBid 2L2K, 66).

- VI) Die relative Lage aller RNA-bindenden Motive begründet deren Kooperativität und den Einfluss von NF45.

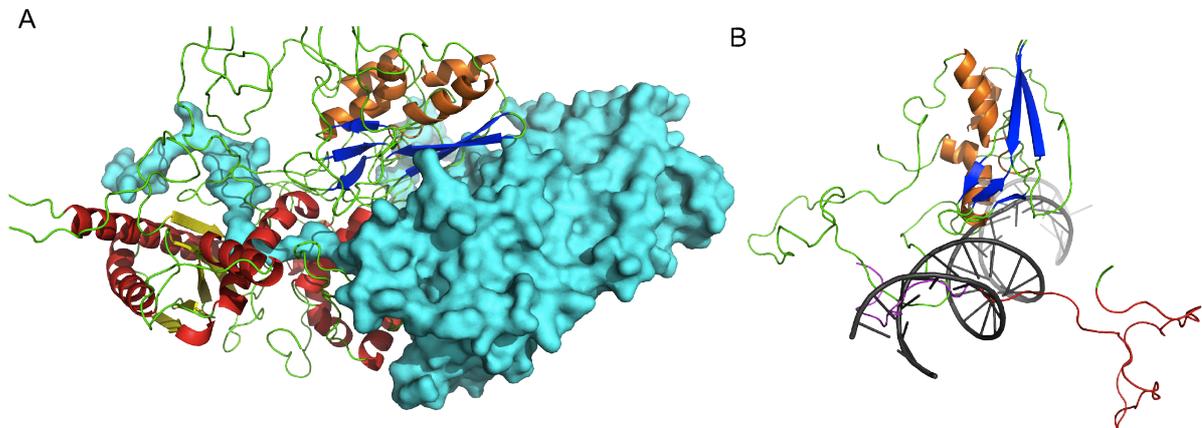


Abbildung A - 10: Die Bindung von NF45 induziert eine Kooperativität der RNA-bindenden Motive von NF90. (A) Der zuvor präsentierte Bindungsmodus der dsRBMs von NF90 unterstützt den diskutierten Einfluss von NF45 auf die Kooperativität dieser Motive. Aus der Gegebenheit, dass die Faltung der dsRBMs gegen NF45 eine große Interaktionsfläche darstellt, manifestiert sich unmittelbar der Effekt der Komplexbildung. Im Monomer könnte die relative Anordnung der dsRBMs zueinander eher ungeordnet und weniger fixiert sein, so dass die Interaktion von NF90 mit NF45 die dargestellte räumliche Orientierung und somit Kooperativität induzieren könnte. Darüber hinaus ist die RGG- und YGG-Region auch in großer räumlicher Nähe der dsRBMs. (B) Die Lage der Motive indiziert, dass das RGG-Motiv auf der gegenüberliegenden Seite der dsRBMs mit der RNA interagieren könnte (rot/gelb/grün – α -Helix, β -Faltblatt, *loop* von NF90; orange/blau - α -Helix, β -Faltblatt der dsRBMs von NF90; magenta – RGG-Motiv, rot in (B) YGG-Motiv, cyan - NF45).

PUBLIKATIONSLISTE

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Friedrich, S., Schmidt, T., Geissler, R., Lilie, H., Chabierski, S., Ulbert, S., Liebert, U. G., Golbik, R. P., and Behrens, S. E. (2014) AUF1 p45 promotes West Nile virus replication by an RNA chaperone activity that supports cyclization of the viral genome. *Journal of virology* **88**, 11586-11599

Schmidt, T., Knick, P., Lilie, H., Friedrich, S., Golbik, R. P., and Behrens, S. E. Coordinated action of two dsRBM and an RGG motif enables the RNA binding protein Nuclear Factor 90 to flexibly target different RNA substrates. *Nucleic Acids Research*. eingereicht

Schmidt, T., Knick, P., Lilie, H., Friedrich, S., Golbik, R. P., and Behrens, S. E. Deciphering the NFAR-complex NF90-NF45: complex formation facilitates RNA chaperone activity. Manuskript in Vorbereitung

Tagungsbeiträge-Vorträge

Schmidt, T., Knick, P., Golbik, R. P., and Behrens, S. E. Deciphering the NFAR-complex NF90-NF45: Revealing RNA chaperone activity. „Faltertage 2012“ 12-14.10.2012, Regensburg

Schmidt, T., Knick, P., Golbik, R. P., and Behrens, S. E. Deciphering the NFAR-complex NF90-NF45: Revealing RNA chaperone activity. „Forschergruppe 855“ 22.10.2012, Dresden

Schmidt, T., Knick, P., Herbst, S., Lilie, H., Golbik, R. P., Sinz, A. and Behrens, S. E. Deciphering the NFAR-complex NF90-NF45: complex formation facilitates RNA chaperone activity. „9th European Biophysics Congress“ 13.-17.7.13, Lissabon, Portugal

Schmidt, T., Knick, P., Herbst, S., Lilie, H., Golbik, R. P., Sinz, A. and Behrens, S. E. Deciphering the NFAR-complex NF90-NF45: complex formation facilitates RNA chaperone activity. „3rd Internation Meeting GRK1026“ 4.-6.11.13, Halle

Schmidt, T., Knick, P., Golbik, R. P., and Behrens, S. E. The heterodimerization of the NFAR-proteins NF90 and NF45 leads to domain stabilization and facilitates RNA chaperone activity. „Faltertage 2014“ 17-19.10.2014, Regensburg

Tagungsbeiträge-Poster

Schmidt, T.*, Friedrich, S.*, Knick, P., Geissler, R., Lilie, H., Golbik, R. P. and Behrens, S. E. Prepared for viral replication – how two flaviviral host factors preprocess the viral RNA genome to modulate its amplification. „39th Lorne Protein Conference“ 9.-13.2.14, Lorne, Australia

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 Fortschritt der Arbeit, den anregenden Diskussionen und Vorschlägen und seinem Vertrauen war er maßgeblich am Entstehen dieser Doktorarbeit beteiligt.

Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Milton T. Stubbs für die Förderung im Rahmen des Graduiertenkollegs 1026 „*conformational transitions in macromolecular interactions*“. Ein herzliches Dankeschön an PD Dr. Ulrich Arnold sowie Martina Richter für die engagierte Koordination des GRK und an alle Mitglieder für ein angenehmes Zusammenarbeiten. Die stetigen kritischen Diskussionen im Rahmen des GRK trugen viel zum Entstehen dieser Arbeit bei.

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

Mein großer Dank gilt PD Dr. habil. Ralph Peter Golbik für die stets kritischen und konstruktiven Anregungen und Hilfestellungen seit dem 2. Semester (von 18) sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Unsere zahlreichen Diskussionen waren ein wichtiges Element bei der Entstehung dieser Arbeit. In diesem Sinne: „Hi Ralph“ und Danke!

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Christine Hamann für die stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Reinigungsprozeduren der Proteine sowie im allgemeinen Laboralltag bedanken. Danke, das hat mir sehr geholfen.

Mein spezieller Dank gilt Dipl.-Biochemiker Paul Knick (ehem. MLU Halle-Wittenberg) für die sehr gute Zusammenarbeit zu Beginn des Projekts, deren Ergebnisse die Basis dieser Arbeit geliefert haben.

Bei Dr. Susann Friedrich möchte ich mich herzlich für die vielen motivierenden und kritischen Diskussionen und Anregungen sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Auf ihre Hilfsbereitschaft konnte ich stets vertrauen. Vielen Dank, Susi.

Ein ganz großer Dank gilt Nancy Funk. Ohne den ritualisierten Morgenkaffee wäre wohl so mancher Tag unausstehlich und unmöglich gewesen. Für dein stets offenes Ohr und deine andauernde Hilfsbereitschaft möchte ich mich sehr bedanken. Vielen Dank, meine LTA!

Ein großes Dankeschön gilt allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobielle Biotechnologie für ein freundliches und angenehmes Arbeitsklima. Es macht viel Spaß mit euch zusammenzuarbeiten.

PD Dr. habil. Hauke Lilie vom Institut für Biochemie und Biotechnologie der Universität Halle-Wittenberg danke ich für die Durchführungen der analytischen Ultrazentrifugationen und die anregenden Diskussion zu Inhalten dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Andrea Sinz vom Institut für Pharmazie sowie Dr. Sabine Herbst (AG Biosynthese von Wirkstoffen, MLU Halle-Wittenberg) möchte ich mich für die Zusammenarbeit bei den *crosslinking*-Experimenten sowie deren Auswertung bedanken.

Bei PD Dr. Iris Thondorf und M.Sc Phil-Eric Jentschke der AG Molecular Modeling möchte mich sehr für die Anfertigung des Homologiemodells von NF90-NF45 bedanken.

Zu guter Letzt gilt der größte Dank meiner Familie (A- und B-Familie), meinen Eltern, meiner Schwester Franziska und besonders Hanna. Vielen Dank liebe Eltern, vielen Dank Fran für eure stetige Unterstützung in allen erdenklichen Weisen. Viele Dank Hanna, du warst und bist mein sicherer Hafen. Vielen Dank für dein unentwegtes Verständnis und vor allem deine Liebe.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Schmidt
Vorname	Tobias
Anschrift	Krausenstrasse 2, 06112 Halle/Saale
Geburtsort	Halle
Geburtsdatum	06.09.1987
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

1998 – 2006	Abitur, Georg-Cantor-Gymnasium, Halle/Saale
2006 – 2011	Studium Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplom (1.1); Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens und PD Dr. Ralph P. Golbik
seit 2011	Promotion im GRK1026 “Conformational transitions in macromolecular interactions”, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, angefertigt in der AG „Mikrobielle Biotechnologie“ Prof. Sven-Erik Behrens; Betreuer: Prof. Sven-Erik Behrens und PD Dr. Ralph P. Golbik
seit 03/2015	wissenschaftlicher Mitarbeiter im GO-Bio Projekt „Verovaccines“

Stipendien

2008 – 2011	Stipendiat der “Studienstiftung des deutschen Volkes”
2011 – 2014	Stipendiat des Graduiertenkollegs 1026 “Conformational transitions in macromolecular interactions”

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

Tobias Schmidt