

Charakterisierung nuklearer Funktionen des Nichtstrukturproteins von Influenza B Virus

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Jana Schneider

aus Berlin

Mai, 2009

**Angefertigt von September 2005 bis Mai 2009
unter der Leitung von PD Dr. Thorsten Wolff
am Robert Koch-Institut in Berlin**

1. Gutachter: PD Dr. Thorsten Wolff

2. Gutachter: Prof. Rupert Mutzel

Disputation am 29. Juni 2009

1.	EINLEITUNG	
1.1.	Das Influenza Virus	1
1.1.1	Taxonomie	3
1.1.2	Morphologie	3
1.1.3	Genomorganisation und kodierte Proteine	4
1.1.4	Replikation	6
1.1.5	Reverse Genetik bei Influenza Viren	9
1.2	Der Zellkern	11
1.2.1	Organisation des Zellkerns	11
1.2.2	Nuklearer Import und Export von Proteinen	13
1.2.3	Nuklearer Export von RNA-Molekülen	15
1.3	Das NS1 Nichtstrukturprotein von Influenza A und B Virus	20
1.4	Fragestellung	27
2.	MATERIAL UND METHODEN	
2.1	Material	28
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	28
2.1.2	Zelllinien	29
2.1.3	Virusstämme	29
2.1.4	Bakterienstämme	30
2.1.5	Medien für Bakterien	30
2.1.6	Medien für Zellkultur	31
2.1.7	Restriktionsendonukleasen	31
2.1.8	Enzyme	32
2.1.9	Kits	32
2.1.10	Oligonukleotide	32
2.1.11	Plasmide	34
2.1.12	Antikörper	35
2.1.13	Puffer und Lösungen	36
2.1.14	Geräte	38
2.2	Methoden	39
2.2.1	Zellkultur	39
2.2.1.1	Passagieren von Zellen	39
2.2.1.2	Einfrieren von Zellen	40
2.2.1.3	Transfektion von eukaryotischen Zellen	40
2.2.1.4	Infektion von eukaryotischen Zellen mit Influenza B Viren	40
2.2.2	Arbeiten mit Influenza B Viren	41
2.2.2.1	Virusanzucht im Hühnerei	41
2.2.2.2	Hämagglutinationstest (HA-Test)	42
2.2.2.3	Titerbestimmung von Influenza B Viren durch Immunfluoreszenzanalyse	42
2.2.2.4	Isolierung viraler RNA	43
2.2.3	Herstellung der rekombinanten Influenza B/Lee Viren #3/47 und #2/3	43
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	43
2.2.4.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	43
2.2.4.2	Reverse Transkription	44
2.2.4.3	Restriktionsverdau	45
2.2.4.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	46
2.2.4.5	Reinigung und Aufkonzentrieren von PCR-Fragmenten	46
2.2.4.6	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel	46
2.2.4.7	Isolierung von DNA und RNA durch Phenol-Chloroform Extraktion und Ethanol-Fällung	46

2.2.4.8	Ligation von DNA-Fragmenten	47
2.2.4.9	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> durch Hitzeschock	47
2.2.4.10	Plasmidpräparationen	47
2.2.4.11	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	48
2.2.4.12	DNA-Sequenzierung nach Sanger	49
2.2.4.13	Herstellung der pGex-Plasmide für die Expression von GST-Fusionsproteinen	50
2.2.4.14	Mutagenese von pHW-Lee-NS zur Herstellung von pHW-Lee-NS#3/47 und #2/3	50
2.2.4.15	Subklonierung trunkierter B/NS1 Fragmente in die Vektoren pHM829 bzw. pHM839	51
2.2.4.16	Subklonierung von B/NS1 Fragmenten in pHM829 mit dem BD In-Fusion™ PCR Klonierungssystem	51
2.2.5	Zellbiologische Methoden	52
2.2.5.1	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	52
2.2.5.2	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)	53
2.2.6	Proteinbiochemische Methoden	53
2.2.6.1	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
2.2.6.2	Immunoblot	54
2.2.6.3	Fixieren und Trocknen von SDS-PAA-Gelen	54
2.2.6.4	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	54
2.2.6.5	<i>In vitro</i> Translation	55
2.2.6.6	GST-Kopräzipitationsexperimente	56
2.2.6.7	RNA-Immunopräzipitation (RIP)	56
3.	ERGEBNISSE	58
3.1	Charakterisierung der Interaktion von B/NS1 mit nuklearen Speckle-Domänen	59
3.1.1	Die Interaktion von B/NS1 mit Speckle-Domänen ist in Influenza B Viren konserviert und in verschiedenen tierischen Zellen detektierbar	59
3.1.2	Transient exprimiertes B/NS1 Protein kolokalisiert mit verschiedenen Speckle-assoziierten zellulären RNA-Prozessierungsfaktoren	61
3.2	Identifizierung und Charakterisierung eines nuklearen Lokalisationssignals (NLS) in der B/NS1 Sequenz	62
3.2.1	Die N-terminalen 104 Aminosäuren von B/NS1 vermitteln sowohl die nukleare Lokalisation als auch Speckle-Assoziation eines β -Galaktosidase-GFP Fusionsproteins	63
3.2.2	Der Austausch der basischen Aminosäuren in der B/NS1 Sequenz 47-54 zu Alanin verhindert eine nukleare Lokalisation des Proteins	64
3.2.3	Die B/NS1 Aminosäuren 46-56 vermitteln den nuklearen Import von bakterieller β -Galaktosidase und fungieren daher als autonomes NLS	65
3.2.4	Das B/NS1 Protein interagiert mit dem zellulären Importrezeptor Importin α	65
3.2.5	Die basischen Aminosäuren in der B/NS1 Aminosäuresequenz 46-56 vermitteln die Bindung von β -Galaktosidase an Importin α	68
3.3	Identifizierung und Charakterisierung von B/NS1 Sequenzelementen, welche eine Speckle-Interaktion vermitteln	69
3.3.1	Die basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 sind für eine Speckle-Interaktion essentiell	69
3.3.2	Die B/NS1 Aminosäuren 1-90 sind für eine Interaktion mit nuklearen Speckle-Domänen essentiell	70
3.4	Analyse der Speckle-Assoziation von B/NS1 im Kontext rekombinanter Influenza B Viren und der Einfluss auf Virusreplikation	71
3.4.1	Herstellung von rekombinanten Influenza B Virusmutanten mit 4-5 Alaninaustauschen der basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1	72
3.4.2	Lokalisationsanalyse der B/NS1-NLS Proteinmutanten im Kontext einer Virusreplikation	73
3.4.3	Replikationsanalysen der rekombinanten Influenza B Virusmutanten in aviären, kaninen und humanen IFN-kompetenten und -defizienten Systemen	74

3.5	Einfluss der basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 auf Dimerisierung und ISG15-Bindung	76
3.5.1	Alaninaustausche von 2-5 basischen Aminosäuren in der B/NS1 Sequenz 47-54 vermindern die Bildung von B/NS1-Dimeren	76
3.5.2	Alaninaustausche von 2-5 basischen Aminosäuren in der B/NS1 Sequenz 47-54 haben keinen Einfluss auf die ISG15 Bindung	77
3.6	Der Export des B/NS1 Proteins aus dem Zellkern in das Zytoplasma erfolgt unabhängig vom zellulären Exportrezeptor Crm1	78
3.7	Spiegelt die Interaktion von B/NS1 mit nuklearen Speckle-Domänen eine Funktion des Proteins im mRNA Transport wider?	79
3.7.1	B/NS1 bindet an die zelluläre RNA-Helikase UAP56 im GST-Kopräzipitationsassay	80
3.7.2	B/NS1 bindet an den zellulären mRNA-Exportfaktor Tap/NXF1 im GST-Kopräzipitationsassay	81
3.7.3	RNase-Behandlung hat einen negativen Einfluss auf die Bindung von B/NS1 an UAP56 und einen positiven auf die Tap-Bindung	82
3.7.4	B/NS1 kopräzipitiert mit zellulärer und viraler mRNA aus infizierten Zellsyaten	83
4.	DISKUSSION	
4.1	Übersicht der Ziele dieser Arbeit	86
4.2	Die Fähigkeit des NS1 Proteins zur Interaktion mit Speckle-Domänen ist in verschiedenen Influenza B Virusstämmen konserviert und unabhängig vom Wirt	87
4.3	Identifizierung und Charakterisierung eines nuklearen Lokalisationssignals im B/NS1 Protein	88
4.4	Die N-terminalen 90 Aminosäuren von B/NS1 vermitteln die Interaktion mit nuklearen Speckle-Domänen	91
4.5	Influenza B Virusmutanten, deren NS1 Proteine die Fähigkeit zur Kernlokalisierung und Speckle-Interaktion verloren haben, sind in ihrer Replikation eingeschränkt	92
4.6	Das B/NS1 Protein interagiert mit zellulären mRNA Exportfaktoren	93
4.7	Influenza Viren und der nukleare Export ihrer mRNA – ein Modell	95
4.8	Ausblick	98
	Zusammenfassung	100
	Summary	101
	Abkürzungsverzeichnis	
	Literaturverzeichnis	
	Auszeichnungen und Veröffentlichungen	
	Anhang	

1. EINLEITUNG

Viren sind die kleinsten selbst replizierenden Lebensformen. Sie besitzen keinen eigenen Metabolismus und sind daher auf Wirte angewiesen, deren zelluläre Mechanismen sie sich für ihre Replikation und Verbreitung zu Eigen machen. Die Erforschung von Viren und deren Wechselwirkungen mit dem Wirt brachte grundlegende Prinzipien der Biologie hervor. Vor gut 20 Jahren wurde zum Beispiel in der Aminosäuresequenz des großen T Antigens von Simian Virus 40 (SV40) das erste nukleare Lokalisationssignal entdeckt (Kalderon *et al.*, 1984). Dies war ein entscheidender Hinweis darauf, dass der Transport von Proteinen in den Zellkern signalvermittelt stattfindet. Neben der Aufklärung des Proteinimports trugen Virologen auch zur Entdeckung des nuklearen Crm1-abhängigen Proteinexportwegs sowie des Exports zellulärer mRNA durch das Tap/NXF1 Protein bei (Gruter *et al.*, 1998; Fornerod *et al.*, 1997).

Im Fokus dieser Arbeit stand das Influenza B Virus, das in manchen Wintern der dominierende Virustyp ist. Influenza Viren replizieren im Kern der Wirtszelle und mussten daher Mechanismen entwickeln, um virale Komponenten in den und aus dem Nukleus zu transportieren und eine bevorzugte Expression viraler Gene zu erreichen. Der Export genomischer viraler RNA wurde bereits intensiv untersucht, doch bis heute weiß man wenig über den Export der viralen mRNA. Es gibt Hinweise, dass das Nichtstrukturprotein NS1 von Influenza Virus bei dieser Funktion eine wichtige Rolle spielt. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die Wechselwirkungen des NS1 Proteins von Influenza B Virus mit nuklearen Funktionen untersucht.

1.1 Das Influenza Virus

Influenza Viren sind die Erreger der Virusgrippe. Sie werden durch Aerosole übertragen, infizieren zunächst die Epithelzellen der Mund-, Nasen- und Rachenschleimhaut und breiten sich dann abhängig vom Infektionsverlauf in den oberen und unter Umständen auch in den unteren Respirationstrakt aus. Die allgemeinen Symptome einer Virusgrippe sind Kopfschmerzen, Schüttelfrost, Husten, Muskel- und Gliederschmerzen sowie hohes Fieber. Bei leichten Verläufen klingen die Symptome nach wenigen Tagen ab. Schwere Krankheitsverläufe treten bei älteren und immunsupprimierten Menschen auf und können zu einer interstitiellen Lungenentzündung führen. Auch wird vorgeschädigtes Epithel schneller durch Bakterien infiziert, was sekundäre Pneumonien, Meningitis, Kreislaufschäden und Myokarditis verursachen kann. Influenza A und B Virusinfektionen verursachen die gleiche klinische Symptomatik. Beide Virustypen kozirkulieren jährlich zu unterschiedlichen Anteilen, wobei Influenza B Viren in manchen Jahren dominieren. Trotz groß angelegter Impfkampagnen kommt es fast jährlich zu saisonalen Grippewellen, welche eine große sozio-ökonomische Belastung darstellen. In der Saison 2006/2007 kam es allein in Deutschland zu geschätzten 1,9-3,5 Millionen Erkrankungen, 0,9-1,2 Millionen Arbeitsunfähigkeiten und 14000 Hospitalisierungen (Saisonabschlussbericht der AG Influenza; 2007/2008). Die saisonalen Grippeerkrankungen werden durch Influenza Viren hervorgerufen, die

gegenüber den Virusstämmen des Vorjahres leichte Veränderungen der antigenen Eigenschaften ihrer Oberflächenproteine aufweisen. Diese gehen auf Punktmutationen im viralen Genom zurück und werden als „antigenic drift“ bezeichnet. Neben den lokal begrenzt auftretenden Epidemien gibt es die weitaus gefährlichere Bedrohung einer globalen Pandemie. In den letzten 100 Jahren kam es zu drei großen Pandemieausbrüchen, 1918 die „Spanische Grippe“, 1957 die „Asiatische Grippe“ und 1968 die „Hongkong Grippe“. Sie wurden durch Influenza A Viren hervorgerufen, deren Oberflächenproteine gegenüber den bis dahin zirkulierenden Viren so stark verändert waren, dass es in der Bevölkerung keine ausreichend schützende Immunität gab. Diese drastische Veränderung der antigenen Eigenschaften nennt man „antigenic shift“. Erreger der „Spanischen Grippe“ war der Influenza A Virussubtyp H1N1. Es wird angenommen, dass dieses ursprünglich aviäre Virus durch Adaptation zunächst auf den Menschen und dann von Mensch-zu-Mensch übertragbar wurde. Bei den Erregern der „Asiatischen“ und der „Hongkong Grippe“ handelte es sich um Influenza A Virusreassortanten der Subtypen H2N2 bzw. H3N2. Virusreassortanten entstehen durch Doppelinfektionen mit zwei verschiedenen Virussubtypen. Infizieren zwei verschiedene Virussubtypen gleichzeitig einen Wirt können am Ende des Replikationszyklus Viren assemblieren, welche Genomsegmente beider Virussubtypen tragen (Palese, 1977). Dies kann neben weiteren Adaptationen in seltenen Fällen zu einer Mensch-zu-Mensch Übertragung hoch-pathogener Viren führen. Das Influenza Virus der „Asiatischen“ Grippepandemie von 1957 besaß fünf Segmente des humanen H1N1 Virus und die neu erworbenen Segmente PB1, HA und NA eines aviären H2N2 Virus (Scholtissek *et al.*, 1978). Das momentan zirkulierende Vogelgrippevirus H5N1 wurde 1997 erstmals in Hong-Kong direkt von infiziertem Geflügel auf einen Menschen übertragen. Seit 2003 gab es 424 H5N1 Infektionen beim Menschen, 261 davon verliefen tödlich (WHO, Stand vom 15.05.2009). Bisher ist noch nicht ausreichend geklärt, auf welche Eigenschaften die hohe Pathogenität des Virus zurückzuführen ist. Sollte das Virus die Fähigkeit einer Mensch-zu-Mensch Transmission erwerben, könnte dies zum Ausbruch einer Pandemie führen. Wie aktuell die Gefahr einer neuen Pandemie ist, zeigen derzeit die erstmals im April 2009 in Mexiko aufgetretenen Grippeerkrankungen beim Menschen, verursacht durch ein Influenza A Virus des Subtyps H1N1, das verwandt zu porcinen Influenza A Viren ist, die in Nordamerika zirkulierten. Das neue Influenza Virus ist eine Triple-Reassortante mit internen Segmenten aus humanen (PB1), porcinen (NS, NP, M) und aviären (PB2, PA) Influenza Viren. Im Gegensatz zum ursprünglichen Virus besitzt es das HA und das M Segment eines eurasischen Schweinegrippevirus des Subtyps H1N1. Inwieweit diese Segmentaustausche zu der sehr effizienten Mensch-zu-Mensch Übertragung des Virus beitragen, bleibt zu klären. Bis heute wurden laut WHO 8480 Infektionen mit dem neuen Influenza A Virus beim Menschen in 39 Ländern bestätigt. Es gab 72 Todesfälle, davon allein 66 in Mexiko (WHO, Stand vom 17.05.2009; 8:00 GMT). Die Weiterentwicklung dieser Situation kann derzeit nicht vorhergesagt werden.

Influenza B Viren haben ein auf Menschen und vermutlich Seehunde beschränktes Wirtsspektrum und weisen zwei phylogenetisch distinkte Linien, jedoch keine unterschiedlichen Subtypen auf. Daher besitzen sie wahrscheinlich kein pandemisches Potential. Dennoch verändern sich durch „antigenic drift“ auch bei

diesem Virustyp die antigenen Epitope, was eine jährliche Überprüfung der Impfvirusstämme und gegebenenfalls eine Anpassung an die zirkulierenden Viren durch die WHO nötig macht.

1.1.1 Taxonomie

Das Influenza Virus gehört zur Familie der *Orthomyxoviridae* (griech.: ortho = richtig; myxo = Schleim). Diese Virusfamilie umfasst neben den drei Influenza Typen A, B und C die Thogotoviren und die Isaviren. Das Influenza A Virus besitzt ein sehr breites Wirtsspektrum. Es infiziert Menschen, Schweine, Pferde und eine Vielzahl frei lebender und domestizierter Vogelspezies. Natürliche Infektionen mit Influenza B Virus kommen dagegen nur in Menschen und eventuell Seehunden vor. Influenza C Virusinfektionen findet man bei Menschen und Schweinen, diese sind jedoch selten und klinisch wenig relevant. Influenza Viren können aufgrund der antigenen Eigenschaften der internen Strukturproteine NP (Nukleoprotein) und M1 (Matrixprotein) voneinander unterschieden werden. Influenza A Viren werden aufgrund unterschiedlicher antigenen Eigenschaften ihrer Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) in verschiedene Subtypen unterteilt. Bis heute kennt man 16 verschiedene Hämagglutinine (H1 bis H16) und neun verschiedene Neuraminidasen (N1 bis N9). Benannt werden die Viren nach einem von der WHO festgelegten Schema. Der Angabe des Virustyps (A, B oder C) folgt die Spezies, aus welcher das Virus isoliert wurde, der Ort der Erstisolation, die Nummer des Isolats, das Isolationsjahr und bei Influenza A Viren die Angabe des Subtypen; Bsp.: A/chicken/Hongkong/258/97 (H5N1). Bei human-pathogenen Influenza Viren entfällt die Angabe der Spezies.

1.1.2 Morphologie

Orthomyxoviren sind membranumhüllte Viren, welche ein segmentiertes negativ polarisiertes RNA-Genom aufweisen (s. 1.1.3). Influenza A und B Viren besitzen acht Genomsegmente (Abb. 1.1). Die Viruspartikel sind kugelförmig bis pleomorph und haben einen Durchmesser von 80-120 nm. In die von der Wirtszelle abgeleitete Virusmembran (Kates *et al.*, 1962) sind die viralen Glykoproteine Hämagglutinin

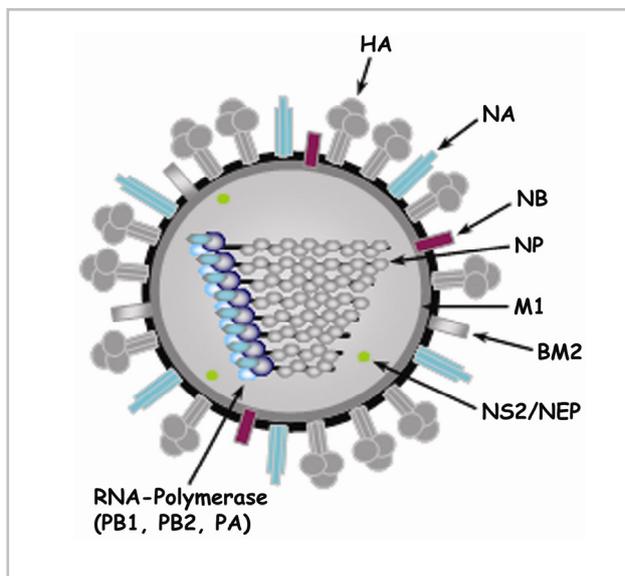


Abb. 1.1: Darstellung eines Influenza B Viruspartikels

(HA) und Neuraminidase (NA) eingelagert. Das Hämagglutinin bildet Homotrimere und vermittelt die Rezeptorbindung und Fusion, die Neuraminidase hingegen liegt als Homotetramer vor und vermittelt die Abspaltung endständiger N-Acetylneuraminsäuren. Ein weiteres Transmembranprotein von Influenza A Viren ist das M2 Protein, welches Homotetramere bildet, die als Protonenkanäle fungieren (Pinto *et al.*, 1992; Sugrue and Hay, 1991). Bei Influenza B Viren sind zwei weitere integrale Membranproteine namens NB und BM2 zu finden, wobei letzteres ebenfalls

Ionenkanalaktivität besitzt (Paterson *et al.*, 2003; Odagiri *et al.*, 1999; Betakova *et al.*, 1996). Das Matrixprotein M1 kleidet die Membraninnenseite aus und ist mit den acht viralen Ribonukleoproteinkomplexen (vRNPs) assoziiert. Die vRNPs bestehen aus den acht viralen RNA-Segmenten, welche über die gesamte Länge mit dem Nukleoprotein komplexiert sind und einen Polymerasekomplex tragen (Tiley *et al.*, 1994; Compans *et al.*, 1972). Weiterhin liegt eine geringe Kopienzahl des nuklearen Exportproteins NS2/NEP im Viruspartikel vor (Yasuda *et al.*, 1993). Das Nichtstrukturprotein NS1 wird nicht ins Viruspartikel verpackt, sondern wird nur in der infizierten Zelle exprimiert.

1.1.3 Genomorganisation und kodierte Proteine

Die genetische Information von Influenza A und B Viren ist auf acht einzelsträngigen RNA-Segmenten mit einer Länge von 0,9 – 2,4 kb und einer Gesamtgenomlänge von 13,6 kb (Typ A) – 14,6 kb (Typ B) kodiert. Die virale RNA (vRNA) besitzt nach Konvention eine negative Polarität, da von ihr positiv orientierte Boten-RNA (mRNA) transkribiert wird. Die kodierenden Bereiche der vRNA-Segmente sind von segmentspezifischen nichtkodierenden Bereichen flankiert. Jedoch sind die ersten 13 (Typ A) bzw. 10 (Typ B) Nukleotide am 5' Ende und die ersten 12 (Typ A) bzw. 10 (Typ B) Nukleotide am 3' Ende in allen acht Segmenten der Influenza A und B Viren und auch zwischen verschiedenen Virusstämmen konserviert (Desselberger *et al.*, 1980). Die terminalen Regionen bilden die Influenza Virus-spezifischen Promotorstrukturen für die Transkription und Replikation durch den RNA-abhängigen viralen RNA-Polymerasekomplex (Flick *et al.*, 1996), welcher aus den viralen Proteinen PB1, PB2 und PA besteht. Die Bereiche der 5' und 3' Enden sind teilweise komplementär, wodurch es nach dem „Korkenzieher-Modell“ zu Basenpaarungen zwischen den vRNA-Termini und der Bildung von Haarnadelstreifen innerhalb der vRNA-Termini kommt. Die „Korkenzieher“-Struktur ist maßgebend für die Aktivität des viralen Promotors, da sie die Interaktion zwischen Promotor und Polymerasekomplex stabilisiert und somit die vRNA und mRNA Synthese ermöglicht. Das gleiche Modell gilt für die cRNA-Enden (Neumann *et al.*, 2004).

Die acht viralen RNA-Segmente kodieren für je ein bzw. zwei Proteine. Die drei größten RNA-Segmente kodieren für die viralen Polymerase-Untereinheiten. Bei einer Vielzahl von Influenza A Virusstämmen ist in einem alternativen Leserahmen auf Segment zwei neben dem PB1 Protein das proapoptotische Protein PB1-F2 kodiert (Chen *et al.*, 2001). Das vierte und fünfte RNA-Segment kodiert entsprechend für das Hämagglutinin und das Nukleoprotein. Das sechste RNA-Segment kodiert für die Neuraminidase und bei Influenza B Viren zusätzlich für das NB Protein (Shaw *et al.*, 1983). Die beiden kleinsten Segmente sind bei beiden Virustypen bicistronisch angeordnet und kodieren je zwei Proteine. Segment sieben kodiert das M1 und das M2 Protein bei Influenza A Virus bzw. das BM2 Protein bei Influenza B Virus. Das M2 Protein wird von einer gespleißten mRNA translatiert. Die Translation der BM2 mRNA hingegen wird durch einen Stop-Start-Mechanismus initiiert, da das Stopkodon von M1 mit dem Startkodon von BM2 überlappt (Horvath *et al.*, 1990). Auf dem achten Segment sind das Nichtstrukturprotein NS1 und das

nukleare Exportprotein NS2/NEP kodiert. Wie das M2 Protein wird auch das NS2/NEP Protein von einer gespleißten mRNA translatiert. In der Tabelle 1.1 sind die Eigenschaften und Funktionen der viralen Proteine zusammengefasst.

Tab. 1.1: Eigenschaften der vRNA Segmente und viralen Proteine von Influenza A und B Virus (Wolff and Snacken, 2003). Nukleotide (nt); Aminosäuren (aa)

Segment	A/PR/8/34		B/Lec/40		Funktionen
	vRNA (nt)	Kodiertes Protein (aa)	vRNA (nt)	Kodiertes Protein (aa)	
1	2341	PB2 (759)	2396	PB2 (770)	Untereinheit der viralen RNA-Polymerase, bindet mRNA-caps;
2	2341	PB1 (757) PB1-F2 (87)	2368	PB1 (752)	Katalytische Untereinheit der viralen RNA-Polymerase, Endonukleaseaktivität; Mitochondriale Lokalisation, Induktion von Apoptose;
3	2233	PA (716)	2304	PA (726)	Untereinheit der viralen RNA-Polymerase;
4	1778	HA (565)	1882	HA (584)	Hämagglutinin, Membranfusion, Typ I Membranprotein, Rezeptorbindung, Induktion neutralisierender Antikörper;
5	1565	NP (498)	1841	NP (560)	Nukleoprotein, Enkapsidierung von vRNA und cRNA, über NLS Kernlokalisierung der RNPs;
6	1413	NA (454)	1557	NA (466) NB (100)	Neuraminidase, Typ II Membranprotein; Strukturprotein;
7	1027	M1 (252) M2 (97)	1191	M1 (248) BM2 (109)	Matrixprotein, wichtig für Morphogenese; Ionenkanal, Ansäuerung der Virionen, Schutz der HA-Konformation; Ionenkanal;
8	890	NS1 (230) NS2/NEP (121)	1096	NS1 (281) NS2/NEP (122)	Post-transkriptionaler Regulator und IFN-Antagonist (FluA), inhibiert PKR-Aktivierung; Nuklearer Exportfaktor

1.1.4 Replikation

Influenza Viren vermehren sich in permissiven Zellen und sind für eine produktive Replikation auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse angewiesen (Abb. 1.2).

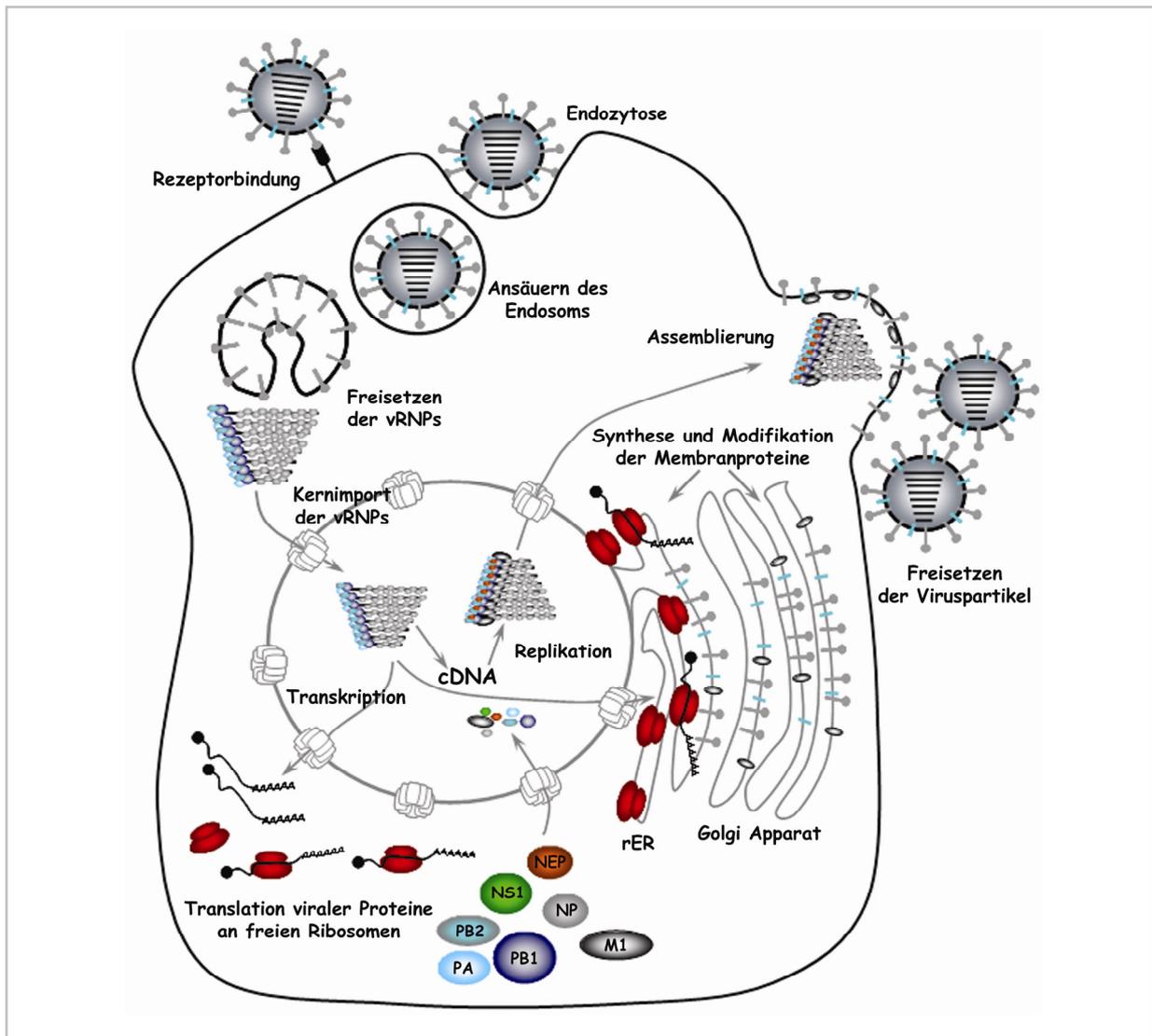


Abb. 1.2: Schema des Replikationszyklus von Influenza Virus

Um in die Zelle zu gelangen, bindet das HA an endständige N-Acetyl-Neuraminsäuren zellulärer Rezeptoren (Skehel and Wiley, 2000). Die Viren werden anschließend durch Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert (Matlin *et al.*, 1981). Aufgrund einer Ansäuerung in den späten Endosomen kommt es zu einer Konformationsänderung im HA, welche die Exposition eines hydrophoben Fusionspeptids in der HA2-Untereinheit bewirkt. Dieses dringt in die Endosomenmembran ein und durch weitere Umlagerungen im HA kommt es zu einer Fusion von viraler und endosomaler Membran (Skehel and Wiley, 2000). Gleichzeitig wird der pH-Wert im Inneren des Virions durch den Einstrom von Protonen über M2-Ionenkanäle weiter erniedrigt. Dies führt zur Destabilisierung der Bindung vom Matrixprotein M1 an die vRNPs, welche daraufhin über Fusionsporen ins Zytoplasma der Zelle freigesetzt werden (Helenius, 1992). Bei Influenza B Viren wird dieser Prozess vermutlich durch das BM2 Protein

vermittelt (Mould *et al.*, 2003). Eine Blockade der Ionenkanalaktivität von M2 durch Amantadin führt zu einer Inhibition der Influenza A Virusreplikation (Steinhauer *et al.*, 1991).

Die vRNPs sind mit 10-20 nm Umfang zu groß, um passiv durch die Kernporen in den Zellkern zu gelangen (Area *et al.*, 2004). Alle mit den vRNPs assoziierten Proteine, die viralen Polymerase-Untereinheiten und NP, besitzen nukleare Lokalisationssignale (NLS) (Abb. 1.3 A) (Smith *et al.*, 1987). Der Kernimport wird vermutlich allein durch das NLS im NP und dessen Interaktion mit Importin α vermittelt (Abb. 1.3 B) (Cros *et al.*, 2005; O'Neill *et al.*, 1995).

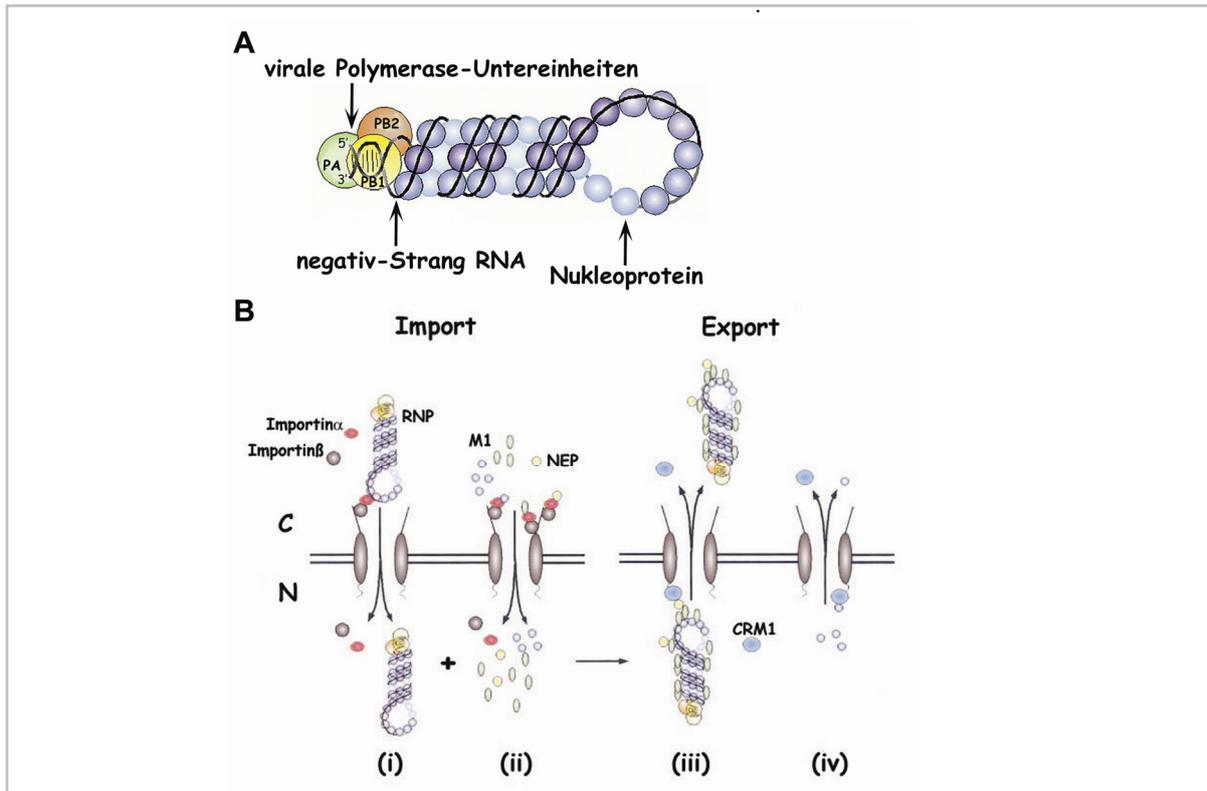


Abb. 1.3: Nuklearer Import und Export von Influenza Virus RNPs (Portela and Digard, 2002). (A) Schema der vRNP Organisation. vRNPs bestehen aus negativ orientierter einzelsträngiger RNA, den drei viralen Polymerase-Untereinheiten und dem Nukleoprotein. (B) Model der Import- und Exportmechanismen. (i) RNPs und (ii) die viralen Proteine NP, M1 und NS2/NEP werden Importin α/β -vermittelt in den Zellkern importiert. (iii) Der vRNP Export erfolgt vermutlich durch einen NS2/NEP-M1-RNP Komplex, welcher über das NES von NS2/NEP mit dem Exportfaktor Crm1 interagiert. (iv) NP interagiert ebenfalls über ein NES mit dem Exportfaktor Crm1.

Das so in den Zellkern eingebrachte virale Genom wird durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase transkribiert und repliziert (Abb. 1.4). Die Synthese der viralen mRNA erfolgt durch einen Primer-abhängigen Mechanismus. Die Generierung der Primer für die Initiation der viralen Transkription ist ungewöhnlich und abhängig von der zellulären Polymerase II Aktivität. Die PB2 Untereinheit der viralen Polymerase erkennt und bindet die m^7Gppp -Kappen neu synthetisierter zellulärer prä-mRNAs. Die Endonukleaseaktivität der PB1 Untereinheit führt zur Abspaltung der 5'-Enden ungefähr 10-13 Nukleotide von der 5'-Kappe entfernt. Dieser als „Cap-snatching“ bezeichnete Vorgang stellt eine 5'-Kappe und ein freies OH-Ende zur Verfügung, welches zur Initiation der Transkription viraler mRNA durch die virale Polymerase dient (Abb. 1.4) (Neumann *et al.*, 2004). Die PB1 Untereinheit verlängert die

Nukleotidkette, bis sie ungefähr 16 Nukleotide vor dem Ende durch sterische Hinderung an einem Polyuridin-Bereich der vRNA ins „Stottern“ gerät (Abb. 1.4). Durch mehrfaches Kopieren dieses Bereiches kommt es zur Polyadenylierung der viralen mRNA (Luo *et al.*, 1991). Die mRNA für die viralen Proteine M2 und NS2/NEP wird durch zelluläre Spleißosomen generiert. Der Mechanismus des Exports viraler mRNA in das Zytoplasma ist noch nicht genau geklärt. Dort werden die viralen Membranproteine am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) und die restlichen Proteine an freien Ribosomen translatiert (Abb. 1.2). Aufgrund von karyophilen Signalen werden die Proteine PB1, PB2, PA, NP, M1, NS2/NEP und NS1 in den Zellkern transportiert (Abb. 1.3 B).

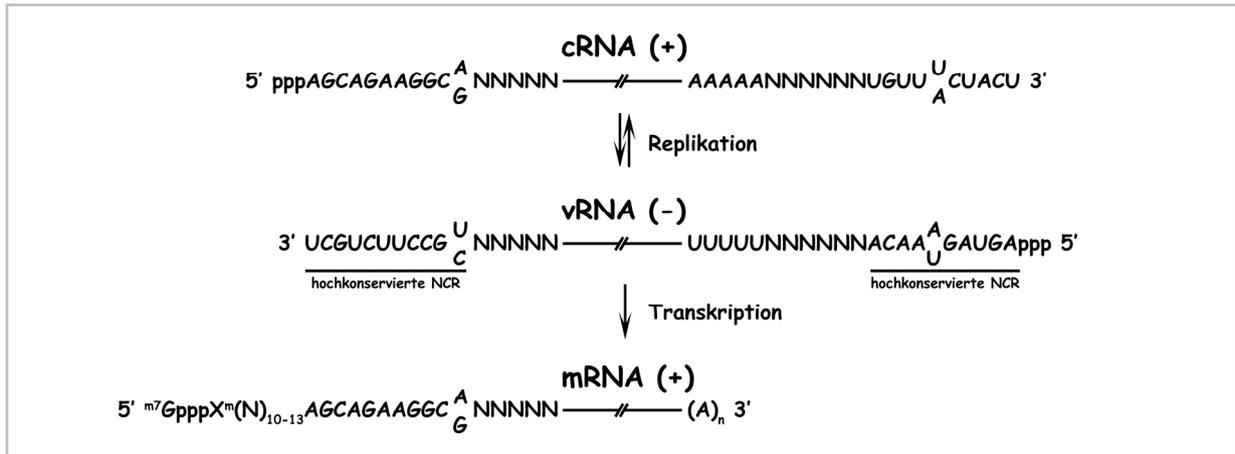


Abb. 1.4: Influenza B Virus RNA Synthese. Die virale Polymerase generiert die drei im Laufe einer Infektion auftretenden viralen RNA-Spezies vRNA, cRNA und mRNA. Die genomische negativ orientierte virale RNA besitzt hochkonservierte nichtkodierende Regionen an den 5'- und 3'-Enden, benachbart zu den segmentspezifischen Nukleotiden. Das Polyadenylierungssignal umfasst mehrere Uridin-Nukleotide am 5'-Ende der vRNA. Die 5'-Kappe sowie die darauf folgenden 10-13 Nukleotide der viralen mRNA stammen von zellulärer mRNA. Sie wurden durch "Cap-snatching" von der viralen Polymerase generiert und dienen als Primer für die Transkription. Die komplementäre cRNA ist eine exakte Kopie der vRNA und dient als Matrize zur Generation neuer vRNA.

Die Synthese der cRNA, der Matrize für die Synthese neuer vRNA-Moleküle, erfolgt im Gegensatz zur mRNA-Synthese ohne Primer sowie vorzeitige Termination und Polyadenylierung (Abb. 1.4). Aufgrund der sehr unterschiedlichen Initiations- und Terminationsmechanismen ist eine Regulation beider Prozesse durch Umschalten von Transkription zu Replikation wahrscheinlich. Dies erfolgt vermutlich durch das Nukleoprotein. Im Gegensatz zu viraler mRNA wird neu synthetisierte cRNA und vRNA vollständig vom Nukleoprotein verpackt (Abb. 1.3 A) (Palese and Shaw, 2007; Neumann *et al.*, 2004). Ein Überschuss von „freiem“ NP könnte die virale Polymerase stabilisieren und somit ein „Stottern“ am 5'-Ende der vRNA verhindern und/oder neu synthetisierte cRNA und vRNA durch Enkapsidierung vor Degradation schützen (Vreede *et al.*, 2004; Beaton and Krug, 1986). Zusammen mit den Polymerase-Komplexen bilden sich neue vRNP Komplexe (Abb. 1.3 A).

Die vRNPs interagieren in der späten Infektionsphase im Zellkern mit dem M1 und dem NS2/NEP Protein. Es wurde gezeigt, dass sowohl M1 als auch NS2/NEP für den Export der vRNPs essentiell sind. NS2/NEP interagiert ebenso wie das NP mit dem nuklearen Exportfaktor Crm1 (Elton *et al.*, 2001; Neumann *et al.*, 2000). Durch das Zytotoxin Leptomycin B wird die Funktion von Crm1 und somit der

nukleare Export der vRNPs inhibiert (Elton *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2001; Fornerod *et al.*, 1997). Es wird angenommen, dass NS2/NEP den Exportfaktor Crm1 zu den vRNPs rekrutiert und somit deren Export aus dem Zellkern vermittelt (Abb. 1.3 B). Der Exportprozess wird außerdem von der Raf/MEK/ERK Signalkaskade auf noch unbekannte Weise beeinflusst (Pleschka *et al.*, 2001). Das NS1 Protein ist während der viralen Infektion ebenfalls im Kern der Zelle lokalisiert. Dieses Protein und seine Funktionen sind im Abschnitt 1.3 beschrieben.

Während des Transports der viralen Membranproteine vom rER über Golgi-Apparat und Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zur Zellmembran werden verschiedene Modifikationen, wie N-Glykosylierungen mit komplexen und mannosereichen Zuckerketten sowie Palmitoylierungen, angefügt (Palese and Shaw, 2007). Die endständigen Neuraminsäuren der komplexen Zucker werden von der Neuraminidase entfernt, um eine Bindung durch das HA an diese Zuckerseitenketten und somit eine Quervernetzung zwischen Virionen zu vermeiden. Für die Initiation eines neuen Replikationszyklus ist die proteolytische Spaltung des viralen HA durch Proteasen essentiell, da nur dann die pH-abhängige Strukturumlagerung des HA in den Endosomen möglich ist und das Fusionspeptid HA2 exponiert werden kann (Klenk and Garten, 1994). Die HAs von hoch-pathogenen Influenza A Virusstämmen der Subtypen H5 und H7 besitzen ein multibasisches Spaltmotiv und können daher im TGN durch die Subtilisin-ähnliche Protease Furin in die Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten werden, welche über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben (Stieneke-Grober *et al.*, 1992). Die HAs der übrigen Influenza A Virus Subtypen sowie von Influenza B Viren besitzen eine monobasische Spaltstelle und werden auf der Zelloberfläche oder nach Freisetzung der Virionen von exogenen Proteasen (z. B. Protease Clara oder Plasmin in der Lunge) gespalten (Kido *et al.*, 1999). In der Zellkultur kann das HA durch exogenes Trypsin gespalten werden, so dass die Viren eine neue Zelle produktiv infizieren können.

Befinden sich ausreichende Mengen viraler Proteine in der Zellmembran, assemblieren dort alle weiteren Virusbestandteile und das Virus wird durch Knospung freigesetzt (Abb. 1.2). Am Knospungsprozess replikationskompetenter Viruspartikel sind die viralen Proteine HA, NA, M1 und M2 maßgebend beteiligt (Chen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2007; Gomez-Puertas *et al.*, 2000). Die Neuraminidase-Aktivität ist für das Freisetzen der neu gebildeten Viruspartikel von der Zelloberfläche wichtig, da es dort befindliche endständige Neuraminsäuren abspaltet und somit eine Retention der Viren durch Bindung des HAs an Sialinsäuren unterbindet (Palese *et al.*, 1974).

1.1.5 Reverse Genetik bei Influenza Viren

Die Möglichkeit, Viren durch das Einbringen der genetischen Information in Form von klonierter cDNA in die Zelle *de novo* zu generieren, brachte einen großen Fortschritt für die Beantwortung fundamentaler virologischer Fragestellungen, denn dadurch konnten revers-genetische Analysen direkt im Kontext einer Virusinfektion durchgeführt werden. In revers-genetischen Studien untersucht man den Einfluss einer eingebrachten Veränderung der Erbinformation, durch gerichtete oder ungerichtete Mutagenese, auf den

Phänotyp. Durch eine gezielte Mutagenese viraler Gene konnten strukturelle und funktionelle molekulare Mechanismen viraler Proteine und deren Einfluss auf die Pathogenität untersucht werden (Conzelmann, 2004). Eine Herausforderung bei der Entwicklung von Systemen zur Herstellung rekombinanter Viren sind die Vielzahl unterschiedlicher Replikationsstrategien sowie die unterschiedlichen Eigenschaften der viralen Genome verschiedener Virusfamilien und Subfamilien. Für mehrere RNA-Viren mit einzelsträngigem positiv orientiertem Genom, wie z. B. das Poliovirus, können rekombinante infektiöse Viren durch die Transfektion genomischer RNA *de novo* generiert werden (Semler *et al.*, 1984). Einige Doppelstrang-DNA Viren hingegen, wie z.B. Adenoviren, werden durch homologe Rekombination genetisch verändert (Stow, 1981). Die Schwierigkeit der Etablierung eines funktionellen Systems zur Herstellung rekombinanter Viren, welches allein auf Transfektion von cDNA bzw. genomischer RNA beruht, zeigt sich u. a. darin, dass für manche Virusarten bis heute noch kein effizientes System gefunden wurde.

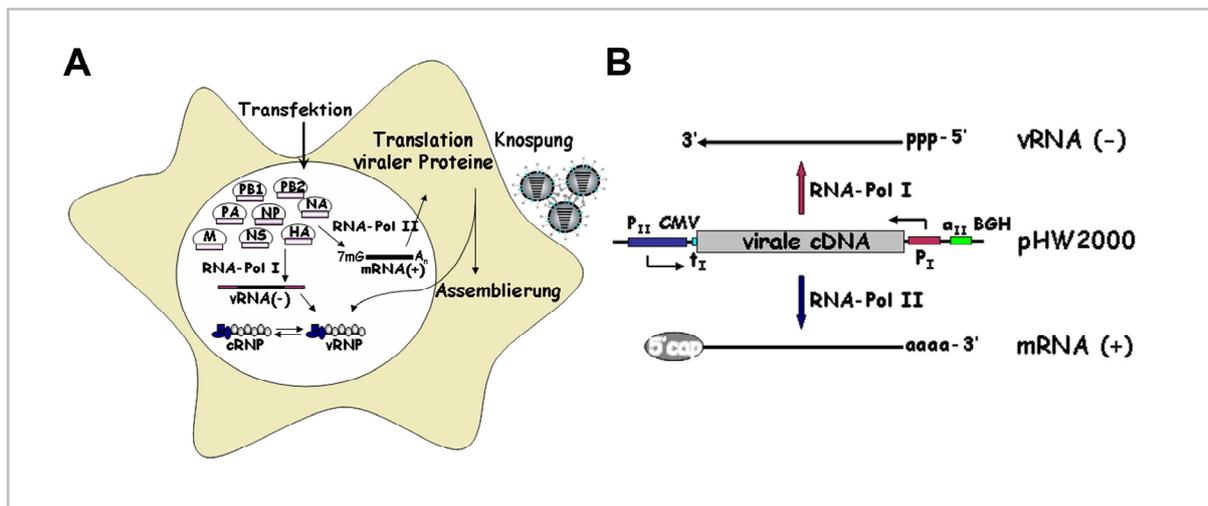


Abb. 1.5: Herstellung rekombinanter Influenza Viren. (A) Zellen werden mit acht Expressionsplasmiden, welche die viralen Genomsegmente von Influenza Virus kodieren, transfiziert. Aufgrund der besonderen Organisation des Vektors werden sowohl vRNAs als auch virale mRNAs durch die zellulären DNA-abhängigen RNA-Polymerasen I und II transkribiert. Nach Synthese der viralen Proteine assemblieren diese mit den vRNPs und neugebildete Virionen werden von der Zelle freigesetzt. (B) Organisation der Regulationselemente im Vektor pHW2000 des acht-Plasmidsystems: P_I: humaner RNA-Polymerase I Promoter; t_I: muriner Terminator; P_{II}CMV: Cytomegalovirus RNA-Polymerase II Promotor; a_{II}BGH: Polyadenylierungssignal des Gens für das bovine Wachstumshormon (bovine growth hormone)

Da Orthomyxoviren ein negativ orientiertes RNA Genom besitzen, kann durch das Einbringen von genomischer Nukleinsäure in die Zelle durch Transfektion *per se* kein Infektionszyklus initiiert werden, denn weder von genomischer vRNA noch von cRNA können virale Proteine translatiert werden. Die vRNA muss zunächst in mRNA umgeschrieben werden, um die Translation viraler Proteine zu ermöglichen. Dies erfolgt während einer Infektion durch die in die Zelle eingebrachte virale Polymerase. Ferner muss neu synthetisierte vRNA und cRNA enkapsidiert werden. Entsprechend sind vRNPs die kleinsten infektiösen Einheiten. Trotz der komplexen Ausgangslage gelang es, Systeme zu entwickeln, welche die *de novo* Generation rekombinanter Influenza A und B Viren durch Transfektion von klonierter cDNA ohne Helfervirus ermöglichten (Dauber *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2000; Fodor *et al.*, 1999;

Neumann *et al.*, 1999). Das bidirektionale acht-Plasmid System von Hoffmann *et al.* beruht auf der Transfektion von Zellen mit acht pHW2000-Plasmiden, welche die cDNA von jeweils einem viralen Genomsegment tragen (Hoffmann *et al.*, 2000). Die viralen cDNAs werden 3' von einem Polymerase I Promotor und einem Polyadenylierungssignal und 5' von einem Polymerase II Promotor und einem murinen Terminator flankiert und somit in humanen Zellen sowohl in negativer (vRNA), als auch in positiver (mRNA) Orientierung transkribiert (Abb. 1.5 B). Die von den viralen mRNAs translatierten Proteine assemblieren mit den vRNPs und die entstandenen Virionen werden von der Zelle freigesetzt (Abb. 1.5A).

1.2 Der Zellkern

Influenza Viren replizieren und transkribieren ihr Genom im Kern der Wirtszelle und sind somit abhängig von verschiedenen nuklearen Funktionen. Der Nukleus einer Zelle ist hoch organisiert. Seine Hauptfunktion ist die Erhaltung, Replikation und Expression der genetischen Information der Zelle. Ihn trennt eine Doppelmembran vom Zytoplasma, in die große Multiproteinkomplexe eingelagert sind, welche die Kernporen bilden. Die Kernporen sind Teil einer zellulären Maschinerie, welche den Transport von Molekülen in und aus dem Zellkern kontrolliert. Sowohl der effiziente Ablauf als auch die Aufrechterhaltung der vielfältigen komplexen Prozesse im Zellkern werden durch die räumliche Aufteilung und zeitliche Koordinierung verschiedener Reaktionen gewährleistet. Dabei spielt die Unterteilung des Kerns in spezifische funktionelle, membranlose Substrukturen, in denen definierte Prozesse stattfinden, eine wichtige Rolle.

1.2.1 Organisation des Zellkerns

Im Kern einer Zelle findet man membranlose Subkompartimente, in welchen jeweils Proteine akkumulieren, die an verschiedenen Aktivitäten der Genexpression beteiligt sind (Handwerger and Gall, 2006). Die Konzentration von Proteinen in einem nuklearen Kompartiment ermöglicht das räumliche und zeitliche Zusammenspiel eng verknüpfter Funktionen, wie Transkription, Spleißen und nuklearer Export von mRNA. Diese Kompartimente können durch Immunfluoreszenzfärbung von Markerantigenen sichtbar gemacht werden. Die prominenteste nukleare Domäne ist der Nukleolus. Er formt sich um aktiv transkribierte ribosomale DNA und ist Ort der Modifikation ribosomaler RNA sowie der Assemblierung von Prä-Ribosomen. Ferner spielt er eine Rolle bei der Assemblierung nicht ribosomaler Ribonukleoproteinpartikel (RNP). Bis heute hat man ungefähr 700 nukleolare Proteine identifiziert, von denen allerdings nur rund 30 Prozent an den bisher bekannten nukleolaren Funktionen beteiligt sind (Handwerger and Gall, 2006). Neben dem Nukleolus wurden weitere nukleare Subkompartimente, wie z.B. PML Bodies, Cajal Bodies und nukleare Speckle-Domänen (auch SC35 Domänen), beschrieben (Abb. 1.6).

In Cajal Bodies und nuklearen Speckle-Domänen findet man eine Konzentration von spleißosomalen „small nuclear“ Ribonukleoproteinen (snRNP) (Carmo-Fonseca *et al.*, 1991; Spector *et al.*, 1991).

Forschungsergebnisse der letzten Jahre brachten Erkenntnisse über die Funktionen dieser nuklearen Domänen. Beide Domänen scheinen eine Rolle bei der Biogenese von zellulärer RNA zu spielen. Cajal Bodies formen sich bei aktiver RNA Synthese und Genexpression in der Nähe von Nukleoli (Ogg and Lamond, 2002). In ihnen findet man Proteine, die in drei verschiedene RNA-Prozessierungswege involviert sind: I. prä-mRNA Spleißen II. prä-rRNA Prozessierung III. Bildung des 3'-Endes der Histon mRNA (Matera and Shpargel, 2006). Da man in Cajal Bodies keine mRNA findet, wird angenommen, dass diese Kompartimente maßgebend an der Assemblierung und Modifikation der RNP Komplexe beteiligt sind, welche die besagten Funktionen vermitteln. Erst vor kurzem wurde gezeigt, dass in ihnen sogenannte „guide“ RNAs oder „Cajal Body specific“ (sca) RNAs lokalisieren, welche eine Rolle bei der 2'-O-Methylierung und Pseudouridinbildung an snRNAs sowie der Modifikation der U3 small nucleolar (sno) RNA spielen (Darzacq *et al.*, 2002; Kiss *et al.*, 2002; Verheggen *et al.*, 2002). Ferner gibt es Hinweise, dass sie Funktionen bei der Assemblierung und Reifung der Telomerase haben (Jady *et al.*, 2006; Tomlinson *et al.*, 2006). Mit dem heutigen Wissen geht man davon aus, dass Cajal Bodies eine wichtige Station im Reifungsprozess verschiedener RNPs einnehmen. So passieren neu gebildete snRNPs zunächst Cajal Bodies, bevor man sie in nuklearen Speckle-Domänen detektiert (Sleeman *et al.*, 1998).

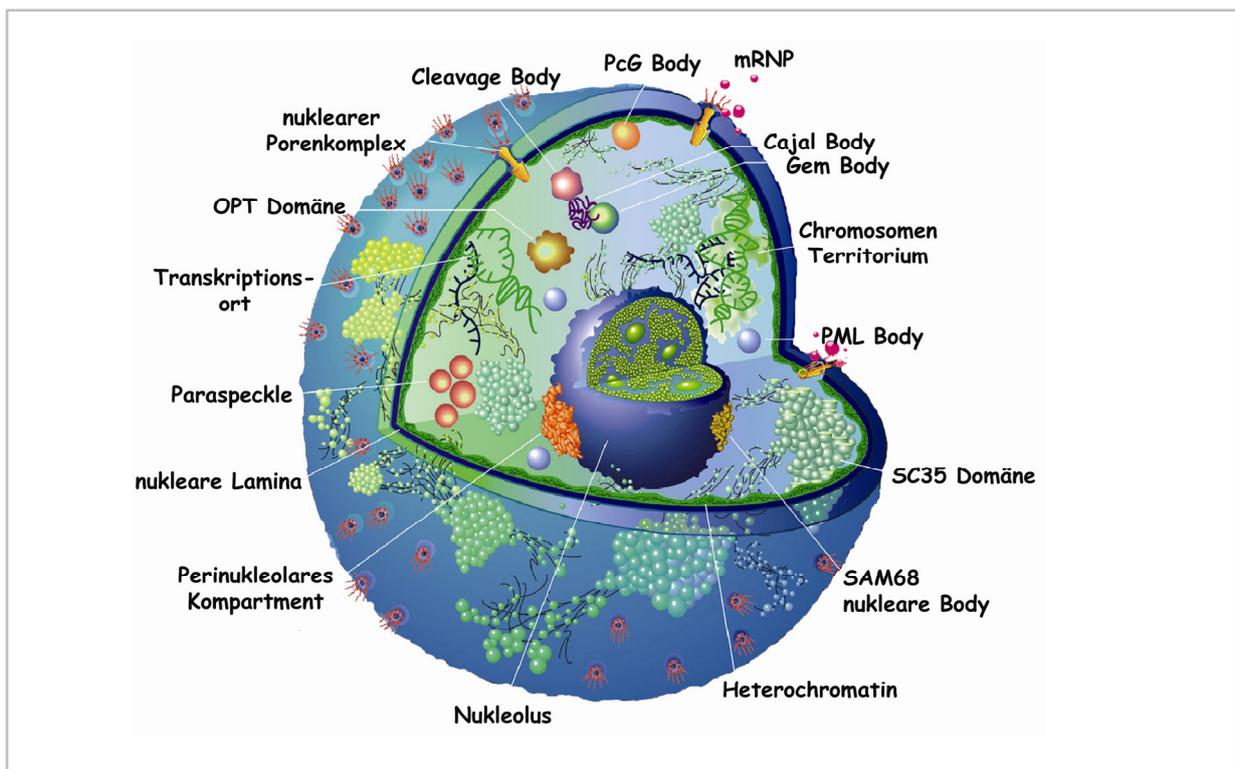


Abb. 1.6: Modell des Nukleus einer tierischen Zelle (Spector, 2001).

Nukleare Speckle-Domänen entsprechen den in der Elektronenmikroskopie sichtbaren Interchromatin Fibrillen. Der Spleißfaktor SC35 ist eine strukturelle Hauptkomponente und daher Markerantigen dieser Domänen (Spector *et al.*, 1991). Weiterhin findet man dort Proteine, die am prä-mRNA Spleißen, an der 3'-End-Bildung und Polyadenylierung sowie der Transkription und dem mRNA Export beteiligt sind (Masuda *et al.*, 2005; Saitoh *et al.*, 2004; Mintz and Spector, 2000). Lange Zeit wurde angenommen, dass

nukleare Speckle-Domänen lediglich Speicherorte dieser Faktoren sind, die bei aktiver Genexpression zu den Orten der Transkription und Prozessierung rekrutiert werden und beim Erliegen der Genexpression in diesen Domänen akkumulieren (Zeng *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1994; O'Keefe *et al.*, 1994). Neue Erkenntnisse hingegen stützen die These einer aktiven Beteiligung von nuklearen Speckle-Domänen in der RNA Biogenese. Obwohl in ihnen wahrscheinlich kein aktives Spleißen stattfindet, scheinen sie im Reifungsprozess einiger mRNAs eine räumliche Verbindung zwischen mRNA Prozessierung und der schnellen Wiederbereitstellung entsprechender RNA Reifungsfaktoren zu sein und tragen somit zu einer effektiven Expression sehr aktiver Gene bei (Hall *et al.*, 2006). Ferner gibt es Hinweise, dass poly(A)-mRNA vor dem Kernexport nukleare Speckle-Domänen passiert und defekte Transkripte dort zurückgehalten und eventuell degradiert werden (Holt *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2006; Degot *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2000). Die Tatsache, dass mRNA Exportfaktoren wie UAP56, Aly/Ref und verschiedene SR Proteine in diesen Domänen lokalisieren, stützen die Hypothese, dass SC35 Domänen eine regulatorische Funktion im mRNA Export ausüben (Masuda *et al.*, 2005; Mintz and Spector, 2000). Die strukturelle Organisation nuklearer Speckle-Domänen und deren Morphologie ist stark vom metabolischen Zustand der Zelle abhängig und wird durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von SR Proteinen reguliert (Sacco-Bubulya and Spector, 2002; Yeakley *et al.*, 1999; Colwill *et al.*, 1996). Entsprechend führt die Inhibition der Polymerase II Transkription oder eine Hitzeschock-Behandlung zu einer Vergrößerung und einem Abrunden der normalerweise irregulär und vernetzt erscheinenden Speckle-Domänen (Lamond and Spector, 2003).

1.2.2 Nuklearer Import und Export von Proteinen

Die lokale Abgrenzung verschiedener biochemischer Prozesse in membranumhüllte Kompartimente ermöglichte die Entstehung von komplexeren Organismen und erforderte gleichzeitig einen gerichteten Energie-verbrauchenden Transport von Molekülen über diese Membranen. Der nukleozytoplasmatische Transport von Proteinen erfolgt durch lösliche Transportrezeptorproteine (Radu *et al.*, 1995). Alle Transportrezeptoren bewegen sich zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleus hin und her, wobei man sie an einem fixen Zeitpunkt abhängig von ihrer Funktion entweder vorwiegend im Zytoplasma oder im Nukleus findet. Die meisten Transportrezeptoren gehören zur Importin β Proteinfamilie. Sie verbinden drei Eigenschaften: I. Sie erkennen und binden direkt oder über ein Adapterprotein wie Importin α spezifisch an das Kargoprotein. II. Sie binden die GTPase Ran (RanGTP). III. Sie interagieren mit den Nukleoporinen des Kernporenkomplexes („nuclear pore complex“ - NPC).

Der Import und Export von den zu transportierenden Kargoproteinen wird durch das Erkennen von nuklearen Importsignalen („nuclear localization signal“ - NLS) oder nuklearen Exportsignalen („nuclear export signal“ - NES) eingeleitet. Ein klassisches NLS (cNLS) wurde erstmals für das „große“ T-Antigen von Simian Virus 40 (SV40 T-ag) beschrieben. Es handelt sich um ein monopartites Signal und umfasst einen Bereich mehrerer basischer Aminosäuren: ¹²⁶PKKKRRV¹⁵² (Kalderon *et al.*, 1984). Ein klassisches bipartites NLS ist das Transportsignal von Nukleoplasmin. Es umfasst zwei Bereiche basischer

Aminosäuren, welche durch zehn Aminosäuren getrennt sind: ¹⁵⁵KRPAATKKAGQAKKKK¹⁷⁰ (Robbins *et al.*, 1991). Klassische nukleare Lokalisationssignale werden durch Importin α erkannt und gebunden. Importin α ist das Adapterprotein für den Importrezeptor Importin β (Abb. 1.7). Der trimere Komplex aus Kargoprotein, Importin α und Importin β wird durch die Interaktion von Importin β mit Komponenten des Kernporenkomplexes in den Zellkern transloziert. Dabei kommt es zu Wechselwirkungen von Importin β mit den Phenylalanin-Glycin-reichen Domänen (FG-repeats) entsprechender Nukleoporine (Pemberton and Paschal, 2005). Bis heute sind beim Menschen sechs verschiedenen Importin α Homologe $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$ beschrieben worden (Kohler *et al.*, 1997). Sie besitzen leicht unterschiedliche Substratspezifitäten und können somit regulatorisch auf den Import bestimmter Proteine wirken (Kohler *et al.*, 1999).

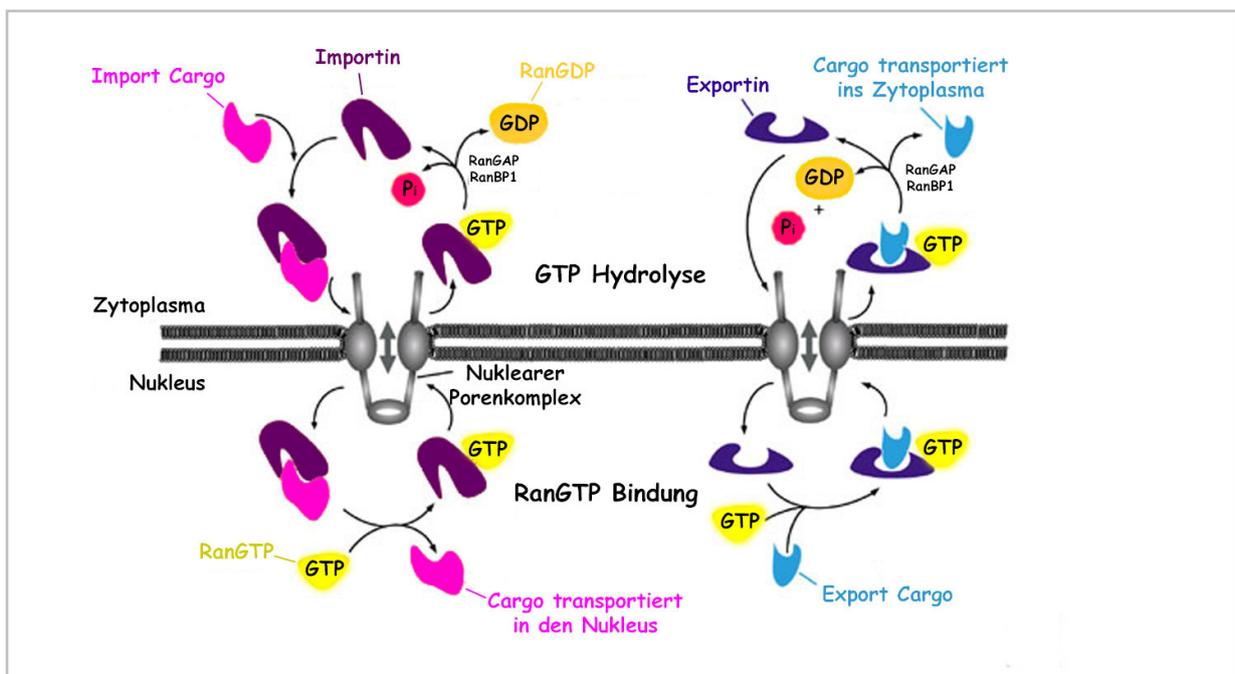


Abb. 1.7: Schematische Darstellung von nuklearem Import und Export durch die Kernporen nach (Strom and Weis, 2001). Zunächst bindet Importin im Zytoplasma an das Kargoprotein und vermittelt durch Interaktion mit Nukleoporinen den Import in den Zellkern. Dort bindet RanGTP an Importin was die Freisetzung des Kargoproteins bewirkt. Gebunden an RanGTP wird Importin ins Zytoplasma exportiert, wo durch RanGAP und RanBP die Hydrolyse von RanGTP vermittelt wird. Importin wird freigesetzt und steht für einen neuen Importzyklus zur Verfügung. Der Export erfolgt in umgekehrter Art und Weise. Exportin bindet im Kern an RanGTP und das Kargoprotein. Durch Interaktion mit Nukleoporinen vermittelt Exportin die Translokation des trimeren Komplexes ins Zytoplasma. Dort wird durch RanGAP und RanBP die Hydrolyse von RanGTP in RanGDP und Phosphat (Pi) vermittelt. Dies bewirkt die Freisetzung des Kargoproteins. Exportin wird in den Nucleus importiert und steht dort für einen neuen Exportzyklus zur Verfügung.

Für den Transport vom Kern in das Zytoplasma ist das am besten charakterisierte nukleare Exportsignal ein Leucin-reiches Peptid, welches von dem Exportrezeptor Crm1 („chromosome region maintenance 1“ oder Exportin-1) erkannt und gebunden wird (Abb. 1.7) (Fornerod *et al.*, 1997; Stade *et al.*, 1997). Eines der ersten nuklearen Exportsignale wurde für das Rev Protein vom Humanen Immundefizienz Virus 1 (HIV-1) beschrieben: ⁷³LQLPPLERLTL⁸⁴ (Fischer *et al.*, 1995). Der Crm1-abhängige Export kann durch das Zytotoxin Leptomycin B (LMB) blockiert werden. LMB bindet direkt an Crm1 und verhindert somit eine Komplexbildung von Crm1 mit RanGTP und dem Kargoprotein (Fornerod *et al.*, 1997). Die

klassischen Import- und Exportprozesse, vermittelt durch cNLS bzw. Leucin-reiches NES, spiegeln nur einen Teil bereits bekannter oder noch nicht identifizierter nuklearer Transportprozesse wider (Lange *et al.*, 2007). Bis heute sind ungefähr 20 Proteine identifiziert und beschrieben, die der Karyopherin Proteinfamilie zugeordnet werden (Pemberton and Paschal, 2005). Diese zeichnen sich durch die Bindung an verschiedene Transportsignale und somit einer eigenen Substratspezifität aus. Da bis heute nur wenige nukleare Transportsignale zellulärer Proteine bestimmt und untersucht sind, bleibt die Frage, welche Transportrezeptoren den größten Anteil nuklearer Import- und Exportprozesse vermitteln.

Die Direktionalität der Transportprozesse wird u. a. durch die Bindung der Kargoproteine an Importrezeptoren im Zytoplasma und die Bindung an Exportrezeptoren im Kern gewährleistet (Abb. 1.7). Diese Prozesse werden durch die GTPase Ran bestimmt, da RanGTP die Affinität zwischen Kargoprotein und Rezeptor reguliert (Izaurralde *et al.*, 1997). Im Zellkern bindet RanGTP an Importin β und bewirkt somit ein Abdissoziieren von Importin α . Freies Importin α hat eine geringere Affinität zum Kargoprotein, was dessen Freisetzung im Zellkern zur Folge hat (Gorlich and Kutay, 1999). Der Importin β -RanGTP-Komplex und Importin α , gebunden an seinen Exportrezeptor CAS und RanGTP, werden ins Zytoplasma zurück transportiert (Abb. 1.7). Im Zytoplasma wird die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP durch die Proteine RanBP-1 oder -2 („Ran binding protein“) und RanGAP („GTPase activating protein“) stimuliert. Dies bewirkt die Freisetzung des Importrezeptors, welcher nun für einen neuen Importzyklus zur Verfügung steht. Der Export von Proteinen aus dem Zellkern erfolgt in einem umgekehrten Mechanismus. Im Kern bildet der Exportrezeptor Crm1 einen trimeren Komplex mit RanGTP und dem NES tragenden Kargoprotein (Askjaer *et al.*, 1998; Fornerod *et al.*, 1997). Durch Bindung von Crm1 an Nukleoporine wird der Exportkomplex in das Zytoplasma transloziert. Dort wird RanGTP zu RanGDP hydrolysiert, was ein Abdissoziieren von Ran und ein Freisetzen des Kargoproteins durch Crm1 im Zytoplasma bewirkt (Izaurralde *et al.*, 1997). Freies Crm1 wird dann in den Zellkern transportiert (Abb. 1.7). Der RanGTP Zyklus nimmt eine zentrale Rolle im nuklearen Import- und Exportprozess ein. RanGTP ist das Markermolekül des nuklearen Kompartiments und wird dort durch den ausschließlich im Kern lokalisierten Guanosin Austauschfaktor RanGEF („guanosine exchange factor“) und GTP generiert. Die Kompartimentierung der Ran regulierenden Proteine erhält den steilen RanGTP-Gradienten zwischen Kern und Zytoplasma und somit die nuklearen Transportprozesse aufrecht (Izaurralde *et al.*, 1997).

1.2.3 Nuklearer Export von RNA-Molekülen

Neben dem Transport von Proteinen wird auch der Transport von RNA-Molekülen über die Kernmembran von Rezeptorproteinen vermittelt und reguliert. Bis heute kennt man vier verschiedene Rezeptorproteine, die selektiv den Transport jeweils einer Gruppe RNAs vermitteln (Abb. 1.8). Der Crm1 Transportrezeptor exportiert kleine nukleare RNAs („small nuclear RNA“ – snRNA) und ribosomale RNAs (rRNA). Dieser Exportprozess wird durch die NES-tragenden Adapterproteine PHAX bzw. Nmd3 vermittelt (Kohler and Hurt, 2007). Diese binden an snRNA und rRNA, interagieren mit Crm1 und

transportieren somit die RNA im „Huckepack-Verfahren“ aus dem Zellkern. Der Export von tRNA wird durch Exportin-t vermittelt (Kohler and Hurt, 2007). Die nicht kodierenden micro RNAs (miRNAs) werden von Exportin-5 ins Zytoplasma transportiert (Kohler and Hurt, 2007).

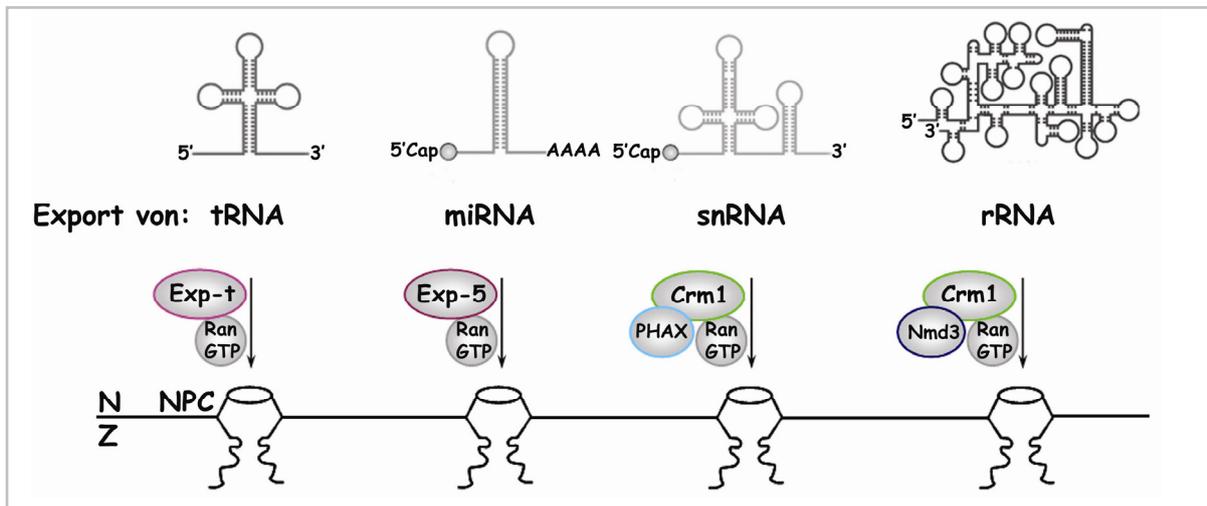


Abb. 1.8: Schematische Darstellung des nuklearen Exports von tRNA, miRNA, snRNA und rRNA (nach Kohler and Hurt, 2007). Drei der vier bekannten RNA Exportrezeptoren, Exportin-t, Exportin-5 und Crm1, sind mit ihren spezifischen primären RNA-Kargotranskripten dargestellt. Diese drei Exportrezeptoren gehören zur Familie der β Karyopherine und benötigen RanGTP als Ko-Faktor. Exportin-t transportiert tRNAs ins Zytoplasma. Exportin-5 ist der Exportrezeptor für mikro(mi)RNAs. Crm1 exportiert kleine nukleare (sn)RNAs und ribosomale (r)RNAs.

Der Export eines Großteils zellulärer mRNA wird von dem Transportrezeptor Tap („Tip associated protein“)/NXF1 vermittelt, der anders als die meisten Proteintransportrezeptoren nicht zur Familie der β Karyopherine gehört und unabhängig von RanGTP fungiert (Katahira *et al.*, 1999; Gruter *et al.*, 1998). Tap/NXF1 gehört zur nuklearen Export-Familie (NXF). Er bewegt sich zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleus hin und her, interagiert direkt mit den FG-repeats von Nukleoporinen des Kernporenkomplexes und bindet direkt oder indirekt über Adapterproteine an die zu transportierende mRNA (Kohler and Hurt, 2007). Tap/NXF1 bildet mit dem kleinen Ko-Faktor p15/Nxt ein Heterodimer, was die Affinität von Tap zu den Nukleoporinen steigert und somit zum Exportprozess beiträgt (Katahira *et al.*, 1999). Der nukleare Export von mRNA ist Teil eines Netzwerkes komplexer Genexpressionsprozesse, deren Komponenten, wie Transkription, Spleißen, 3'-End-Bildung und „nonsense mediated decay“ (NMD) durch Multiproteinkomplexe gekoppelt sind (Abb. 1.9). Dies sichert zum einen die Qualität der im Zytoplasma translatierten mRNA und ermöglicht zum anderen die schnelle und effiziente Regulation der Genexpressionsrate (Luna *et al.*, 2008).

Schon während der Transkription werden Proteine, die am Spleißen, Export und NMD beteiligt sind, zu den Transkripten rekrutiert (Luna *et al.*, 2008). Diese Rekrutierungsprozesse werden hauptsächlich von der C-terminalen Domäne (CTD) der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II vermittelt. Die CTD besteht aus der Heptapeptid-Wiederholung YSPTSPS, welche u. a. an den Serinen Ser2 und Ser5 phosphoryliert werden kann (Luna *et al.*, 2008). Diese Struktur bildet eine Bindungsplattform für transient assoziierte Proteine, wobei die Interaktionen durch den Phosphorylierungsstatus der CTD reguliert

werden. Die Phosphorylierung des Ser5 der CTD geht mit der Initiation sowie frühen Elongationsschritten der RNA-Polymerase II einher. Um sich vom Promotor lösen zu können, muss das Ser2 in der CTD der RNA-Polymerase II phosphoryliert sein. Die Phosphorylierungen der CTD werden u. a. durch Cyclin-abhängige Kinasen vermittelt (Luna *et al.*, 2008).

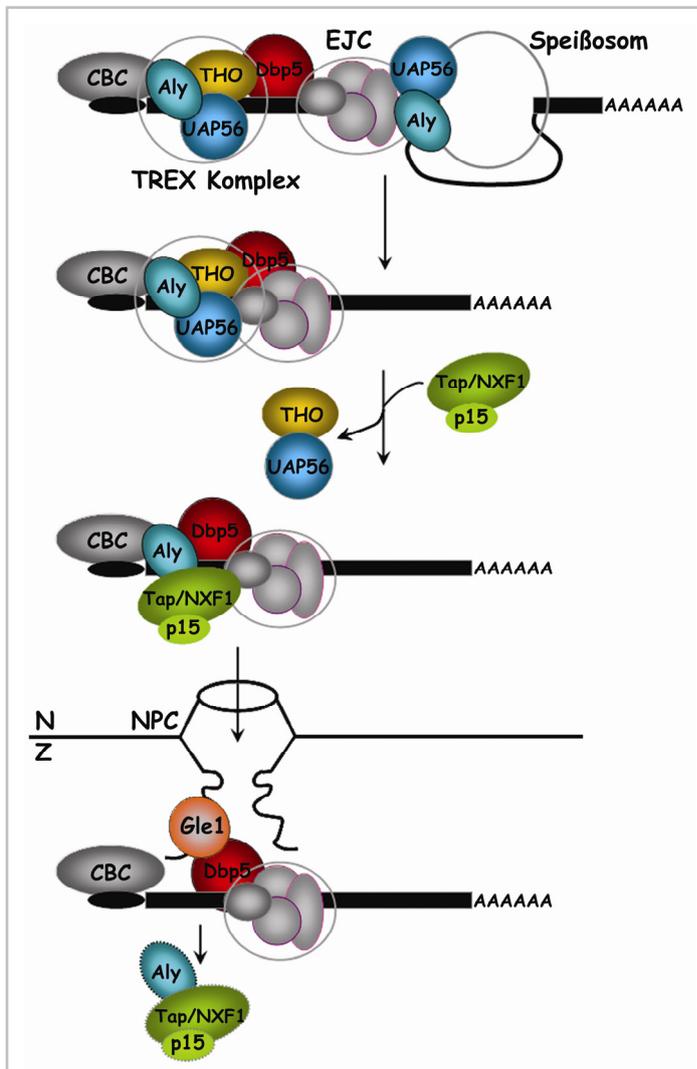


Abb. 1.8: Schematische Darstellung des nuklearen Exports intronhaltiger mRNA in Metazoa. Im Zuge des Spleißvorganges wird der Exon-Junction-Multiproteinkomplex (EJC) aufwärts der Verknüpfungsstelle zweier aufeinander folgender Exons auf die mRNA geladen. Der EJC ist involviert in die mRNA Qualitätskontrolle und den Export und dient wahrscheinlich als Bindungsplattform für Proteine, die in diese Prozesse involviert sind. Die Exportfaktoren Aly/Ref und UAP56 sind transient mit dem EJC assoziiert und werden somit an den Spleißvorgang gekoppelt zu den mRNAs rekrutiert. Zusammen mit dem THO Komplex bilden UAP56 und Aly/Ref den Transkriptions/Export (TREX) Komplex, welcher in Abhängigkeit von der Transkription und der 5'-Kappenstruktur zu den mRNAs rekrutiert wird. Aly/Ref ist ein Adapterprotein für den Exportrezeptor Tap/NXF1. Durch die Bindung von Tap/NXF1 kommt es zum Abdissoziieren von UAP56 aus dem mRNP Komplex. Tap/NXF1 interagiert mit den FG-repeats bestimmter Nukleoporine und vermittelt somit den Transport des mRNP Komplexes durch die Kernpore. Auf der zytosomatischen Seite kommt es zur Umgestaltung des mRNP Komplexes. Dies erfolgt vermutlich aufgrund der Interaktion der RNA-Helikase Dpn5, welche schon mit der prä-mRNA assoziiert ist und dem auf zytosomatischer Seite mit Nukleoporinen interagierenden Gle1 Protein. Der exportierte mRNP Komplex steht dann für die Translation zu Verfügung.

Die Prozessierung intronhaltiger mRNA erfolgt kotranskriptional (Luna *et al.*, 2008). Ein Multiproteinkomplex wird ungefähr 20 Nukleotide aufwärts einer Exon-Exon Verbindungsstelle („exon junction complex“ - EJC) platziert. Teile dieses Komplexes bleiben mit der mRNA während des Exports assoziiert und werden erst kotranslationell von der mRNA entfernt (Le Hir and Andersen, 2008). Der EJC-Komplex dient u. a. als Markierung der Prozessierung entsprechender Transkripte. Zum Gerüst des EJC gehören der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor eIF4AIII sowie die Proteine MLN51 (Metastatic Lymph Node 51), Magoh und Y14. Als transient mit dem Komplex assoziierte Proteine wurden u. a. die spleißosomalen Proteine SRm160, RNPS1 und SAP18, die mRNA Exportfaktoren UAP56, Aly/REF und Tap-p15 sowie die NMD Proteine Upf3 und Upf2 identifiziert (Le Hir and Andersen, 2008). Neben dem EJC wird der THO-Komplex kotranskriptional an die mRNA rekrutiert (Abb. 1.9). Dieser ist ein Multiproteinkomplex, welcher mehrere Funktionen in der mRNP Bildung hat

(Aguilera, 2005). Unter anderem wurde in *Drosophila melanogaster* gezeigt, dass es beim Fehlen des THO-Komplexes zur verstärkten Bildung von RNA-DNA-Hybriden von Transkript und DNA Matrize kommt, was einen Transkriptionsstopp zur Folge hat (Aguilera, 2005). Zusammen mit den Exportfaktoren Aly/Ref und UAP56 bildet der THO-Komplex den Transkription/Export Komplex (TREX) (Masuda *et al.*, 2005). Das RNA-Bindeprotein Aly/Ref ist ein Tap-Adapterprotein. Es vermittelt die Bindung des Exportrezeptors an die zu exportierenden Transkripte und wird von der RNA-Helikase UAP56 an die mRNA rekrutiert (Luo *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2000). Es wurde gezeigt, dass der TREX Komplex in Abhängigkeit vom RNA-Spleißen an die Transkripte rekrutiert wird, da er an prozessierte mRNA, jedoch nicht an intronlose mRNA bindet. Ferner wird die Bindung von TREX an die mRNA durch die 5'-Kappenstruktur vermittelt (Cheng *et al.*, 2006; Masuda *et al.*, 2005). Aly/Ref rekrutiert den Exportrezeptor Tap/NXF1 an die mRNA. Die Bindung von Tap an Aly/Ref verursacht das Abdissoziieren von UAP56 aus dem mRNP Komplex (Kohler and Hurt, 2007). Das Heterodimer Tap-p15 vermittelt anschließend die Translokation des mRNP Komplexes durch die Kernpore (Abb. 1.9) (Kohler and Hurt, 2007). Die Freisetzung der mRNPs von den Kernporenkomplexen auf zytoplasmatischer Seite erfolgt u. a. durch konservierte Exportfaktoren wie der RNA-Helikase Dpn5 und dem Gle1 Protein (Kutay and Panse, 2008; Luna *et al.*, 2008). Diese Proteine tragen wahrscheinlich zur Direktionalität des Exportprozesses bei.

Bis heute kennt man zwar eine Reihe von Bestandteilen der Exportmaschinerie, jedoch weiß man nur wenig über die genauen Funktionen der einzelnen Komponenten, die zeitliche und räumliche Abfolge der Rekrutierungsprozesse sowie die entsprechenden Regulationsmechanismen. Es wird angenommen, dass Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse u. a. von SR Proteinen, welche neben Aly als Adaptoren für die Tap-Bindung an mRNA fungieren können, eine wichtige Rolle bei der Regulation des Exports spielen (Huang *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2003). Ferner wurde in Hefen gezeigt, dass die Fähigkeit von Tap über seine Ubiquitin-assoziierte (UBA) Domäne an mindestens eine ubiquitinierte Komponente des TREX Komplexes zu binden, für den Exportprozess wichtig ist (Iglesias and Stutz, 2008). Es wird daher angenommen, dass Ubiquitinierungen verschiedener Komponenten der Exportmaschinerie entsprechende Interaktionen mit Tap vermitteln und somit zur Koordination dieses Prozesses beitragen.

Komponenten des TREX Komplexes, wie Aly, UAP56 und Tap sind von der Hefe bis zum Menschen konserviert, was auf Schlüsselfunktionen im RNA Exportprozess hinweist (Iglesias and Stutz, 2008). Da in Hefen die meisten Gene keine Introns beinhalten, ist die Rekrutierung des TREX Komplexes in dieser Spezies an den Transkriptionsprozess gekoppelt. Auch in tierischen Zellen gibt es einige Gene, die keine Introns aufweisen und somit für Proteine kodieren, die von nicht gespleißten mRNAs translatiert werden müssen. Es wurde gezeigt, dass SR-Proteine, u. a. SRp20 und 9G8, den Export intronloser mRNA befördern (Huang and Steitz, 2001). Ferner gibt es Hinweise, dass auch die RNA Exportfaktoren Aly/Ref und UAP56 am Transport intronloser mRNA in das Zytoplasma beteiligt sind, jedoch sind die mechanistischen Grundlagen dieses Exportweges bisher nicht geklärt (Taniguchi and Ohno, 2008; Cullen, 2003).

Viren, die im Kern replizieren, sind auf die nuklearen Exportmechanismen der Wirtszelle angewiesen. Da virale Proteine oft von intronlosen, ungespleißten oder intronhaltigen, unvollständig gespleißten Transkripten exprimiert werden bzw. die Generation der Transkripte ausschließlich durch die virale Polymerase erfolgt, werden viele virale Transkripte von der zellulären Exportmaschinerie nicht direkt erkannt. Daher mussten Viren Strategien entwickeln, die eine Integration ihrer Transkripte in zelluläre Exportwege ermöglichen.

Das zu den komplexen Retroviren gehörende HIV kodiert das regulatorische Rev Protein, welches den Export intronhaltiger und unvollständig gespleißter viraler mRNA vermittelt (Cullen, 2003). Rev erkennt ein RNA-Erkennungsmotiv („Rev recognition motif“ - RRE) im viralen Transkript und vermittelt über sein Leucin-reiches NES den Export nicht oder unvollständig prozessierter viraler mRNA über den Crm1-Weg (Cullen, 2003; Fischer *et al.*, 1995; Malim *et al.*, 1989). Das zu den einfachen Retroviren gehörende Mason-Pfizer monkey Virus (MPMV) ist ebenfalls auf den Export intronhaltiger mRNA angewiesen, jedoch kodiert dieses Virus kein regulatorisches Protein. Vielmehr wurde ein strukturelles, konstitutives Transport Element („constitutive transport element“ - CTE) in der MPMV RNA identifiziert, welches für den Export essentiell ist (Bray *et al.*, 1994). Der Exportrezeptor Tap bindet direkt an das CTE und vermittelt somit den Export dieser viralen RNA (Gruter *et al.*, 1998).

Herpesviren benutzen für den Export ihrer intronlosen mRNA den gleichen Exportweg, benötigen dafür jedoch das virale ICP27 als Adapterprotein, das spezifisch an intronlose virale mRNA bindet (Sandri-Goldin, 2008). ICP27 interagiert mit dem Tap-Adapterprotein Aly/Ref und rekrutiert diesen Faktor an virale Transkripte (Chen *et al.*, 2005; Koffa *et al.*, 2001). Somit vermittelt ICP27 indirekt eine Interaktion mit dem Exportrezeptor Tap. Eine ähnliche Funktion hat das regulatorische UL69 Protein des Humanen Cytomegalievirus (HCMV). Es fördert ebenfalls den Export ungespleißter viraler Transkripte. UL69 interagiert mit der RNA-Helikase UAP56, rekrutiert sie zu viraler mRNA und vermittelt somit eine Interaktion mit dem Tap Exportweg (Toth and Stamminger, 2008; Lischka *et al.*, 2006). Alle Herpesviren scheinen solche regulatorischen Proteine zu exprimieren, wobei offensichtlich evolutionäre Divergenzen hinsichtlich der Ebene des Eingriffs entsprechender Proteine in den zellulären Exportweg bestehen. Wie die Herpesviren sind auch Influenza Viren auf den Export intronloser und damit ungespleißter mRNA angewiesen. Ein virales Protein, welches einen solchen Export durch Interaktion mit zellulären Faktoren fördern könnte, ist das im Fokus dieser Arbeit stehende NS1 Protein.

1.3 Das NS1 Nichtstrukturprotein von Influenza A und B Virus

Die Nichtstrukturproteine von Influenza A und B Virus (A/NS1; B/NS1) sind wichtige multifunktionelle Virulenzfaktoren und für eine effiziente Virusreplikation essentiell, da u. a. die genetische Deletion der NS1 Gene zu einer starken Attenuierung entsprechender rekombinanter Viren führt (Dauber *et al.*, 2004; Garcia-Sastre *et al.*, 1998). Die 230-237 (A/NS1) bzw. 281 (B/NS1) Aminosäuren langen Proteine zeigen mit weniger als 25 Prozent eine erstaunlich geringe Sequenzidentität, wobei die N-terminalen dsRNA-

Bindedomänen (Aminosäuren 1-73 (A/NS1) bzw. 1-93 (B/NS1)) allerdings eine sehr ähnliche räumliche Struktur aufweisen (Yin *et al.*, 2007).

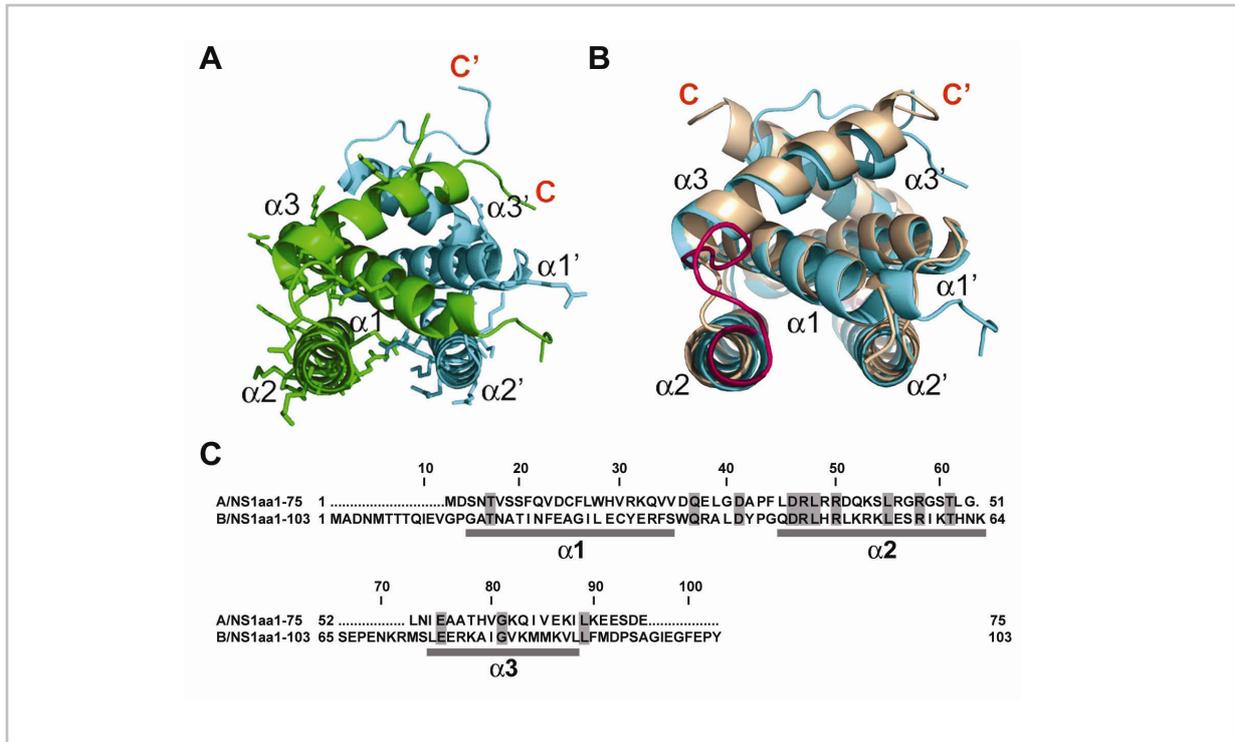


Fig 1.10: Kristallstruktur der N-terminalen Domäne 1-103 von B/NS1 (Yin *et al.*, 2007). (A) Darstellung der Rückgratstruktur eines N-terminalen B/NS1 Dimers mit Angabe der Arg- und Lys-Seitenketten. (B) Überlagerung der N-terminalen B/NS1 Dimerstruktur (blau) mit der N-terminalen A/NS1 Struktur (aa1-73) (beige). (C) Sequenzvergleich der N-terminalen B/NS1 und A/NS1 Sequenz basierend auf der Proteinstruktur. Identische Aminosäuren sind gekennzeichnet und die Lage der drei α -Helices ist angedeutet.

In *in vitro* Assays wurde gezeigt, dass das A/NS1 Protein einzel- und doppelsträngige RNA Spezies bindet, darunter vRNA, virale mRNA, zelluläre U6 snRNA, poly(A)-Sequenzen zellulärer mRNA und synthetische doppelsträngige RNA (dsRNA) (Wang *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 1995; Qiu and Krug, 1994; Hatada and Fukuda, 1992; Hatada *et al.*, 1992). Die Bildung eines Homodimers ist für die RNA-Bindfähigkeit des NS1 Proteins essentiell (Wang *et al.*, 1999).

Auch für das B/NS1 Protein wurde *in vitro* die Fähigkeit zur Bindung von synthetischer dsRNA gezeigt (Wang and Krug, 1996). Beide NS1 Proteine besitzen eine einzigartige RNA-Bindungsstruktur, welche keinerlei Homologie zu zellulären RNA-Bindeproteinen aufweist. Die N-terminalen 73 (A/NS1) bzw. 93 (B/NS1) Aminosäuren formen ein symmetrisches Homodimer, wobei ein Monomer drei α -Helices aufweist (Yin *et al.*, 2007). Für die RNA-Bindung von A/NS1 sind die beiden basischen Aminosäuren Arginin (R) 38 und Lysin (K) 41 essentiell (Abb. 1.10 B). Zur RNA-Bindung des B/NS1 Proteins tragen dagegen drei basische Aminosäurebereiche in der N-terminalen Domäne des Proteins bei. Ein Austausch der Aminosäuren R47/R50, R58/K60/K64 und K77/K78 gegen Alanin führte zum vollständigen Verlust der dsRNA-Bindung entsprechender B/NS1 Proteine (Donelan *et al.*, 2004).

Eine bereits gut beschriebene und trotz der Sequenzdivergenz gemeinsame Funktion der NS1 Proteine von Influenza A und B Virus ist die Unterdrückung der Induktion von Typ I Interferonen während einer Virusinfektion. Das Typ I Interferon (IFN) System der Zelle ist ein wichtiger Teil der angeborenen Immunantwort, da es einen sehr schnellen und effektiven antimikrobiellen Mechanismus in der Zelle aktiviert.

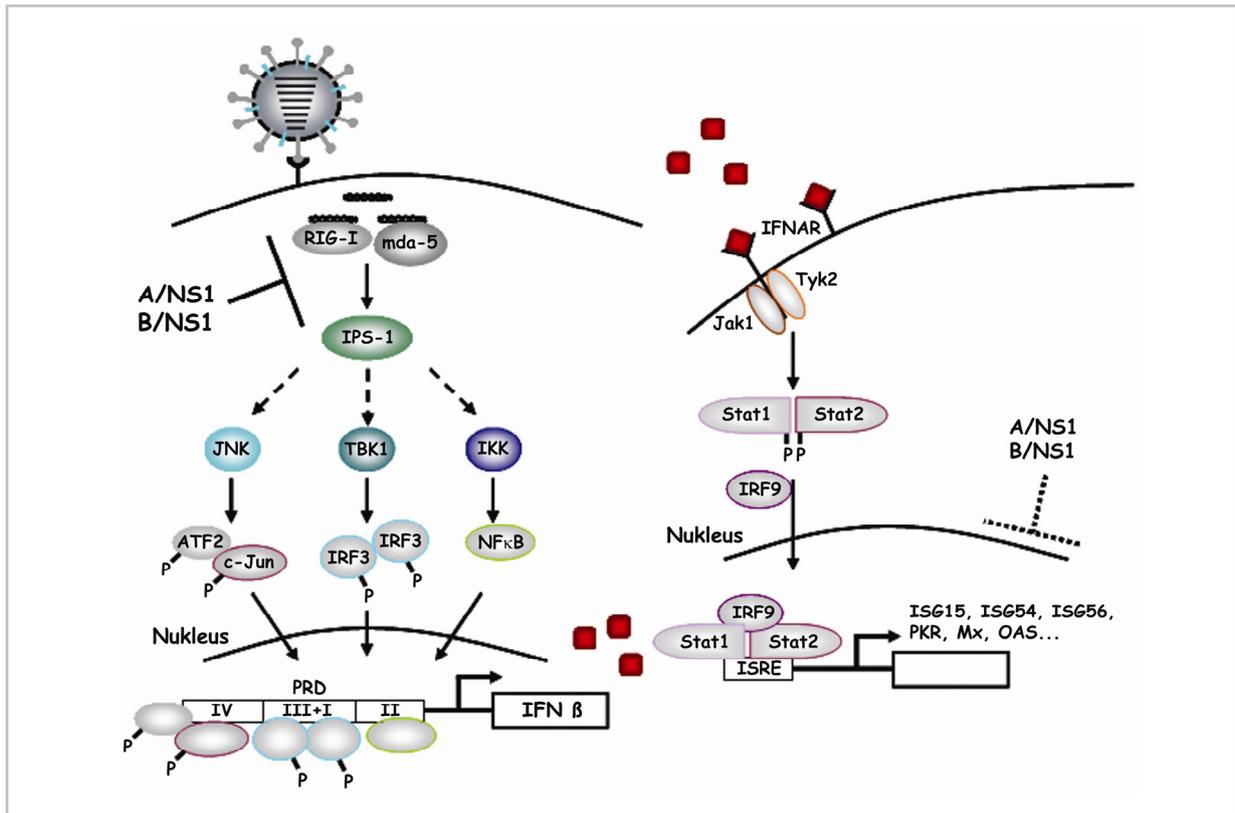


Fig 1.11: Schematische Darstellung der IFN-Induktion und des IFN-Signalweges. Durch eine Virusinfektion entstandene dsRNA-Moleküle werden von den intrazellulären Sensorproteinen RIG-I und mda-5 erkannt. RIG-I und mda-5 interagieren mit IPS-1 und es kommt zur Aktivierung der zellulären Kinasen JNK, TBK1 und IKK, welche die Transkriptionsfaktoren ATF2/c-Jun, IRF3 und NFκB aktivieren. Diese translozieren in den Zellkern und binden kooperativ an die PRDs der Typ I IFN-Gene und vermitteln deren Transkription. Translatiertes IFN β wird von der Zelle sezerniert und bindet an die IFNARs benachbarter Zellen. Dies führt zur Aktivierung des Jak/STAT Signalweges und daher zur Translation einer Vielzahl antiviraler Proteine. Die NS1 Proteine von Influenza A und B Virus antagonisieren die IFN-Induktion durch Interaktion mit RIG-I. Ferner inhibieren sie die antiviralen Funktionen verschiedener IFN-induzierter Proteine (siehe Text).

Pathogen-assoziierte Strukturen („pathogene associated patterns“ - PAMPs) werden von membran-assoziierten Rezeptormolekülen, wie den Toll-like Rezeptoren (TLR) oder intrazellulären Sensormolekülen als fremd erkannt. Zu den intrazellulären Sensormolekülen gehören das Retinoic acid-induced Gen I Produkt (RIG-I) und Melanoma differentiation-associated Gen 5 Produkt (mda-5) (Andrejeva *et al.*, 2004; Yoneyama *et al.*, 2004). RIG-I erkennt virale RNA-Moleküle vermutlich aufgrund von strukturellen dsRNA-Bereichen oder einer Triphosphatgruppe am 5'-Ende viraler RNA. Aktiviertes RIG-I interagiert mit dem mitochondrial gebundenen Adapterprotein IPS-1 (auch als MAVS oder VISA bekannt), in Folge dessen kommt es zur Aktivierung der zellulären Proteinkinasen JNK (c-Jun N-terminale Kinase), TBK1 („tank binding kinase“) und IKK (IκB Kinase-Komplex) und somit zur Aktivierung der im Zytoplasma lokalisierten Transkriptionsfaktoren ATF2/c-Jun, NFκB und IRF3. Diese

translozieren daraufhin in den Zellkern, wo sie an „positive regulatory domains“ (PRDs) der Typ I IFN-Gene binden und somit deren Transkription vermitteln (Abb. 1.11) (Wolff *et al.*, 2008; Baccala *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2000). Die Typ I Interferone werden anschließend von der Zelle sezerniert und binden an die IFN α/β -Rezeptoren (IFNAR) benachbarter Zellen (Abb. 1.11) (Baccala *et al.*, 2007). Dies führt zur Aktivierung des JAK/STAT Signalweges. Die Rezeptor-assoziierten Kinasen Jak1 („Janus activated kinase 1“) und Tyk2 („Tyrosine kinase 2“) werden aktiviert und phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 („signal transducer and activator of transcription“), welche Heterodimere bilden und in den Zellkern translozieren. Im Komplex mit dem Transkriptionsfaktor IRF9 binden sie an durch Interferon stimulierte responsive Elemente („IFN stimulated response elements“ - ISRE) in den Promotorbereichen von Genen, die antivirale Proteine kodieren und vermitteln deren Transkription. Im Zuge dessen kommt es zur Expression einer Vielzahl antiviraler Proteine, u. a. der Protein Kinase R (PKR) und der 2',5'-Oligoadenylsynthetase (OAS) sowie zur Etablierung eines antiviralen Status in der Zelle (Abb. 1.11) (Borden *et al.*, 2007; Platanias, 2005).

Die NS1 Proteine beider Influenza Virustypen sind sehr potente IFN-Antagonisten, da Infektionen mit rekombinanten Influenza NS1 Deletionsvirusmutanten sehr hohe Mengen an IFN induzieren. Hingegen kommt es bei WT-Infektionen kaum zur IFN-Induktion. Beide NS1 Proteine unterdrücken die Aktivierung von RIG-I durch virale RNA-Moleküle ((Mibayashi *et al.*, 2007); Dauber, Voss und Wolff, unveröffentlichte Ergebnisse). Das A/NS1 Protein interagiert dabei mit RIG-I und verhindert so die Expression von IFN β (Mibayashi *et al.*, 2007; Opitz *et al.*, 2007). Für das B/NS1 Protein wurde gezeigt, dass der C-terminale Bereich des Proteins für die Inhibition der IFN-Induktion wichtig ist (Dauber *et al.*, 2006).

Neben der Antagonisierung der IFN-Induktion inhibieren die NS1 Proteine auch IFN-stimulierte Genprodukte, indem sie z. B. die Autophosphorylierung und somit die Aktivierung der Proteinkinase R unterdrücken. PKR liegt latent im Zytoplasma der Zelle vor. Sie erkennt und bindet mit ihren zwei dsRNA-Bindedomänen virale doppelsträngige RNA-Moleküle, welche während einer Infektion gebildet werden. Dies führt zur Dimerisierung und *trans*-Autophosphorylierung der PKR und der anschließenden Phosphorylierung verschiedener Effektorproteine, u. a. vom Translationsinitiationsfaktor eIF2 α (Samuel, 2001; Pathak *et al.*, 1988). Die Phosphorylierung von eIF2 α bewirkt eine Inhibition der zellulären Translation (Samuel, 1993) und somit auch der Synthese viraler Proteine. Das A/NS1 Protein scheint die Aktivierung von PKR durch direkte Interaktion mit der Kinase zu unterbinden (Min *et al.*, 2007). Für das B/NS1 Protein konnte hingegen gezeigt werden, dass für die Interaktion zwischen PKR und B/NS1 die RNA-Bindfähigkeit beider Proteine essentiell, jedoch nicht ausreichend ist ((Dauber *et al.*, 2006); Dauber *et al.*, Plos Pathogens, accepted).

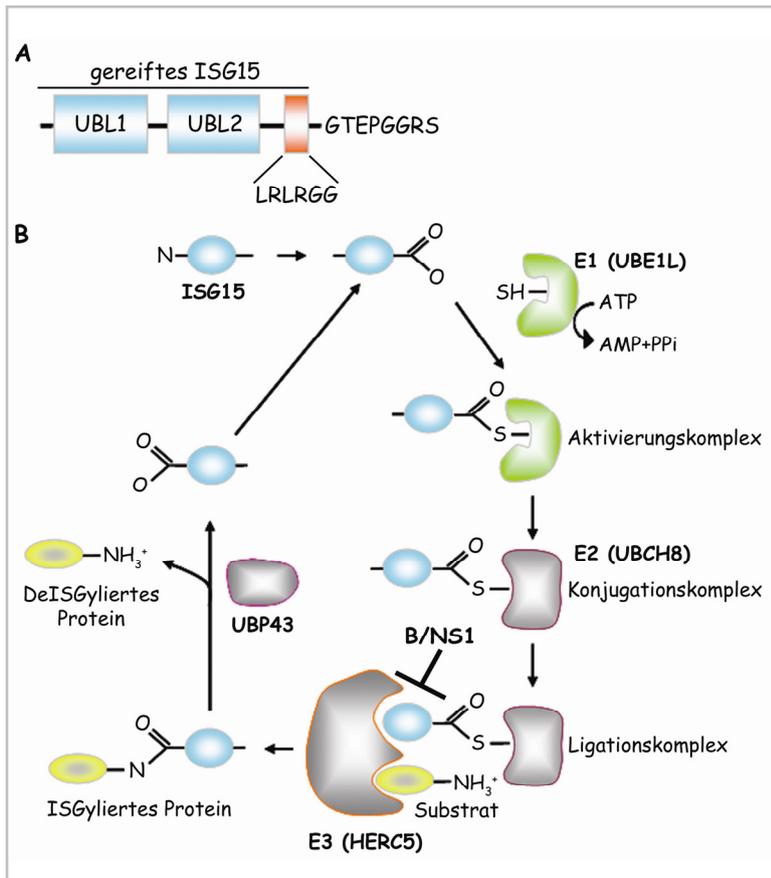


Fig 1.12: Schematische Darstellung der ISG15 Konjugation an Zielproteine. (A) ISG15 besitzt zwei Ubiquitin-ähnliche Domänen (UBL). Es wird als 17 kDa großes Vorläuferprotein translatiert, das sehr schnell proteolytisch in ein 15 kDa großes gereiftes Protein gespalten wird und eine C-terminale Konjugationsdomäne exponiert (LRLRGG). (B) nach (Sadler and Williams, 2008) Einer der Diglycinreste des ISG15 wird zunächst adenlyiert und anschließend über eine Thiolesterbindung an Cystein-Reste des aktivierenden E1 Enzyms (Ube1L), des E2 Enzyms (hier: UBCH8) und des E3-Ligase Enzyms (hier: HERC5) konjugiert, bevor es über eine Isopeptidbindung an den Lysinrest des Zielproteins gebunden wird. Die ISGylierung ist ein reversibler Vorgang. So kann ISG15 durch die ISG15-spezifische Isopeptidase UBP43 von Zielproteinen abgespalten werden. Das NS1 Protein von Influenza B Virus bindet an die N-terminale Domäne von ISG15 und verhindert somit wahrscheinlich die Bindung der E3 Ligase an ISG15 und damit die ISGylierung von Zielproteinen.

Neben der PKR inhibiert das A/NS1 Protein die durch dsRNA induzierbare OAS und verhindert somit die Degradation zellulärer und viraler RNA (Min and Krug, 2006; Rebouillat and Hovanessian, 1999; Kerr and Brown, 1978). Eine Influenza B Virus-spezifische Eigenschaft ist die Interaktion des NS1 Proteins mit dem IFN-stimulierbaren Genprodukt ISG15 und die Inhibition der ISG15-Konjugation an zelluläre Zielproteine (Lenschow *et al.*, 2007; Yuan and Krug, 2001). Das 15 kDa große Ubiquitin-ähnliche ISG15 ist eines der ersten Proteine, welche durch IFN α/β und direkt durch eine Virusinfektion induziert werden. Es besitzt zwei Ubiquitin-ähnliche Domänen und ein für die Konjugation wichtiges C-terminales LRLRGG Motiv (Abb. 1.12A) (Narasimhan *et al.*, 2005; Loeb and Haas, 1992). Die ISGylierung von Zielproteinen erfolgt durch eine IFN-induzierte Konjugationskaskade, welche ähnlich der Ubiquitinierung von Proteinen funktioniert und ein aktivierendes E1 Enzym (Ube1L/Uba7), das konjugierende E2 Enzym (UbcH8), mehrere E3 Ligasen (Herc5, EFP, HHARI) sowie eine dekonjugierende Protease (UBP43) umfasst (Abb. 1.12B) (Dastur *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2006; Zou and Zhang, 2006; Kim *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004; Malakhov *et al.*, 2002). Nach Induktion wird ISG15 an mehr als hundert Zielproteine verschiedenster biologischer Signalwege konjugiert, unter ihnen Proteine der angeborenen Immunantwort wie RIG-I, PKR, MxA, Jak1, STAT1 und ERK1/2 (Arimoto *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2005; Malakhov *et al.*, 2003). Neben der ISG15-Konjugation in Folge der IFN-Induktion wurde gezeigt, dass freies ISG15 ins Serum sezerniert wird (D’Cunha *et al.*, 1996).

Das B/NS1 Protein bindet an die N-terminale Domäne von ISG15 und verhindert somit vermutlich die Bindung der E3 Ligase an ISG15 und somit dessen Konjugation an Zielproteine (Chang *et al.*, 2008). Dabei vermitteln die N-terminalen 143 Aminosäuren von B/NS1 die Inhibition der ISG15 Konjugation, wohingegen die N-terminalen 103 Aminosäuren von B/NS1 für die ISG15 Bindung ausreichend sind (Abb. 1.13) (Yuan *et al.*, 2002; Yuan and Krug, 2001). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass ISG15 eine antivirale Wirkung hat. So sind ISG15 Knockout Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen erheblich sensibler gegenüber Infektionen mit Sindbis Virus, Influenza A und B Viren, Herpes Viren und Vaccinia Virus. Es ist bisher nicht genau geklärt, worin die antivirale Aktivität von ISG15 besteht bzw. wie diese vermittelt wird. Jedoch konnte für Sindbis Virus- und Influenza B Virusinfektionen die antivirale Wirkung direkt mit der ISG15-Konjugation in Verbindung gebracht werden (Lai *et al.*, 2009; Guerra *et al.*, 2008; Lenschow *et al.*, 2007). Ob die ISG15 Bindung von B/NS1 einen direkten Einfluss auf die antivirale Wirkung von ISG15 hat, bleibt zu untersuchen.

Neue Forschungsergebnisse haben die heterodimere Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) als einen weiteren zellulären Bindungspartner des A/NS1 Proteins, jedoch nicht von B/NS1, identifiziert (Abb. 1.13). In der frühen Infektionsphase scheint die A/NS1-unabhängige PI3K-Aktivierung die Virusaufnahme positiv zu beeinflussen. In der späteren Infektionsphase führt die A/NS1-abhängige PI3K-Aktivierung zur Phosphorylierung und Aktivierung des Effektorproteins Akt (Ehrhardt *et al.*, 2007a; Ehrhardt *et al.*, 2007b; Ehrhardt *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass die späte PI3K-Aktivierung anti-apoptotisch wirkt und somit eine effiziente Virusreplikation fördert. Für aviäre, jedoch nicht humane A/NS1 Proteine wurde weiterhin eine direkte Bindung an das Crk und das eng verwandten CrkL Protein beschrieben. Diese Interaktionen führten wie die PI3K-Aktivierung zur Phosphorylierung von Akt (Heikkinen *et al.*, 2008). Inwieweit diese Funktion in Zusammenhang mit der PI3K-Aktivierung steht oder ob davon unabhängige Funktionen vermittelt werden, bleibt zu klären.

Obwohl die A/NS1 und B/NS1 Proteine während der Infektion im Zellkern lokalisieren (Greenspan *et al.*, 1988), sind nur für das A/NS1 Protein nukleare Funktionen beschrieben. Es wurde gezeigt, dass das A/NS1 Protein von mehreren Stämmen das Spleißen zellulärer mRNA und deren Export aus dem Zellkern inhibiert (Satterly *et al.*, 2007; Fortes *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1994; Alonso-Caplen *et al.*, 1992). Übereinstimmend mit dieser Funktion bewirkt die Expression von A/NS1 eine leichte Veränderung der nuklearen Speckle-Domänen. Sie erscheinen vergrößert und vereinzelt (Wolff *et al.*, 1998; Fortes *et al.*, 1995). Das A/NS1 Protein bindet außerdem direkt an die für die Prozessierung zellulärer prä-mRNA essentielle 30 kDa-Untereinheit des „cleavage and polyadenylation specificity factor“ (CPSF) und unterbindet dessen Bindung an zelluläre mRNA und somit deren 3'-End-Spaltung und Polyadenylierung. Ferner bindet das A/NS1 Protein direkt an das nukleare Poly(A)-Bindepotein PABP2 (Abb. 1.13). PABP2 ist ein Speckle-assoziiertes Protein, das die poly(A)-Strangsynthese an den 3'-Enden zellulärer mRNA stimuliert. Eine Expression von A/NS1 bewirkt eine nukleoplasmatische Relokalisierung des Proteins. In *in vitro* Assays wurde gezeigt, dass das A/NS1 Protein die Funktion von PABP2 einschränkt

und es im Zellkern zur Ansammlung zellulärer mRNAs mit verkürzten Poly(A)-Enden kommt, welche nicht mehr ins Zytoplasma exportiert werden (Chen and Krug, 2000; Chen *et al.*, 1999). Neben der Tatsache, dass unvollständig oder fehlerhaft prozessierte mRNA nicht aus dem Zellkern exportiert wird, wurde vor kurzem auch über eine direkte Interaktion von A/NS1 mit Proteinen der zellulären mRNA Exportmaschinerie berichtet. So bindet das Protein an die Exportfaktoren Tap/NXF1 und p15/NXT1 sowie Rae1 (Abb. 1.13). Ferner wurde gezeigt, dass es während einer Influenza A Infektion zu einer Verringerung des Nukleoporins Nup98 kommt, welches essentiell für den Tap-vermittelten mRNA Export ist (Satterly *et al.*, 2007). Die Interaktion von A/NS1 mit zellulären mRNA Exportfaktoren wurde als ein weiterer Mechanismus von Influenza A Virus vorgeschlagen, den Export zellulärer mRNA und somit deren Translation zu inhibieren, um eine präferentielle Expression viraler Proteine zu erzwingen. Interessant ist, dass das A/NS1 Protein das Spleißen und den Export seiner eigenen viralen mRNA von Segment acht ebenfalls inhibiert (Garaigorta and Ortin, 2007). Die mechanistische Grundlage dieser Funktion sowie deren Bedeutung sind jedoch unklar.

Neben dem Einfluss auf den zellulären Spleißvorgang sowie den mRNA Export zeigen Forschungsergebnisse, dass das A/NS1 Protein mit zellulären Translationsfaktoren interagiert. A/NS1 bindet an den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor eIF4GI, welcher eine Untereinheit des Kappenbindekomplexes eIF4F ist, sowie an das Poly(A)-Bindepotein PABP1, wobei alle drei Proteine in einem Komplex nachgewiesen wurden (Abb. 1.13) (Burgui *et al.*, 2003; Aragon *et al.*, 2000). Es wird bis heute kontrovers diskutiert, ob das A/NS1 Protein durch die Interaktion mit den Translationsfaktoren direkt die Translation viraler mRNA steigert oder dieser Effekt auf die Destabilisierung zellulärer mRNA während einer Infektion zurückzuführen ist. Es wurde in zwei unabhängigen Arbeiten gezeigt, dass die Bindung von A/NS1 an die 5'-UTR viraler mRNA einen Einfluss auf die Translation hat (Enami *et al.*, 1994; Garfinkel and Katze, 1993). Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass das A/NS1 Protein Komponenten der Translationmaschinerie zu den 5'-UTRs viraler mRNA rekrutiert und somit deren Translation vermittelt. Andere Studien hingegen ließen darauf schließen, dass es nicht zu einer bevorzugten Expression viraler Proteine kommt. Vielmehr wird zelluläre mRNA nicht mehr translatiert, da ihre Prozessierung und somit ihr Export aus dem Kern durch das A/NS1 Protein inhibiert wird und das „Cap-snatching“ eine generelle Destabilisierung und Degradierung zellulärer Transkripte bewirkt (Cassetti *et al.*, 2001; Beloso *et al.*, 1992). Die meisten viralen Transkripte werden jedoch ungehindert exportiert und daher auch translatiert. Aufgrund der kontroversen Forschungsergebnisse bleibt der genaue Einfluss des A/NS1 Proteins auf die Translation viraler und zellulärer Proteine noch zu klären.

Anders als für das A/NS1 Protein werden für das B/NS1 Protein keine weiteren Funktionen neben der Antagonisierung zellulärer antiviraler Aktivitäten beschrieben. Dennoch gibt es Hinweise, dass das B/NS1 Protein mindestens eine weitere für die virale Replikation essentielle Funktion besitzt, welche von der IFN-Antagonisierung verschieden ist. In Infektionsstudien mit Influenza NS1 Deletionsviren (Δ NS1) fand man, dass Influenza A NS1 Deletionsvirus (Δ NS1) in IFN-defizienten Vero Zellen einen nur um eine

Log-Einheit geringeren Titer aufwies, als das Wildtyp-Virus (Dauber *et al.*, 2004). Entsprechend scheint eine sehr wichtige Eigenschaft des NS1 Proteins von Influenza A Virus die Antagonisierung des IFN-Systems zu sein. Überraschend war, dass ein Influenza B ΔNS1 Virus auch in IFN-defizienten Vero Zellen stark attenuiert war, da es zu mindestens tausendfach geringerem Titer als das Wildtyp-Virus replizierte ((Dauber *et al.*, 2004).

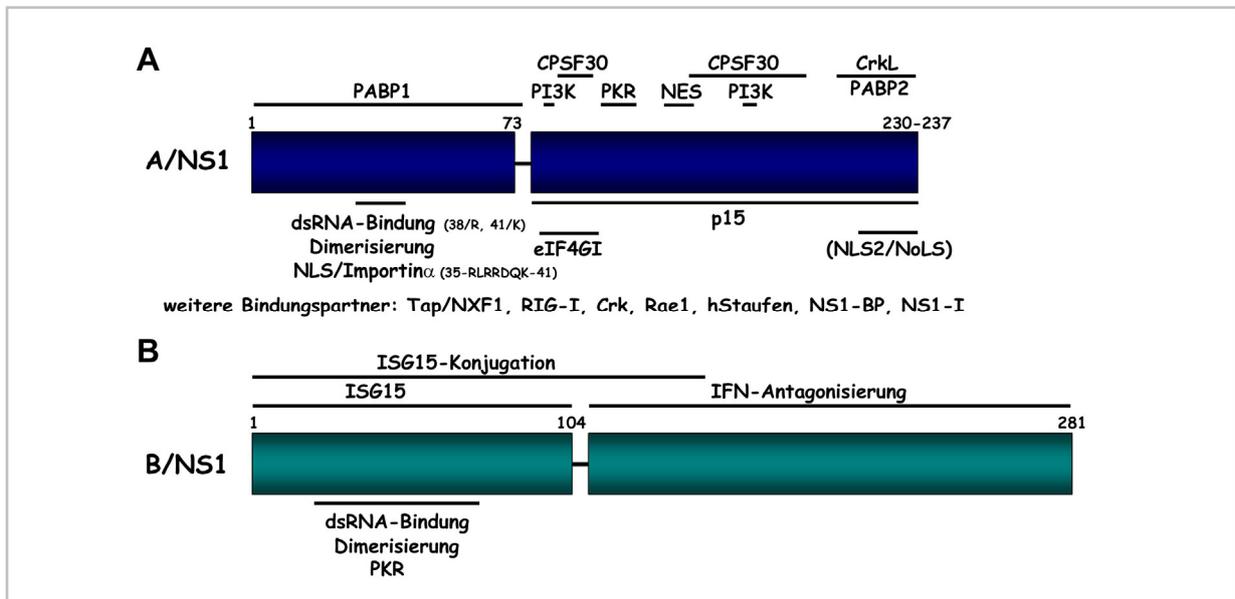


Fig 1.13: Schematische Darstellung der A/NS1 und B/NS1 Proteine und ihrer zellulären Interaktionspartner. (A) Das A/NS1 Protein ist in Abhängigkeit vom Virusstamm 230-237 Aminosäuren lang. Die N-terminale Domäne vermittelt die RNA-Bindung und Dimerisierung des Proteins. A/NS1 besitzt ein N-terminales NLS, welches von Importin α gebunden wird. Die NS1 Proteine einiger Virusstämme besitzen ein zusätzliches NLS2 in der C-terminalen Domäne sowie ein NoLS (nukleolares LS). Ferner wurde ein latentes NES in der C-terminalen Domäne charakterisiert. A/NS1 interagiert mit den RNA-Prozessierungsfaktoren PABP2 und CPSF30, mit den antiviralen Proteinen PKR und RIG-I, mit den RNA-Exportproteinen Tap, p15 und Rae1 sowie mit der PI3K, Crk und CrkL, den Translationsfaktoren eIF4GI, PABP1 und hStaufen und den Proteinen NS1-BP und NS1-I (Falcon *et al.*, 1999; Wolff *et al.*, 1996; Wolff *et al.*, 1998). (B) Das B/NS1 Protein ist 281 Aminosäuren lang. Die N-terminale Domäne vermittelt die RNA-Bindung und Dimerisierung des Proteins, sowie die ISG15- und PKR-Bindung. Die N-terminalen 143 Aminosäuren inhibieren die ISGylierung von Zielproteinen. Die IFN-Antagonisierung wird von der C-terminalen Domäne des Proteins vermittelt.

Vorarbeiten zeigten, dass das B/NS1 Protein in der frühen Infektionsphase (vor 8 h p. i.) ausschließlich im Kern lokalisierte, wo es in punktförmigen Strukturen akkumulierte. In der späten Phase hingegen war das Protein im Zytoplasma lokalisiert. Kolokalisationsstudien mit Markerantigenen nuklearer Domänen ergaben, dass das B/NS1 Protein in der frühen Infektionsphase mit SC35 in nuklearen Speckle-Domänen kolokalisierte. Ferner bewirkte die Expression von B/NS1 eine morphologische Veränderung dieser Strukturen, welche nicht mehr vernetzt und irregulär, sondern abgerundet und aufgebläht erschienen. Diese Funktion ist Influenza B Virus-spezifisch und eine autarke Eigenschaft des NS1 Proteins. Bisher waren jedoch weder die damit assoziierten Funktionen, noch zelluläre Interaktionspartner sowie Signale in der B/NS1 Sequenz beschrieben, welche die Lokalisation des B/NS1 Proteins regulieren.

1.4 Fragestellung

Influenza Viren replizieren im Zellkern und sind daher auf nukleare Wirtsfunktionen angewiesen. Der nukleare Export zellulärer poly(A)-mRNA ist eng gekoppelt an verschiedene Prozesse der Genexpression, eingeschlossen die Transkription, die 5'-Kappenbildung, die Polyadenylierung und das Spleißen, und erfolgt hauptsächlich durch das Exportprotein Tap/NXF1. Neueste Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass auch der Export viraler mRNA während einer Influenza Virusinfektion von Tap/NXF1 vermittelt wird. Da aber sechs (Typ A Virus) bzw. sieben (Typ B Virus) von acht Influenza Virus Transkripten kein Introns besitzen und alle ausschließlich von viralen Proteinen synthetisiert werden, wird die virale mRNA *per se* schlecht von der zellulären Exportmaschinerie erkannt. Daraus ergibt sich die Frage, wie die viralen Transkripte in den zellulären mRNA Exportweg eingeschleust werden?

Für das B/NS1 Protein sind neben seinen IFN-antagonistischen Eigenschaften bisher keine anderen Funktionen beschrieben. Dennoch ist ein Influenza B NS1 Deletionsvirus auf IFN-inkompetenten Zellen stark attenuiert. Dies weist auf mindestens eine weitere für eine effiziente Replikation wichtige Eigenschaft des Proteins hin. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass das NS1 Protein von Influenza B Virus mit nuklearen Speckle-Domänen interagiert. In nuklearen Speckle Domänen akkumulieren Proteine, die an der mRNA Prozessierung sowie dem Export beteiligt sind, wie z. B. die mRNA Exportfaktoren Aly/Ref und UAP56. Interessant ist, dass das ICP27 Protein von Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) ebenfalls mit nuklearen Speckle-Domänen interagiert. Dort bindet es an den Exportfaktor Aly/Ref und rekrutiert diesen zu viraler mRNA, um deren Export zu vermitteln (Sandri-Goldin, 2008). Fungiert das NS1 Protein von Influenza B Virus, ähnlich wie das ICP27 Protein von HSV-1, als ein Adapterprotein, welches Exportfaktoren zur viralen mRNA rekrutiert und sie somit in den zellulären mRNA Exportweg einschleust?

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Prinzipien des mRNA Exports von Influenza B Virus und dabei insbesondere die Rolle des NS1 Proteins beleuchtet werden. Im Fokus standen dabei die Bestimmung einer mit der Speckle-Lokalisation von B/NS1 einhergehenden Funktion des Proteins, die Identifikation zellulärer Interaktionspartner sowie die Charakterisierung intramolekularer Signale, welche die Lokalisation des Proteins während der Infektion vermitteln. Hierfür wurden Schwerpunkte auf die folgenden Analysen gelegt: (1) Um Hinweise auf mögliche Funktionen der Interaktion von B/NS1 mit nuklearen Speckle-Domänen zu erlangen, wurden Interaktionsstudien mit verschiedenen zellulären Proteinen durchgeführt. (2) Die Herstellung rekombinanter Influenza B Viren, deren NS1 Proteine nur vermindert oder gar nicht im Kern lokalisieren, dienten der Untersuchung eines Einflusses der Kernlokalisierung und Speckle-Interaktion von B/NS1 auf die virale Replikation. (3) Sequenzanalysen des B/NS1 Proteins sollten zur Identifizierung der Sequenzbereiche führen, welche die Kernlokalisierung sowie die Interaktion mit nuklearen Speckle-Domänen vermitteln. Die drei Schwerpunkte der Arbeit wurden mit zellbiologischen, proteinbiochemischen sowie virologischen Methoden untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
Ampicillin	Roche, Mannheim
Bacto-Agar	Becton-Dickenson, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bruteier (VALO SPF-Eier)	Lohmann, Cuxhaven
β -Glycerophosphat	Sigma, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
BioMax MR Film	Kodak
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Bovines Serum Albumin 30% (BSA)	PAA Laboratories, Linz
Bovines Albumin (BA) Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Ciprofloxacin	MP Biomedicals, Eschwege
CL-XPosure™ Film	Thermo Scientific, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-oktan (DABCO)	Sigma, Steinheim
4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Steinheim
DNA-Längenstandard Mass Ruler™	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-6 x loading buffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco/ Invitrogen™, Karlsruhe
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol- <i>bis</i> (b-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 10% (Methanol-frei)	Worthington, PA
Fötale Kälberserum (FBS)	Biochrom, Cambridge/U.K.
Glukose	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	MP Biomedicals, Eschwege
Glutathion-Sepharose	Amersham, Freiburg
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Fermentas, St. Leon-Rot
Hefeextrakt	Becton-Dickinson, Heidelberg
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
IGEPAL CA-630	Sigma, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -Thiogalactopyranidose (IPTG)	Biomol, Hamburg
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Leptomycin B (LMB)	Sigma, Steinheim
LipofectAMINE™2000	Invitrogen, Karlsruhe

Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Minimal Essential Medium (MEM)	Gibco/ Invitrogen™, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumvanadat	Sigma, Steinheim
Nitrocellulose Transfer-Membran (Protran)	Schleicher & Schuell, Dassel
Nonidet P-40	Fluka, Heidelberg
OptiMEM	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe
OPTI PRO™ SFM -Glutamine	Gibco/ Invitrogen™, Karlsruhe
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Invitrogen, Karlsruhe
Protein G Agarose	Roche, Mannheim
Protein-Molekulargewichtsstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
Redivue L-[35S] Methionin	Amersham, Freiburg
EasyTag L-[35S] Methionin	PerkinElmer, Jügesheim
Roti®Phenol-Chloroform	Roth, Karlsruhe
SuperSignal WestDura Extended Duration Substrat	Pierce, Schwerte
TEMED	Serva, Heidelberg
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton-X100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin (TPCK behandelt)	Sigma, Steinheim
Trypton	Difco, Heidelberg
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	TPP, Schweiz
Zellkulturflaschen	Thermo Fisher Scientific (NUNC), Langensfeld
Zellkulturschalen	TPP, Schweiz
Zellkulturschalen	Greiner, Solingen

2.1.2 Zelllinien

MDCKII Zellen	(„Madin-Darby canine kidney“) Epithelzelllinie aus der Niere eines Hundes
A549 Zellen	Humane karzinome Epithelzelllinie aus der Lunge
HeLa Zellen	Humane adenokarzinome Epithelzelllinie aus dem Zervix
293T Zellen	Humane Nierenzelllinie
Vero Zellen	Epithelzelllinie aus der Niere von Grünen Meerkatzen; serumfrei

2.1.3 Virusstämme

Influenza B/Yam/1/73	Stammsammlung P15; RKI; Berlin
Influenza B/Thüringen/2/06	NRZ ⁽¹⁾ für Influenza; RKI; Berlin
Influenza B/Berlin/37/06	NRZ ⁽¹⁾ für Influenza; RKI; Berlin

Influenza B/Lee rekombinant (rec)	(Dauber <i>et al.</i> , 2004)
Influenza B/Lee/NS1#2	(Dauber <i>et al.</i> , 2006)
Influenza B/Lee/NS1#3	(Dauber <i>et al.</i> , 2006)
Influenza B/Lee/NS1#4	(Dauber <i>et al.</i> , 2006)
⁽¹⁾ Nationales Referenzzentrum (NRZ)	

2.1.4 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> , Stamm XL1-Blue	<i>recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>pro AB lacI</i> ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]
<i>Escherichia coli</i> , Stamm BL26	[F' <i>ompT hsdS_B (r_B-m_B)gal dcm</i>]

2.1.5 Medien für Bakterien

Alle Nährmedien und Zusätze wurden autoklaviert bzw. bei Hitzeinstabilität sterilfiltriert.

LB-Medium	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	<u>pH 7,2</u>	
	• Antibiotika -Zugabe nach dem Autoklavieren	
2 x YT-Medium	Trypton	16 g/l
	Hefeextrakt	10 g/l
	NaCl	10 g/l
	pH 7,2	
SOC- Medium	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 mM
	<u>KCl</u>	<u>2,5 mM</u>
	• nach dem Autoklavieren Zugabe von	
	Mg ²⁺ -Stock	20 mM
MgCl₂ -Stock	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 M
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 M
	Glukose	0,4 % (w/v)

LB-Agar mit Ampicillin

LB-Medium

Bacto-Agar 1,5 % (w/v)

- Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50°C; Zugabe von 100 µg/µl Ampicillin; Gießen des Mediums in Petrischalen

2.1.6 Medien für Zellkultur

MEM (Minimal Essential Medium)

DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium)

Ansatz für Zellkultur

FBS	10 %
Glutamin	2 mM
Penicillin/Streptomycin	50 µg/ml
Ciprofloxacin	10 µg/ml

Ansatz für Infektion

BSA	0,2 %
Glutamin	2 mM
Penicillin/Streptomycin	50 µg/ml

Ansatz für Transfektion

FBS	10 %
Glutamin	2 mM

PBS⁺⁺/0,2 % BSA

PBS	
BSA	0,2 %
MgCl ₂	0,1 g/l
CaCl ₂	0,13 g/l

2.1.7 Restriktionsendonukleasen

<i>Bam</i> HI	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Dpn</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pst</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Sa</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Sap</i> I	NEB Biolabs, Frankfurt am Main
<i>Xba</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Xho</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.8 Enzyme

<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitex, Berlin
M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA – Ligase (1u/μl)	Roche, Mannheim
RQ1 RNase-Free DNase (1u/μl)	Promega, Mannheim
RNasin (40 u/μl)	Promega, Mannheim
RNaseA	Sigma, Steinheim
Proteinase K	Invitex, Berlin
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.9 Kits

Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Invitex, Berlin
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAEXII Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
Invisorb Spin DNA Extraction Kit	Invitex, Berlin
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN, Hilden
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
BD In-Fusion™ Dry-Down PCR Cloning Kit	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
BigDye® Terminator 3.1 Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems	Promega, Mannheim
QIAamp® MinElute™ Virus Spin Kit	QIAGEN, Hilden

2.1.10 Oligonukleotide

Klonierprimer:

BD-B/NS1aa1-104F	5' C CAC GTG GGC <u>TCT AGA</u> ATG GCG GAC AAC ATG ACC 3'
BD-B/NS1aa1-104R	5' G CCC GGG CCC <u>TCT AGA</u> ACA GTA TGG CTC AAA CCC 3'
BD-B/NS1aa105-281F	5' C CAC GTG GGC <u>TCT AGA</u> GTG AAA AAT CCC TCA ACT 3'
BD-B/NS1aa105-281R	5' G CCC GGG CCC <u>TCT AGA</u> ATT GTC TCC CTC TTC TGG 3'

BD-B/NS1aa46-56F	5' C CAC GTG GGC <u>TCT AGA</u> GAC CGC CTA CAC AGA C 3'
BD-B/NS1aa46-56R	5' G CCC GGG CCC <u>TCT AGA</u> TTC TAA TTT TCG TTT TAG 3'
BD-B/NS1#2/3aa46-56F	5' C CAC GTG GGC <u>TCT AGA</u> GAC GCT CTT CAC GCA C 3'
BD-B/NS1#2/3aa46-56R	5' G CCC GGG CCC <u>TCT AGA</u> TTC TAA TGC TGC AGC TAG 3'
BD-B/NS1aa12F	5' C CAC GTG GGC <u>TCT AGA</u> GTG GGT CCG GGA GCA AC 3'
BD-B/NS1aa65R	5' G CCC GGG CCC <u>TCT AGA</u> ACT CTT GTT GTG AGT C 3'
BD-B/NS1aa73R	5' G CCC GGG CCC <u>TCT AGA</u> AGA CAT CCT TTT ATT CTC 3'
BD-B/NS1aa83R	5' G CCC GGG CCC <u>TCT AGA</u> TTT TAC CCC AAT TGC 3'
BD-B/NS1aa90R	5' G CCC GGG CCC <u>TCT AGA</u> AAA CAG AAG CAC TTT C 3'
76_GST-UAP56F <i>Bam</i> HI	5' GCA TGG ATC CTG ATG GCA GAG AAC GAT GTG 3'
77_GST-UAP56R <i>Xho</i> I	5' CGT ACT CGA GCT ACC GTG TCT GTT CAA T 3'
78_GST-TAP-F <i>Bam</i> HI	5' GCA TGG ATC CTG ATG GCG GAC GAG GGG AAG 3'
79_GST-TAP-R <i>Sa</i> I	5' CGT AGT CGA CTC ACT TCA TGA ATG CCA C 3'
<i>Bam</i> HI-impalpha1F	5' GCG GAT CCA AAT GTC CAC CAA CGA G 3'
<i>Xho</i> I-impalpha1R	5' GCC TCG AGC TAA AAG TTA AAG GTC CC 3'
T7-5' universal	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'
Mutageneseprimer:	
B/NS1#3-47/50rev	5' CG CGC TGC AGC TAG TGC GTG AAG AGC GTC TTG ACC AGG ATA GTC 3'
B/NS1#3-47rev	5' CG CGC TGC AGC TAG TCT GTG AAG AGC GTC TTG ACC AGG ATA GTC 3'
RT-PCR Primer:	
Oligo(dI)	5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT 3'
72_GAPDH107F	5' CCT TCA TTG ACC TCA ACT 3'
73_GAPDH456R	5' GCA GGA GGC ATT GCT GAT 3'
β -Actin 5'	5' GAA GCA TTT GCG GTG GAC CAT 3'
β -Actin 3'	5' TCC TGT GGC ATC CAC CAA ACT 3'

NP-514F	5' AAA ACC ATC TAC TTC AGC C 3'
NP-1426R	5' CTT CTC CAC TTA ACT TCA TTC CC 3'
NA-347F	5' TAG CCC TCA TAG GTT CGG AGA G 3'
NA-1367R	5' CCA AGT ATC TTT TCC ACC ATC G 3'
M-290F	5' CAG CAA CAA AGA AGA AAG GC 3'
M-738R	5' CTC ACA AGA GCT GAA TTT CC 3'

Sequenzierprimer:

GST-5' Seq	5' GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG 3'
GFP-us-seq (pHM829-3')	5' GCC ATC CAG TTC CAC GAG 3'
Lee-NS1B- <i>SaI</i>	5' CGC GTC GAC CTA ATT GTC TCC CTC 3'
BsmB-NS#1	5' CGA TCG TCT CAG GGA GCA GAA GCA GAG G 3'
BsmB-NS#2	5' CGA TCG TCT CTT ATT AGT AGT AAC AAG AGG 3'
NheI-B/NS1aa1-104F	5' CGG CTA GCA TGG CGG ACA ACA TGA CC 3'
XbaI-B/NS1aa1-104R	5' GCT CTA GAA CAG TAT GGC TCA AAC CC 3'
NheI-B/NS1aa104-281F	5' CGG CTA GCT GTG TGA AAA ATC CC 3'
XbaI-B/NS1aa104-281R	5' GCT CTA GAA TTG TCT CCC TCT TCT GG 3'

2.1.11 Plasmide

pGex-5x.1	Stratagene
pGex-ISG15	Schneider J., RKI, P15
pGex-B/NS1	Schneider J., RKI, P15
pcDNA3	Invitrogen
pcDNA3-B/NS1	(Dauber <i>et al.</i> , 2004)
pcDNA-myc/HIS-Ref	(Williams <i>et al.</i> , 2005)
pHW-Lee-NSX <i>hoI</i>	(Dauber <i>et al.</i> , 2004)
pHW-Lee-NS#1	(Dauber <i>et al.</i> , 2006)
pHW-Lee-NS#2	(Dauber <i>et al.</i> , 2006)
pHW-Lee-NS#3	(Dauber <i>et al.</i> , 2006)
pHW-Lee-NS#4	(Dauber <i>et al.</i> , 2006)
pHW-Lee-NS#6	(Dauber <i>et al.</i> , 2006)
pHW-Lee-NS#7	(Dauber <i>et al.</i> , 2006)
pHW-Lee-HA	(Dauber <i>et al.</i> , 2004)
pHW-Lee-NA	(Dauber <i>et al.</i> , 2004)
pHW-Lee-PB1	(Dauber <i>et al.</i> , 2004)

pHW-Lee-PB2	(Dauber <i>et al.</i> , 2004)
pHW-Lee-PA	(Dauber <i>et al.</i> , 2004)
pHW-Lee-NP	(Dauber <i>et al.</i> , 2004)
pHW-Lee-M	(Dauber <i>et al.</i> , 2004)
pEGFP-C1-B/NS1	(Schneider <i>et al.</i> , 2009)
pEGFP-C2-TAP	(Williams <i>et al.</i> , 2005)
pLP-EGFP-C1-UAP56	(Li <i>et al.</i> , 2005)
pHM829	(Sorg and Stamminger, 1999)
pHM839	(Sorg and Stamminger, 1999)
pRSET-hSRP1 α	(Weis <i>et al.</i> , 1995)

2.1.12 Antikörper

Primäre Antikörper für Immunoblot (IB) und Immunfluoreszenz (IF)

Bezeichnung	Hersteller	Spezies/Eigenschaft	Verdünnung/Endkonz.	
			IF	IB
α -Influenza B/NS1	BioGenes*	Kaninchenserum	1:800	1:3000
α -Influenza B/NP	DPC Biermann/Acris	Maus, monoklonal	1:1000	
α -Tubulin	Sigma	Maus, Hybridoma		1:10000
α -SC35	Pharmingen	Maus, monoklonal	1:1000	
α -myc (9E10)	Santa Cruz	Maus, monoklonal	1:300	
α -PABP2	Krause <i>et al.</i> , 1994	Kaninchenserum	1:800	1:3000

* Immunisierung von Kaninchen mit bakteriell exprimiertem und aufgereinigtem GST-B/NS1 Protein

Sekundäre Antikörper

Zielspezies	Modifizierung	Hersteller	Spezies	Verdünnung
Maus	Alexafluor 594 (rot)	Molecular Probes	Ziege	1:1000 (IF)
Maus	Alexafluor 488 (grün)	Molecular Probes	Ziege	1:1000 (IF)
Kaninchen	Alexafluor 594	Molecular Probes	Ziege	1:1000 (IF)
Kaninchen	Alexafluor 488	Molecular Probes	Ziege	1:1000 (IF)
Maus	Meerrettich Peroxidase (HRP)	DAKO	Schwein	1:20000 (IB)
Kaninchen	HRP	DAKO	Schwein	1:20000 (IB)

2.1.13 Puffer und Lösungen

PBS	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	80,9 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
10 x SDS-Elektrophoresepuffer	Tris	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	10 g/l
Trenngel-Puffer, pH 8,8	Tris/HCl	1,5 M
Sammelgel-Puffer, pH 6,8	Tris/HCl	0,5 M
2 x SDS-Probenpuffer	H ₂ O	1,2 ml
	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	8,3 ml
	10 % SDS (w/v)	6 ml
	Glycerin	1,5 ml
	Bromphenolblau	9 mg/ml
	β-Mercaptoethanol	5 %
Fixierlösung	Methanol	30 %
	Essigsäure	10 %
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brillant Blau R250	0,25 % (w/v)
	Essigsäure	10 %
	Ethanol	45 %
Entfärbelösung	Methanol	10 %
	Essigsäure	5 %
Semidry Blotting Puffer	Tris	48 mM
	Glycin	39 mM
	SDS	1,3 mM
	Methanol	20 %

10xTBST	Tris-HCl, pH 8,0	100 mM	
	NaCl	1,5 M	
	Tween 20	0,5 %	
10 x TBE Puffer	Tris	0,89 M	
	Borsäure	0,89 M	
	EDTA, pH 8,0	10 mM	
6 x DNA-Probenpuffer	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)	
	Xylencyanol	0,1 % (w/v)	
	Glycerol	30 %	
	EDTA, pH 8,0	10 mM	
HEPES-Bindungspuffer	HEPES	50 mM	
	NP-40	0,05 %	
	BSA	0,01 %	
	NaCl	150 mM	
RIP Lysispuffer	HEPES, pH 7,4	10 mM	
	KCl	150 mM	
	MgCl ₂	5 mM	
	<u>IGEPAL</u>	<u>0,5 %</u>	
	• frisch dazugeben:	DTT	1 mM
		Pefabloc	1 mM
		Na ₃ VO ₄	1 mM
		RNasin	100 U/ml
	RIP NT2 Puffer	Tris-HCL, pH 7,4	50 mM
		NaCl	150 mM
MgCl ₂		1 mM	
<u>IGEPAL</u>		<u>0,05 %</u>	
• frisch dazugeben:		DTT	1 mM
		Pefabloc	1 mM
		Na ₃ VO ₄	1 mM
		RNasin	100 U/ml

Mowiol	Mowiol 4-88	2,4 g
	Glycerol	6 ml
	<u>dH₂O</u>	<u>6 ml</u>
	<ul style="list-style-type: none"> • über Nacht quellen lassen 	
	<u>Tris (0,2 M), pH 8,5</u>	<u>12 ml</u>
	<ul style="list-style-type: none"> • unter Rühren auf 50-60 °C erhitzen • 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert und den Überstand mit 10% (w/v) DABCO versetzen • Aufbewahren der Aliquots bei -20°C 	

2.1.14 Geräte

ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Brutschrank	Thermo Scientific (Heraeus)
HERAcell150 (Zellschrank)	Thermo Scientific (Heraeus)
Binder APT line® CB (Zellschrank)	Binder, Tuttlingen
Elektrophorese Zubehör	BioRad, München
Geltrockner Phero-Temp 40	BioTec Fischer
Personal Cycler	Biometra®
PE Applied Biosystems Gene Amp® PCR System 9700	Perkin Elmer
Trans-Blot®, Semidry Transfer Cell	BioRad, München
Power Pac 200 und 300	BioRad, München
FLA-2000 Fluorescent Image Analyzer & Imaging Platte BAS-MP	Fujifilm
SONOPULS HD 70	Fujifilm
Eppendorf Thermomixer compact	Bandelin, Berlin
	Eppendorf, Hamburg

Zentrifugen:

Zentrifuge J2-21 mit den Rotoren JA-14 und JA-20	BECKMAN®
Zentrifuge RC5C mit den Rotoren SS-34 und GSA	Sorvall®Instruments
Labofuge 400R	Heraeus
Eppendorf Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg

Mikroskope:

Immunfluoreszenz-Mikroskop Diaphot 300	Nikon, Düsseldorf
Nikon Eclipse TS100	Nikon, Düsseldorf
SPOT RT Digitalkamera	Diagnostic Instruments

Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 510

Zeiss, Oberkochen

Software:

Mac OS w 10

Betriebssystem

Windows XP

Betriebssystem

Microsoft Office 2003

Textverarbeitung

Microsoft Powerpoint 2003

Grafikgestaltung

Microsoft Exel 2003

Tabellenkalkulation

Image Reader V1.5E FLA-2000/2000G

Fujifilm

Image Gauge V3.01

Fujifilm

LSM 510

Zeiss, Oberkochen

Sequencing Analyses 3.7

Applied Biosystems, Darmstadt

Lasergene 6

Sequenzauswertung

SPOT 3.5.5 für Windows

Kamerasteuerung

Adobe Photoshop CS3 extended

Bildbearbeitung

AIDA Image Analyzer v.4.18

Bildbearbeitung

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden, wenn nicht anders beschrieben, unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Medien sowie der PBS-Puffer wurden vor dem Benutzen auf 37°C vorgewärmt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Mit Influenza B Virusstämmen infizierte Zellen wurden bei 33°C, mit Influenza A/PR/8/34 Virus infizierte Zellen bei 37°C kultiviert. Die Menge der ausgesäten Zellen richtete sich nach der Zelllinie und der Größe der Zellkulturgefäße. Es wurde mit folgenden Zellkulturgefäßen gearbeitet:

- T75 Flasche 1 x 10⁷ Zellen 10 ml Medium
- 10 cm Schale 1 x 10⁷ Zellen 10 ml Medium
- 35 mm Schale 1 x 10⁶ Zellen 1,5 ml Medium
- 6 Kalotten Platte 1 x 10⁶ Zellen 1,5 ml Medium
- 12 Kalotten Platte 5 x 10⁵ Zellen 1,0 ml Medium
- 24 Kalotten-Platte 2,5 x 10⁵ Zellen /Kalotte 0,5 ml Medium

2.2.1.1 Passagieren von Zellen

MDCK II Zellen wurden in MEM-Kulturmedium, A549, 293T und HeLa Zellen in DMEM-Kulturmedium kultiviert. Serumfreie Vero Zellen wurden in OPTI PRO™ SFM (- Glutamin)-Medium mit

4 mM Glutamin kultiviert. Dieses Medium wurde auch für die Infektion der Vero Zellen verwendet. Alle Zelllinien wurden in T75 Zellkulturflaschen mit mindestens 10 ml Kulturmedium kultiviert. Konfluente Zellen wurden je nach Bedarf in neue Zellkulturflaschen umgesetzt. Dafür wurde das Medium der Zellen entfernt und diese mit PBS gewaschen. Es wurden 1,5 ml Trypsin/ EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und diese anschließend solange im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden lösten. Die Zellsuspension wurde in frischem Kulturmedium aufgenommen und der gewünschte Anteil in eine neue Zellkulturflasche mit entsprechend vorgelegtem Kulturmedium überführt.

2.2.1.2 Einfrieren von Zellen

Die Aufbewahrung von Zelllinien über einen langen Zeitraum erfolgte in flüssigem Stickstoff. Die Zellen einer konfluenten Flasche wurden mit 1 ml Trypsin/EDTA abgelöst, in PBS aufgenommen und 3 min bei 800 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 2 ml FCS mit 10% DMSO aufgenommen und resuspendiert. Je 1 ml wurde in ein Kryo-Röhrchen überführt und in einer Nalgene-Einfrierbox bei minus 80°C langsam eingefroren.

2.2.1.3 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Das Einbringen von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen bezeichnet man als Transfektion. Als Transfektionsagens wurde LipofectAMINE™2000 verwendet. LipofectAMINE™2000 ist eine Mischung kationischer Lipide. Inkubiert man Plasmide mit LipofectAMINE™2000 in Medium, bilden sich Mizellen, welche die Plasmide einschließen. Diese Mizellen können die Zellmembran überwinden und somit die Plasmide in die Zelle transportieren.

Die zu transfizierenden Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einem Verhältnis von 1:2 umgesetzt. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Transfektion von 1×10^6 Zellen. Pro 1 µg Plasmid wurden 1,5 µl LipofectAMINE™2000 mit 200 µl OptiMEM versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde in 200 µl OptiMEM aufgenommen und mit dem LipofectAMINE™2000-Mix vereinigt, gemischt und 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst, in Transfektionsmedium aufgenommen und anschließend bei 800 rpm für 3 min pelletiert. Die Zellen wurden in 10 ml Transfektions-Medium resuspendiert und in gewünschter Dichte (50 – 70 %) ausgesät. Das Endvolumen der Kavität sollte 1,5 ml nicht überschreiten. Der LipofectAMINE™2000-DNA-Mix wurde tropfenweise dazu pipettiert und leicht geschwenkt. Die Zellen wurden anschließend im Brutschrank 4-6 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor das Transfektionsmedium gegen Infektionsmedium oder Kulturmedium ausgetauscht wurde.

2.2.1.4 Infektion von eukaryotischen Zellen mit Influenza B Viren

Am Tag vor der Infektion wurden Zellen in der gewünschten Zelldichte in entsprechenden Zellkulturschalen ausgesät. Virusverdünnungen wurden in PBS⁺⁺/0,2 % BSA angesetzt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend die Virusverdünnung auf die Zellen pipettiert. Das

Inokulum-Volumen wurde so gewählt, dass möglichst wenig Flüssigkeit den Zellrasen bedeckte, dieser jedoch nicht austrocknete. Die Anzahl der Viruspartikel bzw. die Virusverdünnung richtete sich nach der gewünschten Anzahl der infektiösen Einheiten pro Zelle (MOI = multiplicity of infection). Die Zellen wurden 45 min bei RT inkubiert und währenddessen gelegentlich geschwenkt, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Anschließend wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und mit der entsprechenden Menge Infektions-MEM, -DMEM oder OPTI PRO™ überschichtet. Für die multizyklische Infektion von Zellen wurden dem Medium 1 µg/ml TPCK-Trypsin zugesetzt, um das HA-Protein der neu gebildeten Viren zu spalten und somit einen neuen Infektionszyklus zu ermöglichen. Die Zellen wurden entsprechend der Versuchsanordnung bei 33°C inkubiert. Für die Inhibition des Crm-1 abhängigen Exports wurden infizierte A549 Zellen 3,5 h nach der Infektion mit 10 ng LMB/ml Infektionsmedium überschichtet und weitere 16,5 h bei 33°C inkubiert.

2.2.2 Arbeiten mit Influenza B Viren

2.2.2.1 Virusanzucht im Hühnerei

Die meisten Influenza Viren lassen sich sehr gut in der Allantoishöhle von 11 Tage alten embryonierten Hühnereiern vermehren. Influenza Viren, die in ihren Interferon-antagonistischen Eigenschaften eingeschränkt sind, vermehren sich besser in 6 Tage alten Bruteiern, da in diesen das INF System noch nicht ausgereift ist. Dies macht man sich zu Nutze um Virusstammlösungen mit hohem Titer herzustellen oder aber die Replikationseigenschaften von Viren zu untersuchen.

Zunächst wurde eine Virusverdünnung von 1000 FFU/ml in PBS⁺⁺/0,2 % BSA hergestellt. Um eine Befruchtung der Eier sicher zu stellen, wurden diese vor der Virusinokulation durchleuchtet. Die Eier wurden desinfiziert. Bei 11 Tage alten Bruteiern wurde am stumpfen Ende im Bereich der Luftblase eine kleine Öffnung gebohrt, durch welche mit einer Kanüle (0,55 x 25 mm) 100 µl der Virusverdünnung injiziert wurden. Bei 6 Tage alten Bruteiern wurde im Durchlicht die Lage des Embryos in der Allantoishöhle seitlich am Ei markiert und an der entsprechenden Stelle eine kleine Öffnung gebohrt, durch welche 100 µl der Virusverdünnung injiziert wurden. Die Öffnung wurde mit Ponal-Klebstoff (Fa. Henkel) verschlossen. Die Eier wurden anschließend bei 33°C und 80 % Luftfeuchtigkeit 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Eier für mindestens 6 Stunden bei 4°C gekühlt, damit sich die Blutgefäße des Embryos zusammenziehen konnten, was ein blutfreies Abnehmen der Allantoisflüssigkeit erleichterte. Die Eischale wurde im Bereich der Luftblase entfernt und die Eihaut mit einer Pinzette abgezogen. Dann wurde mit einer Spritze (Kanüle 1,2 x 40 mm) die Allantoisflüssigkeit abgenommen, wobei der Dottersack mit einem stumpfen Spatel vor Verletzungen durch die Kanüle geschützt wurde. Die Allantoisflüssigkeit wurde auf Eis gestellt. Das Stockvirus wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Hämagglutinationstest (HA-Test)

Der HA-Test ermöglicht ein grobes Abschätzen der Konzentration von Influenzaviren. Das Hämagglutinin auf der Oberfläche von Influenzaviren bindet an endständige Neuraminsäuren von Hühnererythrozyten, welche dadurch quervernetzt werden (Hirst, 1941). Da auch Membrantrümmer mit Hämagglutinin oder di-Partikel („defective interfering particles“, d.h. nicht replikationskompetente Viren, deren Segmenten Teile der kodierenden Sequenzen fehlen) zur Hämagglutination beitragen können, ist keine genaue Unterscheidung zwischen infektiösen und nichtinfektiösen Partikeln möglich.

In eine 96-Loch Mikrotiterplatte mit V-förmigen Vertiefungen (Fa. Greiner) wurden 100 µl Virus in die erste Vertiefung der Reihe pipettiert und 50 µl PBS in jede folgende. Ausgehend von den 100 µl Virus in der ersten Vertiefung wurden je 50 µl in die nächste Vertiefung überführt und gemischt. 50 µl der letzten Vertiefung wurden verworfen. So entstand eine 1:2 Verdünnungsreihe. Im Anschluss wurden 50 µl einer 1 %-igen Hühnererythrozytenlösung in 0,9 % NaCl-Lösung in jede Vertiefung pipettiert. Die Platte wurde für ca. 30 min inkubiert. Dabei stand die Platte auf Eis, um die Neuraminidaseaktivität zu unterdrücken. Bis zu einer bestimmten Verdünnung sind genug Viren vorhanden, um die Erythrozyten zu vernetzen. Bei höheren Verdünnungen hingegen können die Erythrozyten nicht mehr vernetzt werden, so dass sie absinken und in der Spitze der Vertiefung als Knöpfchen sichtbar werden. Als Hämagglutinationstiter (HA-Titer) wird der reziproke Wert der Verdünnungsstufe angegeben, bei der gerade noch eine Hämagglutination beobachtet wird.

2.2.2.3 Titerbestimmung von Influenza B Viren durch Immunfluoreszenzanalyse

Da die generierten rekombinanten Influenza B Viren keine Plaques im Plaque-Test zeigten, wurde die genaue Anzahl infektiöser Viruspartikel in einer Viruslösung durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse ermittelt. Aufgrund dessen sind die Titer in „Fluoreszenz bildende Partikel“ („fluorescence forming units“) pro ml (FFU/ml) angegeben. Eine 24-Kalotten Zellkulturplatte wurde mit Deckgläschen (Durchmesser: 12mm) bestückt und darauf die MDCKII Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die 80% konfluenten Zellen mit der zu untersuchenden Viruslösung infiziert. Dafür wurden Virus-Verdünnungen von z. B. 10^{-1} bis 10^{-6} in PBS/0,2 % BA hergestellt und je 20 µl der Verdünnung und 130 µl PBS/0,2 %BSA pro Kalotte als Inokulum verwendet. 8 h nach Infektion (p. i.) wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das virale Nukleoprotein mittels indirekter Immunfluoreszenz markiert (siehe Kap. 2.2.5.1). Die NP-positiven Zellen eines Deckgläschens wurden unter dem Immunfluoreszenzmikroskop ausgezählt. Der Virustiter (FFU/ml) errechnet sich aus der Anzahl der NP-positiven Zellen x 83 x Verdünnungsfaktor. Der Faktor 83 ergibt sich aus der Fläche des Deckgläschens, welche nur 60 % der Fläche der Kalotte entspricht. Entsprechend werden die Zellen auf dem Deckgläschen von nur 60 % der 20 µl Viruslösung infiziert. Dies entspricht 12 µl Viruslösung und ergibt auf das Gesamtvolumen von 1 ml bezogen einen Faktor von 83.

2.2.2.4 Isolierung viraler RNA

Für die Isolierung viraler RNA Segmente aus Stammlösungen rekombinanter Influenza B Viren wurde das QIAamp[®] MinElute[™] Virus Spin Kit von QIAGEN benutzt. Nach Aufschluss der Viren wurde die RNA in Anwesenheit chaotroper Salze an die Glasfasermembran der QIAgen-Säule gebunden und anschließend mit RNase-freiem ddH₂O eluiert. 100 µl Allantoisflüssigkeit wurden mit 100 µl PBS versetzt und die RNA nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die virale RNA wurde mit 50 µl RNase-freiem ddH₂O eluiert.

2.2.3 Herstellung der rekombinanten Influenza B/Lee Viren #3/47 und #2/3

Zur Herstellung der rekombinanten Influenza B Virusmutanten wurden je 0,5 µg der Plasmide pHW-Lee-PB1, pHW-Lee-PB2, pHW-Lee-PA, pHW-Lee-NP, pHW-Lee-HA, pHW-Lee-NA, pHW-Lee-M und die entsprechenden pHW-Lee-NS Segmente #3/47 bzw. #2/3 mit 4,5 µl Lipofectamin in 2,5 x 10⁶ 293T Zellen transfiziert (s. 2.2.1.3). 6 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium zu Infektions-D-MEM mit 2 µg/ml TPCK-behandeltem Trypsin gewechselt und anschließend für 72 Stunden bei 33°C im Brutschrank inkubiert. Die in den Überstand freigesetzten rekombinanten Influenza B Virusmutanten wurden in 6 Tage alten Bruteiern passagiert (s. 2.2.2.1)

Die Identität der rekombinanten Influenza B Virusmutanten wurde durch RT-PCR Analyse der NS-Segmente und Kontrollverdau mit den Marker-Restriktionsendonukleasen überprüft. Die vRNA wurde mit dem QIAamp[®] MinElute[™] Virus Spin Kit aus den Stammlösungen isoliert (s. 2.2.2.4). 5 µl der isolierten vRNA wurden in die OneStep RT-PCR eingesetzt (s. 2.2.4.2), um das NS-Segment zu amplifizieren. 10 µl der amplifizierten NS-Segmente wurden mit den Restriktionsenzymen *SapI* und *PstI* geschnitten (s. 2.2.4.3) und anschließend im Agarosegel analysiert. Zudem wurden die RT-PCR Fragmente der NS Segmente durch Sequenzierung (2.2.4.11) nochmals kontrolliert.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR erlaubt es, beliebige DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Man benötigt zwei DNA-Oligonukleotide (Primer), die an jeweils einem Strang des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes hybridisieren und eine hitzebeständige DNA-Polymerase. Durch aufeinander folgende Zyklen von Denaturierung, Anlagerung von Hin- bzw. Rückprimern (Annealing) und Kettenverlängerung (Elongation) werden DNA-Abschnitte exponentiell amplifiziert. PCRs für Klonierungen wurden mit dem Expand High Fidelity PCR System durchgeführt. Dieses System beinhaltet einen Polymerase-Mix aus *Taq* DNA-Polymerase und *Tgo* DNA-Polymerase. Im Übrigen wurde die PCR für den Nachweis einer erfolgreichen Klonierung (Kolonie-PCR), das Amplifizieren von cDNA im RIP-Assay sowie für Sequenzierungen benutzt.

Ansatz

10 µl 5 x Puffer (15 mM MgCl₂) + 0,5 µl dNTP-Mix (je 10mM) + 1,5 µl Primer 1 (20 µM) + 1,5 µl Primer 2 (20 µM) + 30-100 ng Template
ad 50 µl ddH₂O

Cycler-Programm:

Denaturierung	95°C	3 min	
Denaturierung	95°C	30 s	
Annealing	50-60°C	30 s	30-35 Zyklen
Elongation	72°C	1 min pro 1000 bp	
Nachsynthese	72°C	5 min	
Pause	4°C	∞	

Die Annealingtemperatur wurde so gewählt, dass sie 3-5°C unter der Schmelztemperatur der Primer lag. Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Zur Überprüfung eines Klonierungserfolges wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dafür wurde eine zu untersuchende Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in ein PCR-Reaktionsgefäß mit entsprechender Menge ddH₂O getaucht. Das PCR-Gefäß wurde in einem Thermocycler 10 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde ein PCR-Ansatz mit entsprechenden Primern zu der Probe pipettiert und eine PCR durchgeführt.

2.2.4.2. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription (RT) wird ein RNA-Molekül in ein einzelsträngiges DNA-Molekül umgeschrieben, welches in einer anschließenden PCR zu einem doppelsträngigen DNA-Molekül komplementiert und amplifiziert werden kann. Dies kann in zwei Reaktionsansätzen (TwoStep RT-PCR) oder in einem Reaktionsansatz (OneStep RT-PCR) erfolgen. Bei der Reversen Transkription bindet ein Oligonukleotid Sequenz-spezifisch an das 3'-Ende der RNA. Die reverse Transkriptase fügt an das 3'-Ende des Oligonukleotids komplementär zur RNA Desoxyribonukleotide (dNTPs) an, so dass die RNA in einzelsträngige DNA umgeschrieben wird (copy-DNA; cDNA). Diese wird dann nach Bindung eines Rückprimers an das 3'-Ende der einzelsträngigen DNA in einer PCR komplementiert (2.2.4.1). Für den Nachweis der viralen NS-Segmente rekombinanter Influenza B Viren (s. 2.2.3) wurde die vRNA in einer OneStep RT-PCR mit den NS-Segment-spezifischen Primern *BsmBI-NS #1* und *#2* umgeschrieben und amplifiziert. Für den Nachweis zellulärer und viraler mRNA im RNA-Immunopräzipitationsversuch wurde die mRNA in einer TwoStep RT-PCR zunächst mit einem Oligo(dT)-Primer in cDNA umgeschrieben und anschließend mit Sequenz-spezifischen Primern *72_GAPDH107F/73_GAPDH456R*, *β-Actin 5'/ β-Actin 3'*, *NP-514F/NP-1426R*, *NA-347F/NA-1367R* und *M-290F/M-738R* die cDNA der

zellulären mRNA von GAPDH und Aktin sowie der viralen mRNA von NP, NA und M in einer PCR amplifiziert.

TwoStep RT-PCR

Ansatz

1 µl Phenol/Chloroform-gereinigte RNA + 0,5 µg Oligo(dT)-Primer
ad 11 µl ddH₂O

- Inkubation 5 Minuten bei 70°C im PCR-Cycler und anschließend auf Eis
+ 4 µl 5 x Puffer + 2 µl dNTPs (je 10 mM) + 0,5 µl RNasin
ad 19 µl µl ddH₂O

- Inkubation 5 Minuten bei 37°C im PCR-Cycler
+ 1 µl M-MuLV Reverse Transkriptase

Cycler-Programm:

Reverse Transkription	37°C	60 min
Hitzeinaktivierung	70°C	15 min
Pause	4°C	∞

In die anschließende PCR wurden je 2,5 µl der RT-Proben eingesetzt. Die PCR erfolgte in 25 µl Ansätzen wie in 2.2.4.1 beschrieben.

OneStep RT-PCR

Ansatz

5 µl isoliert vRNA + 10 µl 5 x Puffer + 2 µl dNTPs (je 10 mM) + 1 µl PrimerF + 1 µl PrimerR + 0,25 µl RNasin + 2 µl Enzym-Mix
ad 50 µl ddH₂O

Cycler-Programm:

Reverse Transkription	50°C	30 min	
Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	95°C	30 s	
Annealing	52°C	30 s	35 Zyklen
Elongation	72°C	1 min pro 1000 bp	
Nachsynthese	72°C	5 min	
Pause	4°C	∞	

2.2.4.3 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die DNA an definierten Nukleotidsequenzen schneiden. Dies macht man sich u. a. zu Nutze, um durch Verdau von DNA-Fragmenten an deren Termini Nukleotidüberhänge zu erzeugen, welche die Ligation in einen Vektor mit komplementären Überhängen ermöglichen. Ferner wurde der Restriktionsverdau verwendet, um positive Bakterienklone zu identifizieren. Dafür wurde durch Mini-Prep isolierte Plasmid-DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und das Restriktionsmuster im Agarosegel analysiert. Analytische Reaktionen fanden in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl und präparative in einem Gesamtvolumen von 20-50 µl statt. Für die Reaktionen wurden 0,5-2 U/µl Enzym sowie entsprechende Mengen eines 10 x Restriktionspuffer nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden 2-16 h bei 37°C inkubiert.

2.2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Die Agarosegel-Elektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe. Es wurden 1-2 %-ige Agarosegele verwendet, als Puffer diente 1 x TBE-Puffer. Vor dem Gießen des Gels wurde Ethidiumbromid (0,3-0,5 µg/ml Endkonzentration) in die in Puffer aufgekochte Agarose pipettiert. Die Proben wurden vor dem Auftrag im Verhältnis 1:6 mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard wurden die DNA-Marker „Mass Ruler™ DNA-Ladder“ „low range“ und „high range“ benutzt. Die Gele liefen bei 90-110 V. Die DNA wurde anschließend auf einem Transilluminator über UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.4.5 Reinigung und Aufkonzentrieren von PCR-Fragmenten

PCR-Fragmente bzw. mit einem Restriktionsenzym geschnittene Vektoren wurden nach den Angaben des Herstellers mit dem QIAquick PCR purification Kit von QIAGEN aufgereinigt. Die DNA wurde in 10-20 µl ddH₂O eluiert.

2.2.4.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Um DNA-Fragmente distinkter Größe aus einem Gemisch von DNA-Fragmenten zu isolieren, wurden die Fragmente zunächst über Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit dem QIAEXII Gel Extraction Kit von QIAGEN nach den Angaben des Herstellers isoliert und gereinigt. Die DNA wurde mit 20-50 µl ddH₂O eluiert.

2.2.4.7 Isolierung von DNA und RNA durch Phenol-Chloroform Extraktion und Ethanol-Fällung

DNA und RNA Moleküle können aus Reaktionsgemischen durch Phenol-Chloroform Extraktion von Proteinbestandteilen getrennt und durch anschließende Ethanol-Präzipitation gereinigt und ankonzentriert werden. In dieser Arbeit wurde die in den RNA-Immunopräzipitationversuchen präzipitierte RNA durch

diese Methode isoliert und gereinigt. Die Proben wurden wenn erforderlich mit sterilem ddH₂O auf 200 µl aufgefüllt und anschließend mit 200 µl Phenol-Chloroform versetzt. Die Ansätze wurden 10 s mit einem Vortexer durchmischt, 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert und anschließend die obere RNA-haltige wässrige Phase in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Die ‚Input‘-Proben wurden aufgrund eines sehr hohen Proteingehalts zweimal mit Phenol-Chloroform behandelt. Die Proben wurden für die Fällung der RNA mit 1/10 Vol. Natriumacetat (3 M), 1 µl Glycogen und 2,5 Vol. 100 % Ethanol (4°C) versetzt, durchmischt und anschließend mindestens 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm und 4°C. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend in der SpeedVac-Zentrifuge oder luftgetrocknet. Die RNA wurde in 10 µl RNase-freiem ddH₂O aufgenommen.

2.2.4.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Besitzen das verdaute DNA-Fragment und der Vektor komplementäre Nukleotidüberhänge, lassen sie sich miteinander ligieren. Dabei nutzt man die Fähigkeit der T4 Ligase, die 3′-OH-Gruppen und freien 5′-Phosphatgruppen durch Phosphodiesterbindungen kovalent zu verknüpfen. Für den Ansatz wurden Vektor und Insert im Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 16°C.

Ansatz

1 µl 10 x Puffer (mit ATP) + 1 µl T4-Ligase + 20-50 ng Vektor + x ng Insert
ad 20 µl ddH₂O

2.2.4.9 Transformation kompetenter *E. coli* durch Hitzeschock

50 µl *E. coli* XL1-blue Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden Plasmid-DNA (20 – 200 ng) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock für 90 sec bei 42°C und 2 min auf Eis wurden die Zellen mit 450 µl SOC-Medium vermischt und bei 37°C für ca. 60 min (Ampicillin-Resistenz) bzw. 120 min (Kanamycin-Resistenz) geschüttelt. Danach wurden unterschiedliche Mengen der Bakteriensuspension auf LB-Platten mit den jeweiligen Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden *E. coli* BL26 wie oben beschrieben mit entsprechenden pGex-Vektoren transformiert.

2.2.4.10 Plasmidpräparationen

Zur Präparation von Plasmiden aus Bakterien wurde das QIAprep[®] Miniprep Kit für kleine Bakterienvolumen und das QIAfilter Plasmid Maxi Kit für größere Bakterienvolumen benutzt.

Mini-Maßstab

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der alkalischen Lyse von Bakterien, anschließender Neutralisation und der Einstellung von Hochsalz-Bindungsbedingungen, aufgrund derer die Plasmid-DNA an die

Silicagelmembran einer Qiaprep-Säule bindet. Nach Waschen mit ethanolhaltigem Puffer wird die DNA mit Wasser eluiert, da sie bei Nidrigsalzbedingungen und einem pH-Wert von 7,5-8,0 nicht mehr an die Membran bindet.

Eine Bakterienkolonie wurde in 3 ml YT-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (von einer Agar-Platte gepickt bzw. Glycerol-Bakterienstamm) überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von der Bakteriensuspension wurde 1 ml bei 9000 x g, 4°C für 10 min abzentrifugiert und das Bakterienpellet entsprechend der Angaben des Herstellers weiterbehandelt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 50 µl ddH₂O.

Maxi-Maßstab

Die Bakterien werden bei dieser Methode durch alkalischen Puffer lysiert und anschließend neutralisiert. Unter Nidrigsalzbedingungen bindet die Plasmid-DNA an eine Anionenaustauschersäule, Verunreinigungen werden durch Waschen mit einem Puffer mittleren Salzgehalts entfernt und anschließend wird die Plasmid-DNA mit einem Hochsalzpuffer eluiert. Durch Isopropanolfällung werden die Salze entfernt und nach Waschen mit 70%-igem Ethanol wird das DNA Pellet in Wasser aufgenommen.

200 µl einer 3 ml Übernachtkultur wurden zu 200 ml YT –Medium mit entsprechendem Antibiotikum pipettiert und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde nach Angaben des Herstellers weiter bearbeitet. Die Plasmid-DNA wurde ddH₂O aufgenommen und durch Spektralphotometrie die DNA-Konzentration ermittelt.

2.2.4.11 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

In Wasser gelöste DNA und RNA haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Dies nutzt man, um durch spektralphotometrische Analysen mit Präzisions-Küvetten aus Quarzglas (Schichtdicke 10 mm) die Konzentration zu bestimmen.

$$\text{Optische Dichte (OD)} = \text{Absorption} = \frac{\text{Transmission}_{\text{Probe}}}{\text{Transmission}_{\text{Lösungsmittel}}}$$

DNA-Konzentrationsbestimmung

Die zu messende DNA-Probe wurde mit sterilem ddH₂O verdünnt. Über den Absorptionswert (A_{260}) wurde die Konzentration mit folgender Formel berechnet:

$$1 \text{ OD} = 50 \text{ µg/ml}$$

$$\text{DNA-Konzentration [µg/µl]} = A_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}/1000$$

RNA-Konzentrationsbestimmung

Die zu messende RNA-Probe wurde mit sterilem ddH₂O verdünnt. Über den Absorptionswert (A_{260}) wurde die Konzentration mit folgender Formel berechnet:

$$1 \text{ OD} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{260} \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}/1000$$

2.2.4.12 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Für die Sequenzierung von DNA wurde das ABI BigDye[®] Terminator 3.1 Kit benutzt. Das Prinzip beruht auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Dabei wird eine lineare PCR durchgeführt, in deren Ansatz neben den vier Desoxyribonukleotiden (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) auch fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) vorliegen. Wird bei der Kettenverlängerung ein Didesoxyribonukleotid eingebaut, kommt es, aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxyl-gruppe am ddNTP zum Kettenabbruch. Der Einbau der Didesoxyribonukleotide ist zufällig. Daher liegen nach entsprechender Zyklenanzahl Abbruchfragmente jeder möglichen Nukleotidzahl vor, welche über ein denaturierendes Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Da die vier Didesoxyribonukleotide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann während der Elektrophorese ermittelt werden, welches Didesoxyribonukleotid sich an der Abbruchstelle befindet. Durch eine spezielle Software wird das so entstandene Fluoreszenzmuster zur Nukleotidsequenz verarbeitet. Die in der Sequenzierung eingesetzte DNA-Menge richtete sich nach der Länge des DNA-Fragmentes:

1-3 ng (Fragmentgröße 100-200 bp)

3-10 ng (Fragmentgröße 200-500 bp)

10-20 ng (Fragmentgröße 500-1000 bp)

150-300 ng (Plasmid-DNA)

Sequenzieransatz

DNA-Template + 0,5 μl Primer (20 μM) + 1 μl BigDye 3.1

ad 10 μl ddH₂O

Cycler-Programm

Denaturierung	95°C	1 min	
Denaturierung	95°C	10 s	
Annealing	55°C	5 s	25 Zyklen
Elongation	60°C	4 min	
Pause	4°C	∞	

Die Sequenzierproben wurden nach der PCR im hausinternen Sequenzierlabor des RKI gereinigt, elektrophoretisch aufgetrennt und mit der Sequencing Analyses 3.7 Software ausgewertet.

2.2.4.13 Herstellung der pGex-Plasmide für die Expression von GST-Fusionsproteinen

Für die Konstruktion der Plasmide pGex-Importin α 1, pGex-UAP56 und pGex-Tap wurden die kodierenden Sequenzen von Importin α 1, UAP56 bzw. Tap aus den entsprechenden Vektoren pRSET-hSRP1 α , pLP-EGFP-C1-UAP56 bzw. pEGFP-C2-TAP durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen *Bam*HI und *Xba*I (Importin α 1), *Bam*HI und *Xho*I (UAP56) bzw. *Bam*HI und *Sa*II (Tap) in den Vektor pGex5X.1 inseriert.

2.2.4.14 Mutagenese von pHW-Lee-NS zur Herstellung von pHW-Lee-NS#3/47 und #2/3

Ziel war die Herstellung von pHW-Lee-NS Plasmiden, deren Segmente für NS1 Proteine mit Alaninaustauschen basischer Aminosäuren an den Positionen R47/K52/R53/K54 bzw. R47/R50/K52/R53/K54 kodierten. Dafür diente das Plasmid pHW-Lee-NS#3 in einer PCR mit einem T7 Vorwärtsprimer sowie den reversen Mutageneseprimern B/NS1#3-47rev bzw. B/NS1#3-47/50rev als Matrize (Abb. 2.1). Das Plasmid pHW-Lee-NS#3 kodiert für ein NS1 Protein mit Alaninaustauschen der Aminosäuren K52/R53/K54. Die Plasmide pHW-Lee-NS#3/47 und #2/3 wurden durch das Einfügen zusätzlicher Nukleotidaustausche im NS#3 Segment generiert. Ferner wurde durch den Austausch der Nukleotide eine *Sap*I Restriktionsschnittstelle generiert, welche die Identifikation der Mutanten gegenüber dem Ausgangsplasmid ermöglichte. Die in der PCR erzeugten NS-Fragmente enthielten die terminalen die Restriktionsschnittstellen *Sa*II und *Pst*I und wurden über diese Schnittstellen in den Vektor pHW-Lee-NS#3 eingefügt. Nach Transformation in *E. coli* XL1-blue Zellen und Isolation von Plasmid-DNA in der Miniprep wurden positive Klone durch einen Restriktionsverdau mit *Sap*I identifiziert und anschließend durch Sequenzierung bestätigt.

B/NS WT:	5' GAC TAT CCT GGT CAA GAC	^{47/R} CGC CTA	^{50/R} CAC AGA	^{52/K 53/R 54/K} CTA AAA CGA AAA 3'
B/NS#3/47:	5' GAC TAT CCT GGT CAA GAC	^{47/A} <u>GCT CTT</u>	^{50/R} CAC AGA	^{52/A 53/A 54/A} CTA <u>GCT GCA GCA</u> 3'
		<i>Sap</i> I		<i>Pst</i> I
B/NS#2/3:	5' GAC TAT CCT GGT CAA GAC	^{47/A} <u>GCT CTT</u>	^{50/A} CAC GCA	^{52/A 53/A 54/A} CTA <u>GCT GCA GCA</u> 3'
		<i>Sap</i> I		<i>Pst</i> I

Abb. 2.1: Darstellung der Nukleotidsequenz 121-162 vom B/NS WT Segment und den Mutanten #3/47 und #2/3. Die NS-Nukleotide 121-162 des NS-Segments wurden mit entsprechenden Nukleotidaustauschen als reverse Primer für die Amplifizierung der NS-Segmente #3/47 und #2/3 generiert und in der PCR eingesetzt. Die ‚fett‘ markierten Nukleotide wurden bereits im Plasmid pHW-Lee-NS#3 im Vergleich zur WT NS-Sequenz ausgetauscht. Rot markiert sind sie Nukleotide, welche gegenüber der Matrize ausgetauscht wurden. Ferner sind die gegen Alanin ausgetauschten Aminosäurepositionen sowie die eingefügten Restriktionsschnittstellen angegeben.

2.2.4.15 Subklonierung trunkierter B/NS1 Fragmente in die Vektoren pHM829 bzw. pHM839

Die B/NS1 Fragmente 1-90, 12-90, 12-104, 1-83, 1-73, 1-65 und 46-56 wurden aus dem Plasmid pHW-Lee-NS mit entsprechenden Primern (2.1.8) amplifiziert. Die PCR-Fragmente enthielten terminale *XbaI* Schnittstellen und wurden über diese ungerichtet in den *XbaI* geschnittenen Vektor pHM829 inseriert. Um eine Religation des Vektors zu verhindern, wurde dieser direkt nach dem Verdau mit 5 µl CIAP für 30 min bei 37°C inkubiert. Das B/NS1 Fragment 46-56#2/3 wurde aus dem Plasmid pHW-Lee-NS#2/3 mit entsprechenden Primern (2.1.10) amplifiziert und wie oben beschrieben in den Vektor pHM829 inseriert. Die B/NS1 Fragmente 1-104 und 1-104#2/3 wurden aus dem Plasmid pHW-Lee-NS bzw. pHW-Lee-NS#2/3 mit entsprechenden Primern (2.1.10) amplifiziert. Die PCR-Fragmente enthielten terminale *XbaI* Schnittstellen und wurden über diese ungerichtet in den *XbaI* geschnittenen Vektor pHM839 inseriert. Durch Kolonie-PCR wurden positive Klone identifiziert. Positive *E.coli* Kolonien wurden in einer Maxikultur vermehrt und die Plasmid-DNA mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit von Qiagen isoliert. Die Sequenzen der Plasmide wurden durch Sequenzierung bestätigt.

2.2.4.16 Subklonierung von B/NS1 Fragmenten in pHM829 mit dem BD In-Fusion™ PCR Klonierungssystem

Die Plasmide pHM829-NS1-104, pHM829-NS105-281 und pHM829-NS1-104#2/3 wurden mit dem BD In-Fusion™ PCR Klonierungssystem (Clontech) generiert. Dieses System verzichtet auf die Behandlung der PCR-Fragmente mit Restriktionsenzymen, Phosphatasen oder Ligasen.

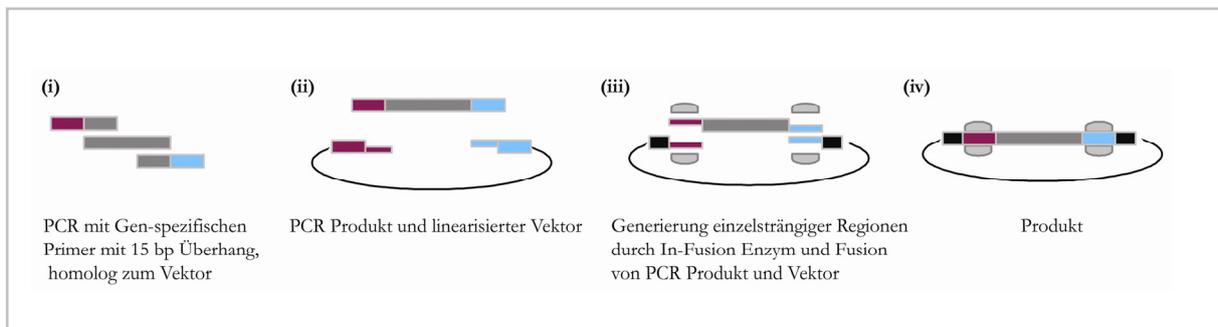


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des BD In-Fusion™ PCR-Klonierungssystems. Das zu klonierende DNA-Fragment wird mit Gen-spezifischen Primern, welche 15 Basenpaar lange, zum Plasmid homologe Überhänge haben, in einer PCR amplifiziert (i). Der linearisierte Vektor und das PCR-Fragment werden 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem In-Fusion Enzym inkubiert (ii). Dieses generiert Einzelstrangbereiche an den Enden des PCR Produkts und des Vektors (iii), welche anschließend aufgrund des 15 Basenpaar langen homologen Bereiches fusioniert werden (iv). Das so entstandene Plasmid kann dann in *E. coli* Zellen transformiert werden.

Das zu klonierende DNA-Fragment wird in einer PCR von einer entsprechenden Matrize amplifiziert. Die dafür verwendeten Primer enthalten zum einen am 3'-Ende die genspezifische Sequenz und zum anderen am 5'-Ende mindestens 15 Nukleotide, welche homolog zum linearen Plasmid-DNA sind, in welches das PCR-Produkt eingefügt werden soll (Abb. 2.2). Das PCR-Fragment und der linearisierte Vektor werden mit dem In-Fusion Enzym inkubiert. Dieses Enzym ist eine Poxvirus DNA Polymerase. Diese besitzt eine 3'-5' Exonuklease-Aktivität, durch welche Nukleotide vom 3'-Ende der PCR Fragmente entfernt werden

und somit einzelsträngige Überhänge entstehen. Die so entstandenen einzelsträngigen Regionen des PCR-Fragments und die Überhänge des linearisierten Vektors werden nicht kovalent aneinander gelagert und nach Transformation in kompetente *E. coli* Zellen (BD Fusion-Blue™) durch eine bakterielle Ligase verknüpft.

Für die Klonierung wurde der Vektor pHM829 mit *Xba*I geschnitten und anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen gereinigt. Die B/NS1 Fragmente NS1-104, NS105-281 und NS1-104#2/3 wurden mit den Primern BD-B/NSaa1-104 F/R und BD-B/NSaa105-281 F/R aus den Plasmiden pHW-Lee-NS*Xba*I bzw. pHW-Lee-NS#2/3 durch PCR amplifiziert und anschließend auf einem Agarosegel anhand des Standardgrößenmarkers quantifiziert. 100 ng geschnittener Vektor wurden mit 50 ng PCR-Fragment gemischt und mit ddH₂O zu einem Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Anschließend wurden diese 10 µl DNA-Gemisch zu dem lyophilisierten BD-Reaktionsansatz gegeben, der Reaktionsansatz wurde gemischt, 30 Minuten bei 42°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Die 10 µl Reaktionsansatz wurden mit 40 µl TE Puffer (vom Hersteller) verdünnt und 2,5 µl dieses Ansatzes wurden in kompetente BD Fusion-Blue™ *E. coli* Zellen nach Angaben des Herstellers transformiert. Durch Kolonie-PCR wurden positive Klone identifiziert, diese in einer Maxikultur vermehrt und die Plasmid-DNA mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit von Qiagen isoliert. Die Sequenzen der Plasmide wurden durch Sequenzierung bestätigt.

2.2.5. Zellbiologische Methoden

2.2.5.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Zellen für die indirekte Immunfluoreszenzanalyse wurden in Kulturschalen auf Deckgläschen ausgesät. Nach entsprechender Behandlung der Zellen (Infektion oder Transfektion) wurden diese zweimal mit PBS gewaschen, mit 2,5 %-iger Formaldehydlösung (Methanol-frei) in PBS für 15 min fixiert und anschließend mit 0,2 %-iger Triton-X-100-Lösung in PBS für 10 min permeabilisiert. Primäre und sekundäre Antikörper wurden für die Immunfluoreszenzanalyse in 3 % BA-Lösung in PBS verdünnt (s. 2.1.12). An den sekundären Antikörper war ein Fluoreszenzfarbstoff (Alexa-Farbstoff) gekoppelt, welcher nach Anregung mit Licht einer spezifischen Wellenlänge (488 oder 594 nm) in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar ist. 20 µl der Primärantikörper-Verdünnung wurden auf Parafilm vorgelegt. Das Deckgläschen wurde mit der Zellrasen-Seite nach unten auf die Antikörperverdünnung gelegt und in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei RT°C oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper entsprechend der vorherigen Beschreibung im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend kurz in H₂O getaucht. Auf einen Objektträger wurden 6 µl Mowiol pipettiert und das Deckgläschen mit der Zellrasen-Seite nach unten auf den Mowioltropfen gelegt. Die Präparate wurden im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Die so markierten Proteine wurden in der konventionellen oder konfokalen Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht und charakterisiert.

2.2.5.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen wurde in dieser Arbeit mit der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie untersucht. Dafür wurde das konfokale Laser Scanning Mikroskop LSM 510 bzw. LSM 510 Meta von Zeiss verwendet. Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie bietet die Möglichkeit, das von einer einzigen Ebene eines Präparats reflektierte bzw. emittierte Licht zu erfassen. Eine Lochblende (Pinhole) verhindert dabei die Detektion von Licht, welches nicht aus der Fokusebene stammt und somit werden außerfokale Objektinformationen ausgeblendet. Durch einen Laserstrahl mit entsprechend dem Fluoreszenzfarbstoff angepasster Anregungswellenlänge wird das Präparat pixel- und zeilenweise abgerastert. Die Pixeldaten werden von einem Detektor registriert und anschließend digital zu einem Bild zusammengesetzt. Dieses Bild zeichnet sich durch einen hohen Kontrast und eine hohe Auflösung aus. Zusätzlich bietet das LSM 510 den Vorteil, ein Signalübersprechen verschiedener Fluoreszenzen zu verhindern und somit mehrfach Fluoreszenzfärbungen in einem Präparat zu detektieren, da es vier konfokale Detektionskanäle mit separater Blende besitzt.

Die Proben wurden wie in 2.2.5.1 beschrieben für die Mikroskopie vorbereitet. Für die in dieser Arbeit gezeigten Bilder wurde das Objektiv C-Apochromat 63/1.2 water objective lens von Zeiss benutzt. Die Daten wurden mit der Software „Zeiss LSM Image Browser 3.5“ und „Photoshop 4.0“ analysiert und prozessiert.

2.2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.2.6.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine nach Denaturierung und Ladungsausgleich (durch β -Mercaptoethanol und SDS) ihrer Größe nach voneinander getrennt.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der SDS-Gele

Zusammensetzung der SDS-Gele	Trenngel		Sammelgel
	7,5 %	12,5 %	5 %
30 % Acrylamid/Bis (29:1)	2,6 ml	4,1 ml	0,83 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml		
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)			1,25 ml
10 % SDS	100 μ l		50 μ l
10 % APS	100 μ l		50 μ l
TEMED	6 μ l		6 μ l
H ₂ O	4,7 ml	3,2 ml	2,8 ml

In einer Mini-Protean3 Gießvorrichtung von Bio-Rad wurde zwischen zwei vorher mit Isopropanol entfetteten Glasplatten mit einem Abstand von 0,75 mm bzw. 1,5 mm zuerst das Trenngel und nach dessen Polymerisierung das Sammelgel gegossen. Durch einen Kamm im Sammelgel wurden die Taschen zur Probenbeladung freigehalten. Die Proben wurden mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert, kurz abzentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA pro Gel in vertikalen Laufapparaturen von Bio-Rad.

2.2.6.2 Immunoblot

Der Transfer der in der PAA-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte mit dem Semidry-Blotverfahren in Biorad-Kammern. Die Membran und Whatman-Papiere wurden in Semidry-Blotpuffer äquilibriert. Danach wurde die Blotapparatur wie folgt aufgebaut: Anode, 3 x 3 mm Whatmanpapier, Nitrozellulose-Membran, Gel, 3 x 3 mm Whatman-Papier, Kathode. Die Proteine wurden für 54 Minuten (dünne Gele) bzw. 84 Minuten (dicke Gele) bei 75 mA pro Gel auf die Membran transferiert. Anschließend wurden die Proteine auf der Membran zur Kontrolle mit Ponceau-Rot gefärbt. Die Membran wurde 1 Stunde in 3 % Magermilchpulver in 1 x TBST blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in 0,5 % Magermilchpulver in 1 x TBST für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C unter ständigem Schwenken. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x TBST für je 10 min folgte die Inkubation mit dem sekundären Spezies-spezifischen Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper in 0,5 % Magermilchpulver in 1 x TBST für 1 Stunde bei RT. Die Verdünnungen der jeweiligen Antikörper sind in Kap. 2.1.12 angegeben. Nach sechs Waschschritten für je 5 min wurde die Membran mit dem SuperSignal WestDura Extended Duration Substrat 5 min inkubiert. Dabei wird durch die Oxidation des Substrats eine Chemilumineszenz erzeugt, welche durch Autoradiographie detektiert wurde.

2.2.6.3 Fixieren und Trocknen von SDS-PAA-Gelele

Für den direkten Nachweis von Proteinen im PAA-Gel durch Autoradiographie nach radioaktiver Markierung oder Coomassie-Färbung wurden die Gele zunächst für 30 Minuten in Fixierlösung geschwenkt. Für eine Coomassie-Färbung wurden die Gele anschließend für mindestens eine Stunde oder über Nacht in Coomassie Brillant Blau R250-Färbelösung geschwenkt. Das Gel wurde dann zur Entfärbung des Hintergrunds mehrere Stunden in Entfärbelösung, dann kurz in Wasser geschwenkt, auf zwei Lagen Whatman-Papier gelegt, mit Haushaltsfolie abgedeckt und auf dem Geltrockner Phero-Temp 40 (Fa. BioTec Fischer) nach Anlegen eines Vakuums bei 75°C für mindestens 45 min getrocknet. Radioaktiv markierte Proteine wurden durch das Auflegen von BioMax MR Röntgenfilmen oder einer Phosphoimager-Platte auf die getrockneten Gele detektiert.

2.2.6.3 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden die pGex-Konstrukte pGex5X-1, pGex-B/NS1, pGex-ISG15, pGex-Imp α 1, pGex-UAP56 und pGexTap in *E. coli* BL26 transformiert. 50 ml

Übernachtskultur wurden in 450 ml vorgewärmtes (33°C) LB-Amp-Medium gegeben und nach zweistündiger Inkubation bei 33°C wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) zur Kultur induziert. Die Kultur wurde weitere 4 h bei 33°C geschüttelt und anschließend 15 min bei 6000 x g und 4°C für abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml kaltem PBS aufgenommen, resuspendiert und dann in 5 ml Aliquots bis zum Zellaufschluss bei –20°C aufbewahrt.

Für den Zellaufschluss wurde ein 5 ml Aliquot Bakterienkultur auf Eis stehend im Ultraschall-Desintegrator (5 Pulse á 20 s, ca. 40 Watt) aufgeschlossen, mit Triton-X100 (Endkonzentration 1 %) versetzt und dann für 30 min bei 4°C sanft rotiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 10000 und 4°C wurde der geklärte Überstand mit 200 µl Glutathion-Sepharose Suspension (1:1 in PBS) für mindestens eine Stunde bei 4°C sanft gedreht. Anschließend wurde die Matrix dreimal mit 10 ml PBS (4°C) gewaschen, 1:1 in PBS (4°C) aufgenommen und dann bei 4°C aufbewahrt. Die an der Sepharose-Matrix immobilisierten GST-Fusionsproteine konnten dann in entsprechenden GST-Kopräzipitationsversuchen eingesetzt werden.

Für die von K. Melen und Kollegen durchgeführten GST-Kopräzipitationsversuche wurden die Fusionsproteine GST-Importin α 1, 3, 4, 5 und 7 durch rekombinante Baculoviren in *Sf9* Zellen exprimiert. Die Aufreinigung der Proteine ist in Fagerlund *et al.* beschrieben (Fagerlund *et al.*, 2005).

2.2.6.4 *In vitro* Translation

Für die radioaktive Markierung von Proteinen in der *in vitro* Translation wurde das TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System benutzt. In diesem System sind die Plasmid-basierende Transkription und die Translation der entsprechenden mRNA gekoppelt. Die Transkription erfolgte durch eine T7-Polymerase von den Plasmiden pHW-Lee-NSX*boI*, pHW-Lee-NS#1, pHW-Lee-NS#2, pHW-Lee-NS#3, pHW-Lee-NS#3/47, pHW-Lee-NS#2/3, pHW-Lee-NS#4, pHW-Lee-NS#6, pHW-Lee-NS#7, pHM829, pHM839, pHM-829-B/NS1aa46-56, pHM-829-B/NS1aa46-56mut. Während der Translation wurde in die entsprechenden Peptidketten radioaktives [³⁵S]-Methionin eingebaut.

Ansatz:

25 µl Retikulozytenlysat + 2 µl Puffer + 1 µl Aminosäuremix ohne Methionin + 4 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml) + 1 µl RNasin + 1 µl T7 Polymerase + 1 µg Plasmid-DNA
ad 50 µl RNase-freies ddH₂O

Für Versuche mit RNaseA-Behandlung wurden die *in vitro* Translationsansätze ohne RNasin angesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 90 Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend für zehn Minuten bei 12000 rpm und 4°C geklärt.

2.2.6.5 GST-Kopräzipitation

Je Bindungsansatz wurden bis zu 20 µl einer mit GST-Fusionsprotein gekoppelten Glutathion-Sepharose Suspension (1:1 in PBS) mit 10-15 µl *in vitro* Translationsansatz in 1 ml HEPES-Bindungspuffer für mindestens zwei Stunden bei 4°C sanft drehend inkubiert. Wurden weniger als 20 µl mit GST-Fusionsprotein gekoppelter Glutathion-Sepharose Suspension in die Reaktion eingesetzt, wurde mit reiner Glutathion-Sepharose Suspension auf 20 µl aufgefüllt. Die Mengen der eingesetzten GST-Fusionsproteine wurden einander angeglichen und richteten sich nach dem Erfolg der Kopplung an die Matrix. Für Versuche mit RNaseA-Behandlung wurde die Matrix in 100 µl HEPES-Bindungspuffer mit 1,5 µg/µl RNaseA und entsprechende *in vitro* Translationsansätze mit 1µg/µl RNaseA für 15 Minuten bei 33°C inkubiert. Anschließend wurde der Bindungsansatz auf 1 ml mit HEPES-Bindungspuffer aufgefüllt und dann mit RNase-behandeltem *in vitro* Translationsansatz wie vorher beschrieben inkubiert. Die Matrix wurde bei 3000 rpm und 4°C pelletiert und anschließend dreimal mit 1 ml HEPES-Bindungspuffer gewaschen. Anschließend wurde sie in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgeköcht und die eluierten Proteine im PAA-Gel aufgetrennt. GST-Fusionsproteine wurden durch Coomassie-Färbung detektiert. Radioaktiv markierte Proteine wurden im getrockneten Gel durch Exposition eines Röntgenfilms oder eine Phosphoimager-Platte BAS-MP detektiert. Die Imager-Platte wurde mit dem Fluorescent Image Analyzer und der Software Image Reader V1.5E FLA-2000/2000G und Image Gauge V3.01 ausgewertet.

2.2.6.6 RNA-Immunopräzipitation (RIP)

Dieses Assay wurde benutzt, um eine Interaktion des viralen B/NS1 Proteins mit mRNA zu untersuchen. Dafür wurde das B/NS1 Protein mit einem spezifischen Antikörper aus infizierten Zellysaten immunopräzipitiert und anschließend gebundene RNA-Moleküle isoliert und durch RT-PCR nachgewiesen.

6 x 10⁶ A549 Zellen wurden nicht oder mit Influenza B/Lee WT oder Mutante #4 mit einer MOI von 2,5 infiziert (s. 2.2.1.4). 8 h nach der Infektion wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS auf Eis gewaschen, in 1 ml PBS mit einem Zellschaber abgekratzt und dann für 3 bei 1000 rpm und 4°C pelletiert. Die Zellen wurden in 500 µl RIP Lysispuffer für 25 Minuten auf Eis lysiert und die Lysate anschließend für 10 Minuten bei 12000 rpm und 4°C geklärt. 15 µl Lysat wurden mit 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und im Western Blot als Input Proben analysiert. 40 µl Lysat wurden als Input-Proben für die RNA-Isolierung eingesetzt. Für die RNA-Isolierung wurden Lysate von 6 x 10⁶ Zellen, für die Analyse im Western Blot die Lysate von 3 x 10⁶ Zellen in die Immunopräzipitation eingesetzt. Die Ansätze wurden auf 1 ml mit RIP NT2 Puffer aufgefüllt und über Nacht mit 1 µl B/NS1-spezifischem Kaninchen-Antiserum bzw. Präimmun-Kaninchen-Antiserum drehend bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze mit 30 µl einer Protein G Agarose Suspension (1:1 in PBS) für 3 Stunden sanft drehend bei 4°C inkubiert. Die Matrix wurde dann dreimal mit 1 ml RIP NT2 Puffer gewaschen und pelletiert. Für die Analyse im Western Blot wurde die Matrix in 30 µl SDS-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Die weiteren Analysen erfolgten wie in 2.2.6.1 und 2.2.6.2 beschrieben.

Für den Nachweis der immunpräzipitierten RNA wurde die Matrix in 100 µl RIP NT2 Puffer mit 5 µl RQ1 RNase-Free DNase für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Input Proben wurden auf 100 µl mit RIP NT2 Puffer aufgefüllt und ebenfalls mit RQ1 RNase-Free DNase behandelt. Die Matrix wurde pelletiert, 1 x mit 500 µl RIP NT2 Puffer gewaschen und dann in 100 µl RIP NT2 Puffer mit 0,1 % SDS und 0,5 mg/ml Proteinase K bei 55°C für 30 Minuten inkubiert. Die Proben wurden auf 200 µl mit RIP NT2 Puffer aufgefüllt. Die RNA wurde wie in 2.2.4.2 und 2.2.4.7 beschrieben isoliert und gereinigt und anschließend in der RT-PCR analysiert.

3. Ergebnisse

Trotz intensiver Anstrengungen auf dem Gebiet der Influenzavirusforschung weiß man bis heute wenig darüber, wie diese Viren den nuklearen Export ihrer mRNA gewährleisten. Dieser wichtigen biologischen und virologischen Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit nachgegangen und dabei insbesondere eine Rolle des NS1 Proteins von Influenza B Virus in diesem Prozess beleuchtet.

In einer früheren eigenen Analyse wurde für das NS1 Protein von Influenza B Virus (B/NS1) eine Kolokalisation mit dem Spleißfaktor SC35 in nuklearen Speckle-Domänen beschrieben (Abb. 3.1). In diesen Domänen akkumulieren Proteine, die an der Prozessierung sowie dem Export zellulärer Transkripte beteiligt sind. Da für das B/NS1 Protein, anders als für das A/NS1 Protein, eine inhibitorische Funktion auf das Spleißen zellulärer Transkripte ausgeschlossen wurde (Jana Schneider, Diplomarbeit, 2005), ist ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation des Proteins in nuklearen Speckle-Domänen und dem Spleißvorgang unwahrscheinlich. Es entstand die Hypothese, dass die Interaktion des B/NS1 Proteins mit Speckle-Domänen eine Funktion des Proteins im mRNA Export widerspiegelt, möglicherweise durch eine Interaktion mit einem Speckle-assoziierten mRNA Exportprotein.

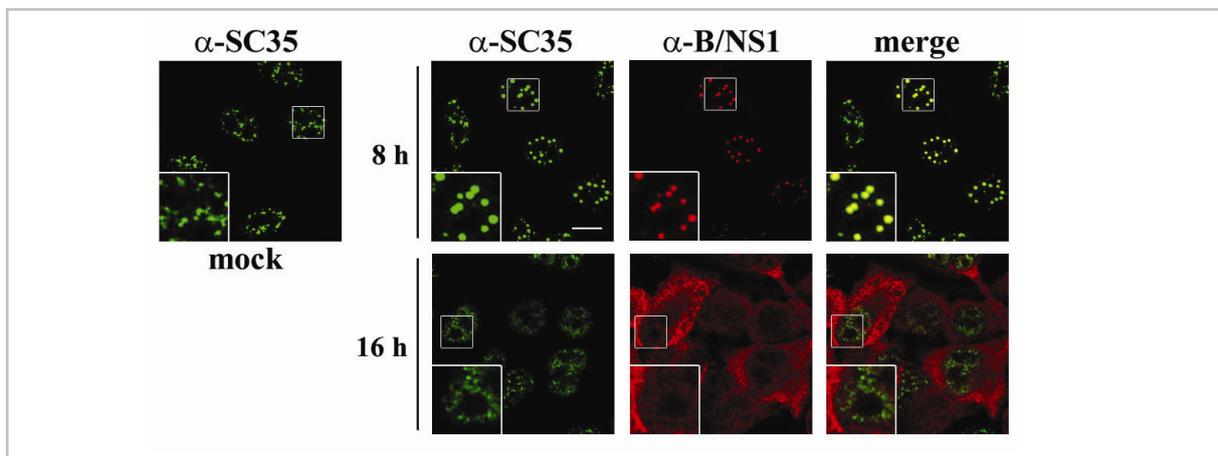


Abb. 3.1: Das NS1 Protein von Influenza B Virus interagiert mit nuklearen Speckle-Domänen und verändert deren Morphologie. A549 Zellen wurden nicht (mock – linkes Panel) oder mit Influenza B/Yam/1/73 (rechtes Panel) für 8 oder 16 h infiziert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und gefärbt gegen B/NS1 und SC35 mit B/NS1-spezifischem Kaninchen-Antiserum und monoklonalem SC35-Antikörper und anschließender Detektion mit sekundären α -Kaninchen IgG-Alexa 594 und α -Maus-IgG-Alexa 488 Antikörpern. Die gefärbten Zellen wurden mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) mit einem 488 nm und einem 594 nm Laser analysiert. Für jede Färbung ist eine Abbildung allein und eine entsprechende Überlagerung beider Signale (merge) dargestellt. Maßstab = 10 μ m.

Bisher ist für Speckle-Domänen assoziierte Proteine keine einheitliche Signalsequenz beschrieben, welche die Lokalisation entsprechender Proteine in diesen Domänen vermittelt. Ein nukleares Lokalisationssignal sowie die minimale B/NS1 Sequenz für die Interaktion mit nuklearen Speckle-Domänen wurden u. a. durch die Expression trunkierter B/NS1-Fragmente in einem autofluoreszierenden Fusionsprotein ermittelt. Die biologische Bedeutung der Speckle-Interaktion des NS1 Proteins für die Virusreplikation wurde mit rekombinanten Influenza B Viren untersucht, deren NS1 Proteine weder in der Lage waren, im

Zellkern zu lokalisieren, noch mit nuklearen Speckle-Domänen zu interagieren. Zellbiologische und proteinbiochemische Methoden ermöglichten die Identifikation nuklearer Interaktionspartner vom B/NS1 Protein und gaben somit Hinweise auf die funktionelle Bedeutung der B/NS1 Interaktion mit nuklearen Speckle-Domänen.

3.1 Charakterisierung der Interaktion von B/NS1 mit nuklearen Speckle-Domänen

Bisher wurde nicht überprüft, ob die Interaktion des B/NS1 Proteins mit nuklearen Speckles eine in verschiedenen Influenza B Viren konservierte Eigenschaft ist und in verschiedenen Wirtszellspezies stattfindet. Daher sollten diese Aspekte zunächst überprüft werden.

3.1.1 Die Interaktion von B/NS1 mit Speckle-Domänen ist in Influenza B Viren konserviert und in verschiedenen tierischen Zellen detektierbar

Es wurde untersucht, ob die NS1 Proteine verschiedener Influenza B Virusstämme, welche rund 90% Sequenzidentität aufweisen, in punktförmigen Strukturen akkumulieren und die Interaktion mit Speckle-Domänen somit in verschiedenen Influenza B Virusstämmen konserviert ist. Dafür wurden A549 Zellen mit dem rekombinanten Influenza B/Lee/rec Virus und den natürlichen Influenza B Virusisolaten B/Yamagata/1/73 (B/Yam/1/73), B/Thüringen/2/06 (B/Thr/2/06) und B/Berlin/37/06 (B/Bln/37/06) mit einer Multiplizität („multiplicity of infection“ (MOI)) von 2 infiziert. Die Zellen wurden 4 h oder 6 h und 16 h nach der Infektion fixiert, permeabilisiert und die NS1 Proteine mit einem NS1-spezifischen Kaninchen-Antiserum und entsprechendem sekundären, Alexa 488-gekoppeltem Antikörper detektiert.

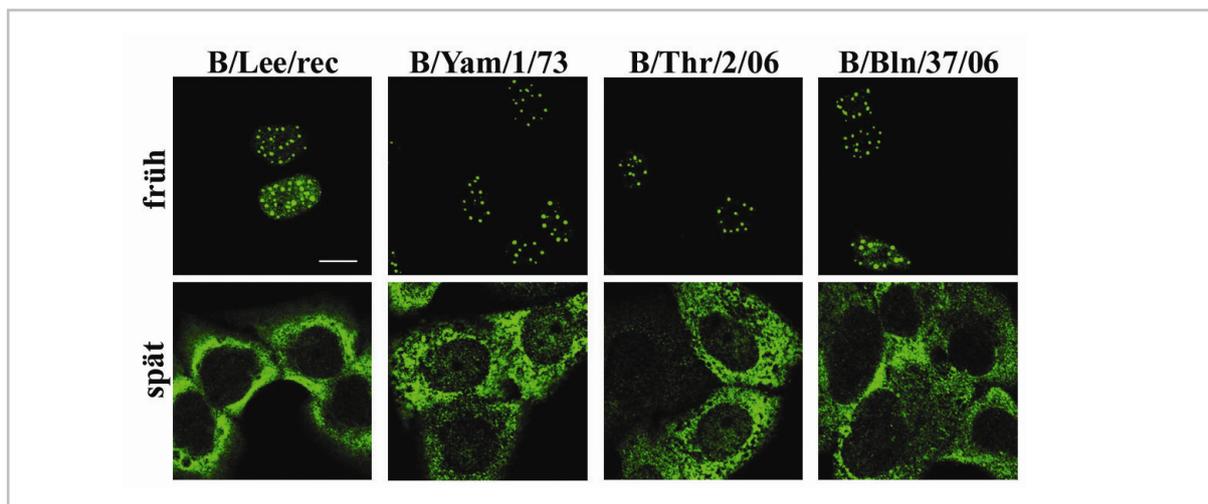


Abb. 3.2: Die Interaktion des B/NS1 Proteins mit nuklearen Speckle-Domänen während einer Infektion ist in verschiedenen Influenza B Virusstämmen konserviert. A549 Zellen wurden mit den Influenza B Viren B/Lee/rec, B/Yamagata/1/73 (B/Yam/1/73), B/Thüringen/2/06 (B/Thr/2/06) und B/Berlin/37/06 (B/Bln/37/06) mit einer MOI von 2 infiziert. Die Zellen wurden in der frühen (4 – 6 h) und späten (16 h) Phase nach der Infektion (post infection - p. i.) fixiert und permeabilisiert. Die B/NS1 Proteine wurden mit primärem NS1-spezifischem Kaninchen-Antiserum und entsprechendem sekundären Alexa 488 Fluorophor-gekoppelten Antikörper gefärbt. Die Zellen wurden mittels CLSM mit einem 488 nm Laser analysiert. Maßstab = 10 μ m.

Die NS1 Proteine der vier untersuchten Influenza B Virusstämme waren in der frühen Phase der Infektion im Zellkern lokalisiert und akkumulierten dort in punktförmigen Strukturen (Abb. 3.2). Die Zeitpunkte der B/NS1 Lokalisation in Speckle-Domänen variierten zwischen verschiedenen Virusstämmen von 4 - 6 h nach der Infektion. Dies korrelierte mit der Geschwindigkeit der Replikation der verschiedenen Viren in A549 Zellen. In der späten Phase der Infektion waren die NS1 Proteine im Zytoplasma lokalisiert. Die Interaktion der NS1 Proteine mit nuklearen Speckle-Domänen und die Regulation der Proteinlokalisierung während der Infektion war somit in allen untersuchten Influenza B Virusstämmen konserviert.

Um auszuschließen, dass die Interaktion von B/NS1 mit Speckles und deren morphologische Veränderung nur zelltypspezifisch auftrat, wurden humane A549 Lungeneithelzellen, kanine MDCKII Zellen und humane HeLa Zellen kontrollbehandelt (mock) oder mit B/Lee WT-Virus infiziert und 8 h nach der Infektion gegen das NS1 Protein und SC35 gefärbt. In nicht infizierten Zellen waren die nuklearen Speckle-Domänen unabhängig vom Zelltyp irregulär geformt und netzartig miteinander verbunden (Abb. 3.3). Nach einer Infektion erschienen diese Domänen abgerundet und vereinzelt und das B/NS1 Protein wurde hier kolokalisiert. Allerdings variierten die Zeitpunkte zwischen verschiedenen Zelllinien, an welchen eine Interaktion von B/NS1 mit nuklearen Speckle-Domänen zu beobachten war. Vermutlich ist dies mit den unterschiedlich langen Replikationszyklen der Viren in den jeweiligen Wirtszellen erklärbar.

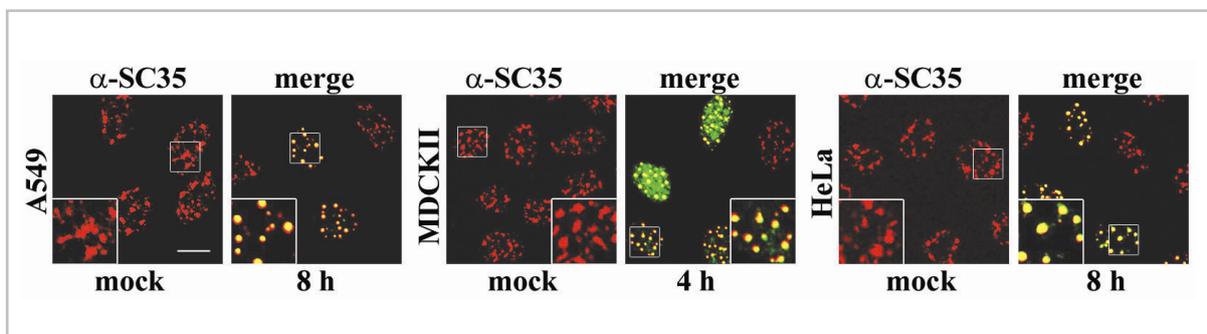


Abb. 3.3: Die Interaktion von B/NS1 mit nuklearen Speckle-Domänen tritt in allen getesteten tierischen Zelllinien auf. MDCKII, A549 und HeLa Zellen wurden mock-behandelt oder mit B/Lee/rec mit einer MOI von 1, 2 oder 3, entsprechend infiziert und nach 8 h für die CLSM vorbereitet und gegen B/NS1 und SC35 gefärbt mit B/NS1-spezifischem Kaninchen-Antiserum und monoklonalem SC35-Antikörper und anschließender Detektion mit sekundärem α -Kaninchen IgG-Alexa 488 und α -Maus-IgG-Alexa 594. Die gefärbten Zellen wurden mittels CLSM analysiert. Für die SC35-Färbung ist eine Abbildung allein und mit der entsprechenden NS1-Färbung überlagert (merge) dargestellt. Maßstab = 10 μ m.

Die Lokalisation des B/NS1 Proteins wurde weiterhin in embryonalen Fibroblasten der Maus untersucht. Auch in diesen Zellen zeigte sich eine punktförmige Verteilung des B/NS1 Proteins in der frühen Infektionsphase im Kern (Daten nicht gezeigt). Diese Zellen konnten jedoch nicht gegen das SC35 Protein gefärbt werden, da der verfügbare Antikörper das entsprechende murine Protein nicht detektierte. Die Ergebnisse zeigten, dass in allen untersuchten Zellen während einer Influenza B Virusinfektion eine Interaktion von B/NS1 mit nuklearen Speckles sowie deren morphologische Veränderung zu beobachten

war und diese Eigenschaft somit unabhängig vom Wirt ist. Bisher wurde ausschließlich die Kolokalisation von B/NS1 mit SC35, dem Markerantigen von Speckle-Domänen, untersucht. Im Anschluss wurde überprüft, ob andere Speckle-assoziierte Proteine mit B/NS1 kolokalisieren und damit Rückschlüsse auf eine mögliche Interaktion des viralen Proteins mit einem dieser Proteine zulassen.

3.1.2 Transient exprimiertes B/NS1 Protein kolokalisiert mit verschiedenen Speckle-assoziierten zellulären RNA-Prozessierungsfaktoren

Die nuklearen Proteine PABP2, UAP56 und Aly/Ref sind an der Prozessierung und/oder am Transport zellulärer mRNA beteiligt und wurden als Faktoren beschrieben, die partiell mit Speckles assoziiert sind (Gatfield *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 1994). Um eine Kolokalisation dieser Faktoren mit dem B/NS1 Protein zu untersuchen, wurde ein GFP-B/NS1 Fusionsprotein allein, sowie EGFP-UAP56 und B/NS1 oder myc-Ref zusammen mit B/NS1 durch Transfektion exprimiert. Die Zellen wurden gegen endogenes PABP2, B/NS1 oder myc-Ref Fusionsprotein gefärbt und mittels CLSM analysiert (Abb. 3.4).

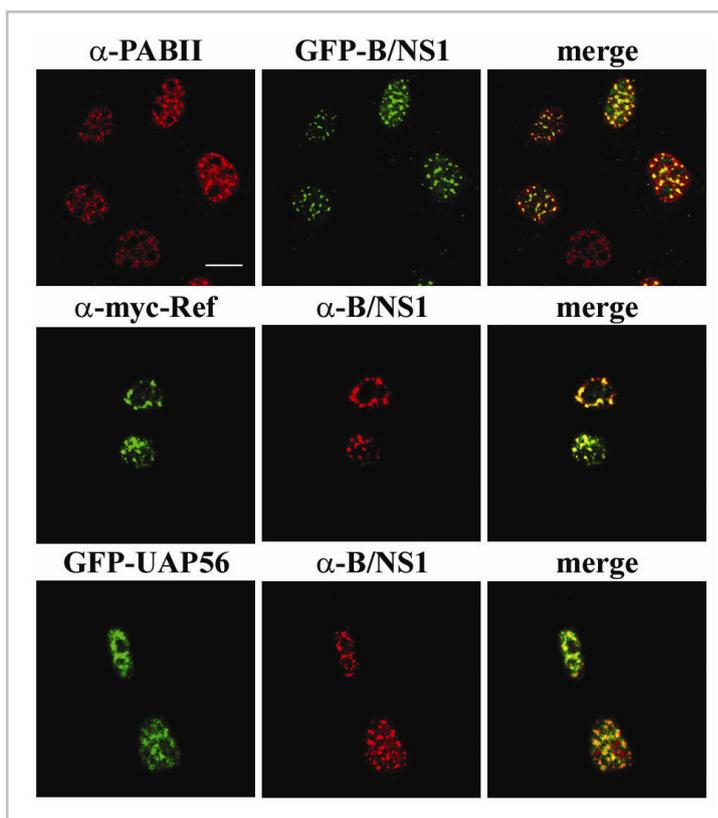


Abb. 3.4: Das B/NS1 Protein kolokalisiert mit verschiedenen Speckle-assoziierten Faktoren. MDCK Zellen wurden mit GFP-B/NS1 Expressionsplasmid allein (oberes Panel) oder pEGFP-UAP56 und pcDNA3-B/NS1 (unteres Panel) transfiziert. HeLa Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pcDNA-myc-HIS-Ref und pcDNA3-B/NS1 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und endogenes PABP2 (oberes Panel), myc-Ref Fusionsprotein und transient exprimierte B/NS1 Proteine (mittleres und unteres Panel) mit primärem monoklonalem myc-Antikörper, PABP2- oder NS1-spezifischem Kaninchen-Antiserum und den spezies-spezifischen Alexa 594- oder Alexa 488-gekoppelten sekundären Antikörpern gefärbt. Die Zellen wurden mittels CLSM analysiert. Für jede Färbung ist eine Abbildung allein und eine entsprechende Überlagerung beider Signale (merge) dargestellt. Maßstab = 10 μ m.

PABP2, myc-Ref und GFP-UAP56 waren nukleoplasmatisch diffus und in konzentrierten Clustern im Zellkern lokalisiert (Abb. 3.4). In diesen Strukturen kolokalisierten sie partiell mit den transient exprimierten GFP-B/NS1 (oberes Panel) bzw. B/NS1 Proteinen (mittleres und unteres Panel). Die nuklearen Speckle-Domänen waren anders als bei einer Infektion und einer Färbung von SC35 nur gering morphologisch verändert und erschienen vereinzelt, aber nicht abgerundet. Interessanterweise sah man für alle untersuchten Zellproteine eine partielle Kolokalisation mit dem B/NS1 Protein in nuklearen Speckle-Domänen. Dieses Ergebnis stützt zum einen die bereits beschriebene Interaktion von B/NS1 mit

Speckle-Domänen und zeigt zum anderen potentielle Interaktionspartner des viralen Proteins auf. Um die Fähigkeit des NS1 Proteins zur Speckle-Interaktion unterbinden und entsprechende Auswirkungen untersuchen zu können, wurden zunächst die Sequenzbereiche im Protein identifiziert, welche dessen spezifische zelluläre Lokalisation vermitteln.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung eines nuklearen Lokalisationssignals (NLS) in der B/NS1 Sequenz

Eine Voraussetzung der Interaktion von B/NS1 mit Speckles ist die nukleare Lokalisation des Proteins. Die meisten nuklearen Proteine besitzen karyophile Signalpeptide, welche von Kernimportrezeptoren erkannt werden. Klassische karyophile Signalpeptide oder nukleare Lokalisationssignale (NLS) weisen basische Aminosäurecluster auf, die von den Importrezeptoren gebunden werden und somit den Transport durch die in die Kernmembran eingelagerten Kernporenkomplexe vermitteln (Pemberton and Paschal, 2005). Aus einer vorhergehenden Studie der Arbeitsgruppe gab es Hinweise, dass basische Aminosäuren im N-terminalen Bereich wichtig für die Kernlokalisierung des B/NS1 Proteins sind. Diese Erkenntnisse gingen auf Lokalisationsanalysen von B/NS1 Proteinen rekombinanter Influenza B Virusmutanten zurück. Diese Virusmutanten exprimierten NS1 Proteine mit 2-3 Alaninaustauschen basischer Aminosäuren an den Positionen 33R/38R (#1), 47R/50R (#2), 52K/53R/54K (#3), 58K/60R/64K (#4) und 77R/78K (#6) (Abb. 3.5A) (Dauber *et al.*, 2006). Austausche der basischen Aminosäuren in der Aminosäuresequenz 47-54 bewirkten eine verminderte Kernlokalisierung entsprechender B/NS1 Proteine in infizierten A549 Zellen (Abb. 3.5 B).

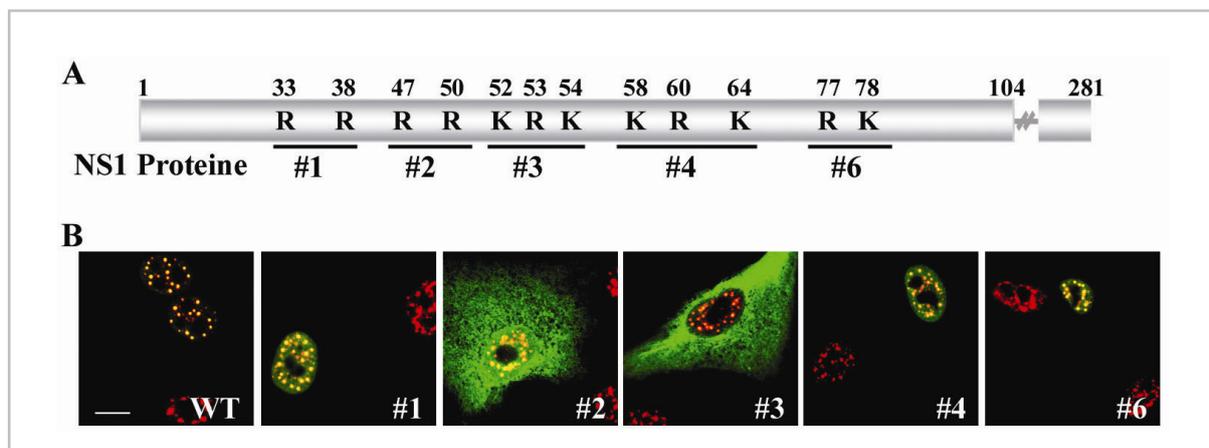


Abb. 3.5: Die basischen Aminosäuren in der B/NS1-Sequenz 47-54 sind kritisch für die Kernlokalisierung des Proteins. (A) Schematische Darstellung des B/NS1 Proteins und der Positionen der basischen Aminosäureaustausche gegen Alanin. **(B)** A549 Zellen wurden mit den rekombinanten Influenza B Virusmutanten #1, #2, #3, #4 und #6 mit einer MOI von 1 infiziert. 8 h p. i. wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und gegen B/NS1 und SC35 gefärbt mit B/NS1-spezifischem Kaninchen-Antiserum und monoklonalem SC35-Antikörper und anschließender Detektion mit sekundärem anti-Kaninchen-IgG-Alexa 488 und anti-Maus-IgG-Alexa 594. Die gefärbten Zellen wurden mittels CLSM analysiert. Die Abbildungen zeigen eine Überlagerung beider Signale. Maßstab = 10 µm.

In weitergehenden Analysen sollten die Sequenzbereiche, welche die nukleare Lokalisation des B/NS1 Proteins vermitteln sowie die verantwortlichen Importrezeptoren im Detail charakterisiert werden.

Weiterhin sollte geklärt werden, ob es, wie beim A/NS1 Protein (Greenspan *et al.*, 1988), weitere nukleare Lokalisationssignale im B/NS1 Protein gibt.

3.2.1 Die N-terminalen 104 Aminosäuren von B/NS1 vermitteln sowohl die nukleare Lokalisation als auch Speckle-Assoziation eines β -Galaktosidase-GFP Fusionsproteins

Um karyophile Sequenzbereiche im B/NS1 Protein zu definieren wurde ein Assay benutzt, welches auf der Plasmid-basierten Expression und der intrazellulären Detektion eines autofluoreszierenden Fusionsproteins (GFP) beruht (Sorg and Stamminger, 1999). Proteine, die kleiner als 40 kDa sind, können passiv durch die Kernporenkomplexe diffundieren. Das 27 kDa große GFP wird in diesem Assay mit der bakteriellen 115 kDa großen β -Galaktosidase als Fusionsprotein exprimiert. Aufgrund der Größe des Fusionsproteins wird gewährleistet, dass der Reporter nur nach Fusion eines NLS in den Zellkern transportiert wird und nicht aufgrund von Diffusion. Die kodierenden Sequenzen für die N-terminalen (aa1-104; B/NS1_N) und C-terminalen (aa105-281; B/NS1_C) B/NS1-Fragmente wurden durch Rekombination in den Vektor pHM829 zwischen die kodierenden Bereiche für die β -Galaktosidase und das GFP eingefügt. Die β -Galaktosidase-GFP Fusionsproteine wurden transient in MDCK Zellen exprimiert. Das β -Galaktosidase-GFP Fusionsprotein war aufgrund eines fehlenden NLS ausschließlich im Zytoplasma der Zelle lokalisiert (Abb. 3.6).

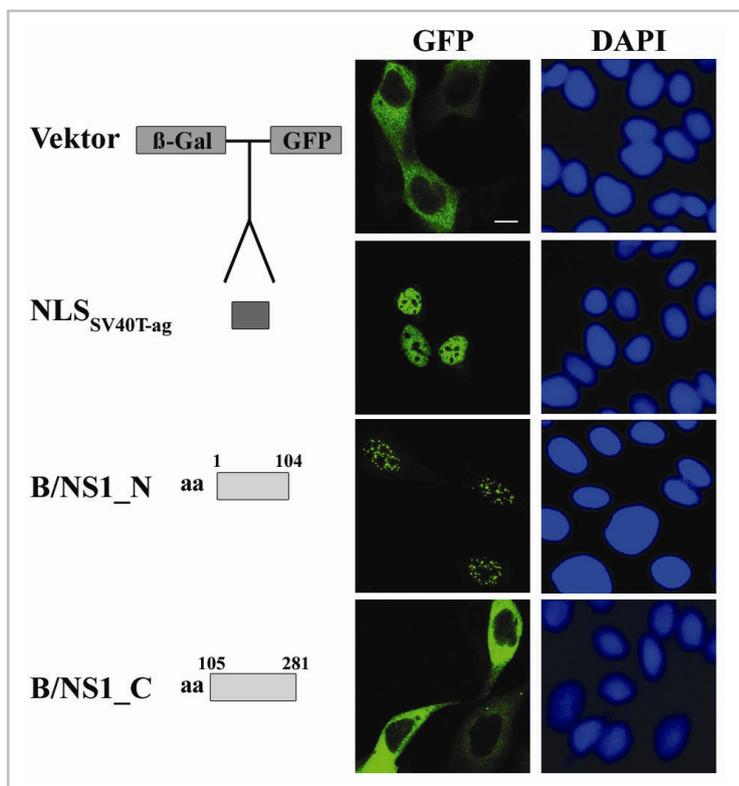


Abb. 3.6: Der N-terminale Teil (aa1-104) des B/NS1 Proteins vermittelt Kernlokalisierung und Speckle-Assoziation. Die kodierenden Sequenzen für das N-terminale (aa1-104) und C-terminale (aa105-281) B/NS1-Fragment wurden in den Vektor pHM829 zwischen die kodierenden Bereiche der β -Galaktosidase und des GFP eingefügt. Der Vektor pHM839 enthielt zusätzlich die kodierende Sequenz des SV40 T-ag NLS zwischen den β -Galaktosidase und GFP Genen. MDCK Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Mittels DAPI wurden die Zellkerne gefärbt. Die GFP Signale wurden mittels CLSM, die DAPI Signale in der Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Maßstab = 10 μ m.

Die Expression der verschiedenen Fusionsproteine mit den insertierten B/NS1 - Fragmenten zeigte, dass der

N-terminale Bereich des B/NS1 Proteins sowohl eine nukleare Lokalisation als auch eine punktförmige Akkumulation des Fusionsproteins im Zellkern vermittelte. Der C-terminale Bereich war hingegen nicht in der Lage, den Transport des Fusionsproteins in den Zellkern zu vermitteln. Um auszuschließen, dass das β -Galaktosidase-GFP Fusionsprotein bereits allein eine Interaktion mit Speckle-Domänen vermittelte,

wurde ein β -Galaktosidase-GFP Fusionsprotein mit einem heterologen NLS des SV40 T-Antigens (SV40 T-ag) exprimiert. Das entsprechende Fusionsprotein war nukleoplasmatisch diffus im Zellkern verteilt und es war keine Akkumulation in nuklearen Strukturen sichtbar (Abb. 3.6). Der N-terminale Bereich des B/NS1 Proteins (aa1-104) war somit sowohl notwendig, als auch hinreichend für eine nukleare Lokalisation und Speckle-Interaktion des Proteins. Es wurde im Folgenden der Frage nachgegangen, ob die für den Kernimport wichtigen Aminosäuren an den Positionen 47-54 bereits allein die spezifische subnukleare Lokalisation vermitteln können. Dies wurde im Kontext des β -Galaktosidase-GFP Fusionsproteins untersucht.

3.2.2 Der Austausch der basischen Aminosäuren in der B/NS1 Sequenz 47-54 zu Alanin verhindert eine nukleare Lokalisation des Proteins

Klassische nukleare Lokalisationssignale (NLS) zeichnen sich durch drei Eigenschaften aus. (1) Mutationen der basischen Aminosäuren im NLS verhindern einen Kernimport des Proteins. (2) Ein NLS vermittelt den Transport eines heterologen Proteins in den Zellkern. (3) Der nukleare Importrezeptor Importin α bindet an ein NLS und vermittelt somit den Kernimport des Proteins. Im Folgenden wurde geprüft, ob im B/NS1 Protein ein Sequenzbereich diese drei Eigenschaften aufwies.

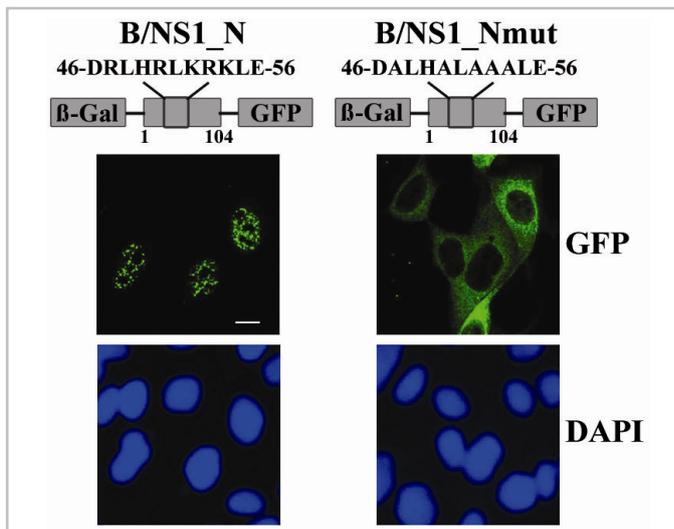


Abb. 3.7: Die basischen Aminosäuren in der B/NS1 Sequenz 47-54 vermitteln die nukleare Lokalisation eines bakteriellen Proteins. Das N-terminale Fragment (aa1-104) der B/NS1 Proteinmutante #2/3, mit Alaninaustauschen basischer Aminosäuren an den Positionen 47R/50R/52K/53R/54K, wurde in den Vektor pHM829 zwischen die kodierenden Bereiche der β -Galaktosidase und des GFP inseriert. MDCK Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die GFP Signale wurden mittels CLSM, die DAPI Signale in der Fluoreszenz Mikroskopie analysiert. Maßstab = 10 μ m.

Um den Einfluss der basischen Aminosäuren in der B/NS1 Sequenz 47-54 zu testen, wurde ein β -Galaktosidase-GFP Fusionsgen generiert, welches das N-terminale B/NS1 Fragment mit Alaninaustausch aller fünf basischen Aminosäuren an den Positionen R47/R50/K52/R53/K54 kodierte (Abb. 3.7). Das transient exprimierte B/NS1_Nmut Fusionsprotein war im Unterschied zum WT-Konstrukt diffus im Zytoplasma verteilt (Abb. 3.7). Die Aminosäureaustausche an den Positionen R47A/R50A/R52A/R53A/R54A im B/NS1 Protein verhinderten somit die Translokation des Fusionsproteins in den Zellkern. Dies wies darauf hin, dass diese fünf basischen Aminosäuren als ein monopartites NLS fungieren, welches die Translokation des Proteins in den Zellkern vermittelt.

3.2.3 Die B/NS1 Aminosäuren 46-56 vermitteln den nuklearen Import von bakterieller β -Galaktosidase und fungieren daher als autonomes NLS

Um zu überprüfen, ob die elf Aminosäure lange Sequenz 46-DRLHRLKRRKLE-56 des B/NS1 Proteins den Transport eines inerten Reporter-moleküls in den Zellkern vermitteln kann, wurde der Sequenzbereich im Kontext des β -Galaktosidase-GFP Fusionsproteins exprimiert (Abb. 3.8). Parallel wurde getestet, welche Auswirkungen der Austausch der fünf basischen Aminosäurereste in der B/NS1 Sequenz 46-56 auf die Lokalisation des Fusionsproteins hat. Die jeweilig kodierenden Sequenzen für die B/NS1 Fragmente aa46-56WT und NLSmut wurden aus den Vektoren pHW-B-Lee-NS und pHW-B-Lee-NS#2/3 amplifiziert und in den Vektor pHM829 zwischen die kodierenden Bereiche von β -Galaktosidase und GFP inseriert. Die transiente Expression der entsprechenden Fusionsproteine in MDCK Zellen zeigte, dass die elf Aminosäuren 46-56 des B/NS1 Proteins allein in der Lage waren, den Transport des Fusionsproteins in den Kern zu vermitteln, wo es nukleoplasmatisch verteilt war (Abb. 3.8; rechtes Panel). Ein Austausch der fünf basischen Aminosäuren in dem elf Aminosäuren langen NLS verhinderte jedoch den Kernimport des Fusionsproteins, welches im Zytoplasma lokalisiert war (Abb. 3.8; linkes Panel).

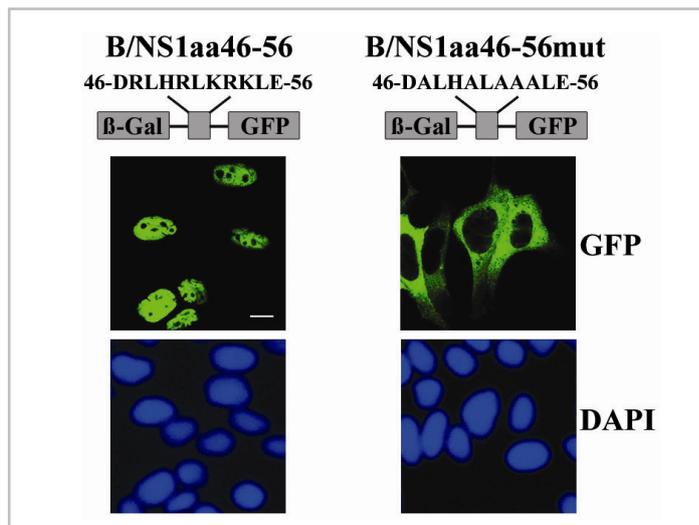


Abb. 3.8: Die elf Aminosäuren 46-56 des B/NS1 Proteins allein vermitteln den Kernimport eines Reporter-moleküls. Die kodierenden Sequenzen der elf B/NS1 Aminosäuren 46-56 wurden aus den Plasmiden pHW-B-Lee-NS und pHW-B-Lee_NS#2/3 amplifiziert und in den Vektor pHM829 zwischen die kodierenden Bereiche der β -Galaktosidase und des GFP inseriert. MDCK Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die GFP Signale wurden mittels CLSM, die DAPI Signale in der Fluoreszenz Mikroskopie analysiert. Maßstab = 10 μ m.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte erstmals eine Sequenz im B/NS1 Protein definiert werden, die dessen nukleare Lokalisation bewirkt. Im Folgenden wurde daher eine mögliche Interaktion des B/NS1 Proteins mit zellulären Importrezeptorproteinen untersucht.

3.2.4 Das B/NS1 Protein interagiert mit dem zellulären Importrezeptor Importin α

Nukleare Lokalisationssignale von vielen Kargoproteinen werden im Zytoplasma vom Importrezeptor Importin α erkannt und gebunden. Importin α bindet dann an den Importrezeptor Importin β , welcher die Wechselwirkung des trimeren Komplexes mit den Nukleoporinen und somit den Transport in den Zellkern vermittelt (Pemberton and Paschal, 2005).

In einem GST- Kopräzipitationsassay wurde zunächst die Bindung von B/NS1 an Importin α sowie der Einfluss der basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 auf eine mögliche Bindung getestet. Zur Generierung eines Importin α -GST Fusionsproteins wurde die kodierende Sequenz von Importin α 1 aus dem Vektor pRSET-hSRP1 α amplifiziert und über die Schnittstellen *Bam*HI und *Xba*I in den Vektor pGex5X.1 inseriert. Dieser Vektor kodiert aufwärts der „multiple cloning site“ (MCS) für die Glutathion-S-Transferase. Das GST-Importin α 1 Fusionsprotein wurde bakteriell exprimiert, an einer Glutathion-Sepharose-Matrix immobilisiert und anschließend in einem Bindungsansatz mit *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten B/NS1 WT-Protein und den Proteinmutanten #2, #3, #3/47, #2/3 und #7 inkubiert. Die gebildeten Komplexe wurden gereinigt, anschließend auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und kopräzipitierte B/NS1 Proteine mittels Autoradiographie detektiert.

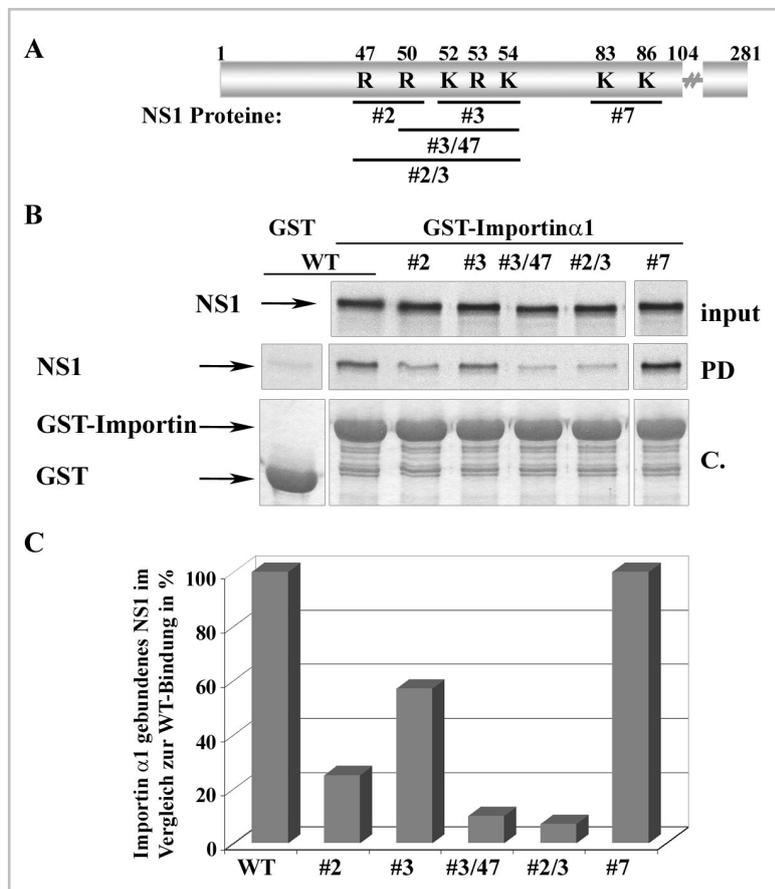


Abb. 3.9 Die basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 vermitteln eine Bindung des Proteins an Importin α 1. (A) GST und GST-Importin α 1 Fusionsprotein wurden bakteriell exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit den angegebenen, *in vitro* translatierten und [³⁵S]-markierten B/NS1 Proteinen in einem Bindungsansatz inkubiert. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden gereinigt und auf einer SDS-PAGE aufgetrennt (pull-down (PD)). Die aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie (C.) bzw. Autoradiographie detektiert (PD und input). Der Input entsprach 2,5 % der in die Reaktion eingesetzten *in vitro* translatierten Proteine. (B) Die radioaktiven Signale wurden mit einem Phosphoimager ausgewertet. Dabei erfolgte eine Normalisierung der Signale der kopräzipitierten B/NS1 Proteine mit den Signalen des inputs. Die Bindung des WT-Proteins an Importin α 1 entsprach 100 %. Die Bindungen der Proteinmutanten wurden auf das WT-Signal bezogen berechnet und sind dementsprechend ebenfalls in % angegeben.

Das B/NS1 Protein kopräzipitierte im GST-Bindungsassay mit GST-Importin α 1, jedoch nicht mit GST allein (Abb. 3.7). Der Austausch basischer Aminosäuren im NLS von B/NS1 gegen Alanin verminderte die Bindung an Importin α 1. Die Proteinmutanten B/NS1#2 (R47A/R50A) und B/NS1#3 (K52A/R53A/K54A) waren auf 25 % bzw. 57 % der GST-Importin α 1-Bindung im Vergleich zum WT-Protein reduziert. Für die B/NS1 Proteinmutanten #3/47 und #2/3 führte der Austausch von vier (R47A/K52A/R53A/K54A) bzw. fünf (R47A/R50A/K52A/R53A/K54A) basischen Aminosäuren mit 10 % bzw. 7 % Bindung im Vergleich zum WT-Protein zum fast vollständigen Bindungsverlust. Das als

Kontrolle fungierende B/NS1 Protein #7, mit Alaninaustauschen der basischen Aminosäuren K83/K86, kopräzipitierte im Vergleich zum WT-Protein uneingeschränkt mit GST-Importin $\alpha 1$.

Bis heute sind sechs verschiedene Importin α -Isoformen beschrieben, welche unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Signalsequenzen aufweisen und differentiell in verschiedenen Geweben exprimiert sind. So wurde z. B. für die Interferon-induzierten Proteine STAT1, STAT2, STAT3 und NF κ -B gezeigt, dass sie selektiv durch unterschiedliche Importin α Homologe in den Nukleus transportiert werden (Fagerlund *et al.*, 2008; Ma and Cao, 2006; Melen *et al.*, 2003). Interessanterweise wurde auch für das Nukleoprotein von Influenza A Virus gezeigt, dass es selektiv an Importin α -Isoformen bindet. Das nicht-klassische N-terminale NLS von NP interagiert mit den Importinen $\alpha 1$ und $\alpha 5$, weniger stark mit Importin $\alpha 3$ und gar nicht mit Importin $\alpha 7$ (Melen *et al.*, 2003).

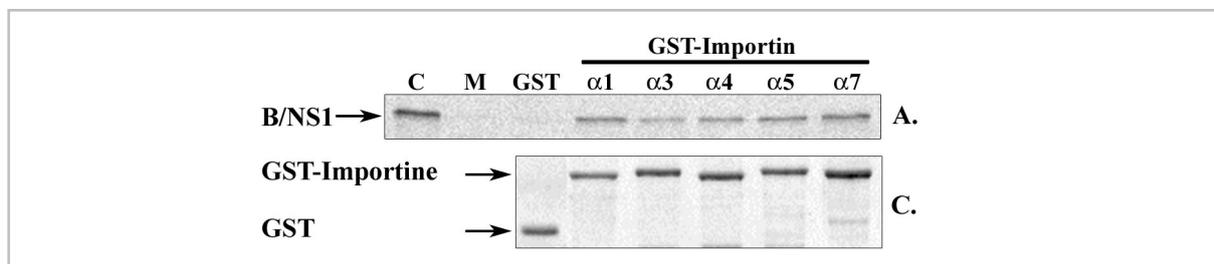


Abb. 3.10: Das B/NS1 Protein bindet an fünf verschiedene Importin α Isoformen (Abb. von Krister Melén). GST und die GST-Importin α Isoformen 1, 3, 4, 5 und 7 wurden durch rekombinantes Baculovirus in *Sf9* Zellen exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *in vitro* translatiertem und [35 S]-markiertem B/NS1 WT-Protein inkubiert. Gebundenes B/NS1 Protein wurde auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde fixiert, Coomassie (C.) gefärbt und getrocknet. Radioaktiv markierte Proteine wurden autoradiographisch detektiert (A.). Der Input (C) entspricht 10 % des in die Reaktion eingesetzten B/NS1 Proteins. In der Spur M wurde an reine Glutathion-Sepharose gebundenes B/NS1 Protein aufgetrennt.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Ilkka Julkunen wurde daher in einem GST-Koprazipitationsassay getestet, ob das NLS des B/NS1 Proteins mit einer Präferenz an die verschiedenen Importin α Isoformen $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, und $\alpha 7$ bindet. Dafür wurden GST und die GST-Importin $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ Fusionsproteine durch rekombinantes Baculovirus in *Sf9* Insektenzellen exprimiert, an Gutathion-Sepharose immobilisiert und aufgereinigt. *In vitro* translatiertes und radioaktiv markiertes B/NS1 Protein wurde mit den immobilisierten GST und GST-Importin α Fusionsproteinen in einem Reaktionsansatz inkubiert. Die gebundenen B/NS1 Proteine wurden anschließend auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. GST und GST-Importin α Fusionsproteine wurden mit Coomassie gefärbt. Das B/NS1 Protein koprazipitierte vergleichbar mit allen fünf getesteten Importin Isoformen $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ (Abb. 3.9).

3.2.5 Die basischen Aminosäuren in der B/NS1 Aminosäuresequenz 46-56 vermitteln die Bindung von β -Galaktosidase an Importin α

Nachdem Importin α als Interaktionspartner des B/NS1 Proteins identifiziert war, wurde im Folgenden untersucht, ob die Kernlokalisationssequenz des B/NS1 Proteins hinreichend ist, um die Bindung eines Reporter-moleküls an Importin $\alpha 1$ zu vermitteln. Dafür wurden die β -Galaktosidase-GFP Fusionsproteine mit integriertem SV40 T-ag NLS, B/NS1 NLS bzw. B/NS1 NLSmut durch *in vitro* Translation erzeugt (Abb. 3.6, 3.8). GST und GST-Importin $\alpha 3$ Fusionsprotein wurden in *E. coli* exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *in vitro* translatierten und [³⁵S]-Methionin markierten β -Galaktosidase-GFP Fusionsproteinen in einem Reaktionsansatz inkubiert. Als Kontrolle diente das Fusionsprotein allein. Gebundene Fusionsproteine wurden in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch detektiert.

Das klassische NLS von SV40 T-ag vermittelte die bereits beschriebene Bindung des Fusionsproteins an GST-Importin $\alpha 3$ (Abb. 3.11) (Melen *et al.*, 2003). Überraschend war, dass das NLS von B/NS1 eine vielfach stärkere Bindung des Fusionsproteins an GST-Importin $\alpha 3$ bewirkte. Ein Austausch der fünf basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 gegen Alanin verhinderte dagegen eine Bindung des entsprechenden Fusionsproteins an Importin $\alpha 3$ (Abb. 3.11).

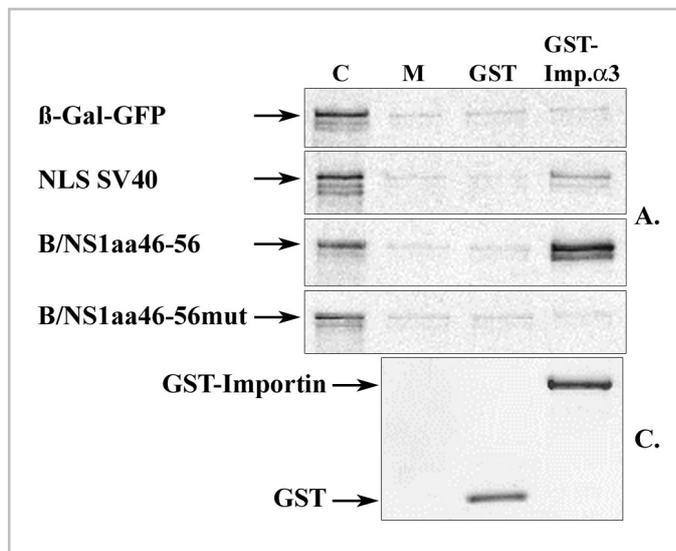


Abb. 3.11: Das NLS von B/NS1 vermittelt die Bindung von bakterieller β -Galaktosidase an Importin $\alpha 3$ (Abb. von Krister Melén). GST und GST-Importin $\alpha 3$ wurden in *E. coli* exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *in vitro* translatierten und [³⁵S] markierten β -Galaktosidase-GFP Fusionsproteinen entsprechend der Abbildung inkubiert. Die gebundenen Fusionsproteine wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde fixiert, Coomassie (C.) gefärbt und getrocknet. Radioaktiv markierte Proteine wurden autoradiographisch detektiert (A.). Der Input (C) entspricht 10 % der in die Reaktion eingesetzten β -Galaktosidase-GFP-Fusionsproteine. In der Spur M wurden an reine Glutathion-Sepharose gebundene Fusionsproteine aufgetrennt.

Durch die gezeigten Lokalisationsstudien und das GST-Kopräzipitationsassay war zu diesem Zeitpunkt ein noch nicht beschriebenes elf Aminosäuren langes NLS im B/NS1 Protein identifiziert, welches für die Interaktion mit Importin α sowie die Translokation des Proteins in den Zellkern sowohl notwendig als auch hinreichend war.

3.3 Identifizierung und Charakterisierung von B/NS1 Sequenzelementen, welche eine Speckle-Interaktion vermitteln

In einem nächsten Schritt sollte geklärt werden, welche Sequenzbereiche im B/NS1 Protein für eine Speckle-Interaktion notwendig sind. In diesem Zusammenhang stellten sich auch die Fragen, ob die nukleare Lokalisation des B/NS1 Proteins notwendig für eine morphologische Veränderung der Speckle-Domänen ist und inwieweit die basischen Aminosäuren im NLS einen Einfluss auf die B/NS1 Lokalisation in diesen Domänen haben.

3.3.1 Die basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 sind für eine Speckle-Interaktion essentiell

Zunächst wurde untersucht, ob die N-terminalen 104 Aminosäuren von B/NS1 im Kontext des β -Galaktosidase-GFP Fusionsproteins eine Kolo-kalisation mit SC35 vermitteln. Ferner wurde geprüft, wie sich die Mutation der basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 auf die Lokalisation des Proteins und gegebenenfalls auf eine morphologische Veränderung von nuklearen Speckle-Domänen auswirkt. Dafür wurden MDCK Zellen mit Expressionsplasmiden für β -Galaktosidase-GFP Fusionsproteine mit den N-terminalen Bereichen von B/NS1 WT und NLSmut transfiziert und gegen SC35 mit dem entsprechenden spezifischen primären und Alexa594-gekoppelten Maus-IgG-spezifischen sekundären Antikörper gefärbt (Abb. 3.12A).

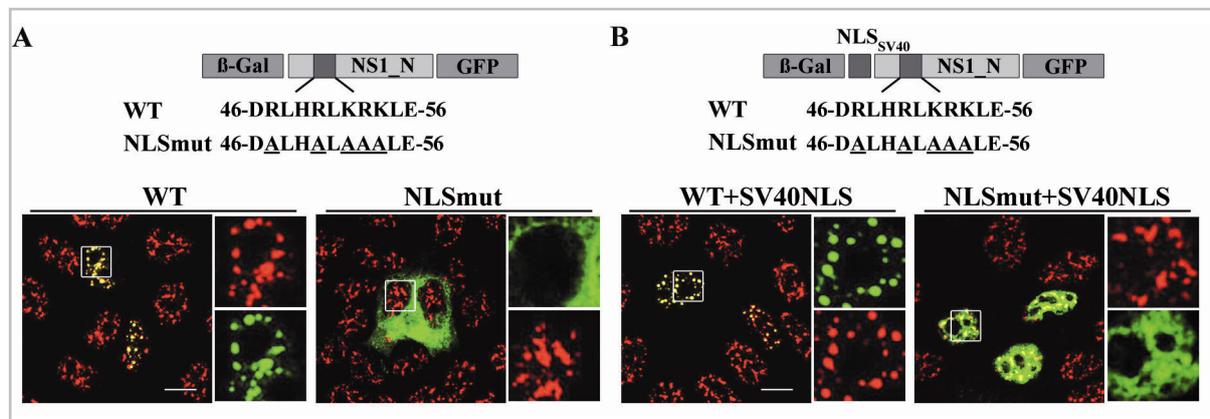


Abb. 3.12: Die basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 sind notwendig für eine Interaktion mit nuklearen Speckle-Domänen. Die kodierenden Sequenzen für den N-terminalen Bereich 1-104 des B/NS1 WT-Proteins bzw. der NLS-Mutante mit Alaninaustausch der fünf basischen Aminosäuren im NLS wurden aus dem Vektor pHW-B-Lee-NS bzw. pHW-B-Lee-NS#2/3 (NLSmut) amplifiziert. Um Expressionsplasmide für Fusionsproteine mit exogenem SV40 T-ag NLS zu generieren, wurden die B/NS1 Fragmente in den Vektor pHM839 zwischen die kodierenden Bereiche der β -Galaktosidase, des SV40 T-ag NLS und des GFP inseriert (pHM839-NS1_NWT; pHM839-NS1_NNLSmut). MDCK Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und SC35 mit einem primären monoklonalen Antikörper und einem sekundären Alexa 594-gekoppelten Maus-IgG-spezifischen Antikörper gefärbt. Die Zellen wurden mittels CLSM analysiert. Für jede Färbung ist eine Abbildung allein (Vergrößerungen - jeweils rechts) und eine entsprechende Überlagerung beider Signale dargestellt. Der Ausschnitt der Vergrößerung ist durch ein weißes Quadrat gekennzeichnet. Maßstab = 10 μ m.

Diese Analyse zeigte, dass die N-terminalen 104 Aminosäuren des WT B/NS1 Proteins sowohl eine Interaktion des Fusionsproteins mit nuklearen Speckle-Domänen als auch eine Abrundung dieser Domänen vermitteln (Abb. 3.12A, linkes Panel). Das NLSmut-Fusionsprotein hingegen war im

Zytoplasma lokalisiert und es kam zu keiner Kolo­kalisierung mit SC35 (Abb. 3.12A; rechtes Panel). Im Vergleich zum WT-Protein sah man keine morphologische Veränderung der Speckle-Domänen, denn diese erschienen wie in nicht behandelten Zellen irregulär geformt und vernetzt. Eine natürliche Voraussetzung der Speckle-Interaktion von B/NS1 ist die nukleare Lokalisation des Proteins. Um einen Einfluss der basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 allein auf die Speckle-Interaktion testen zu können, ohne auf deren Funktion im Kernimport angewiesen zu sein, musste daher eine Translokation des NLSmut Fusionsproteins in den Zellkern vermittelt werden. Hierfür wurden Fusionsproteine mit einem zweiten exogenen NLS des T-Antigens von SV40 generiert. Die kodierenden Bereiche der B/NS1 Aminosäuresequenz 1-104 wurden aus den Plasmiden pHW-B-Lee-NS und pHW-B-Lee-NS#2/3 (NLSmut) amplifiziert und in den Vektor pHM839 zwischen die kodierenden Bereiche für β -Galaktosidase, SV40 NLS und GFP inseriert. Die entsprechenden Fusionsproteine wurden in MDCK Zellen exprimiert und die Zellen gegen SC35 gefärbt. Das exogene SV40 NLS hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation des WT-Fusionsproteins. Dieses kolo­kalisierte mit SC35 in abgerundeten und aufgeblähten nuklearen Speckle-Domänen (Abb. 3.12B; linkes Panel). Wie erwartet vermittelte das exogene NLS eine nukleare Lokalisation des NLSmut-Fusionsproteins. Überraschend war jedoch, dass dieses nukleoplasmatisch diffus verteilt war und weder mit nuklearen Speckle-Domänen interagierte noch eine morphologische Veränderung dieser Domänen bewirkte (Abb. 3.12B; rechtes Panel). Dieses Ergebnis zeigt, dass die basischen Aminosäuren nicht nur für eine nukleare Lokalisation des B/NS1 Proteins, sondern auch für eine Interaktion mit nuklearen Speckle-Domänen notwendig sind.

3.3.2 Die B/NS1 Aminosäuren 1-90 sind für eine Interaktion mit nuklearen Speckle-Domänen essentiell

Die basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 waren zwar notwendig aber nicht hinreichend für eine Speckle-Interaktion oder eine morphologische Veränderung (Abb. 3.8 und 3.12). Daher sollten weitere, für die Speckle-Interaktion essentielle, Sequenzbereiche im B/NS1 Protein ermittelt werden. Dafür wurden die kodierenden Bereiche für N- und C-terminal verkürzte B/NS1 Proteine in den Vektor pHM829 inseriert. Die im Kontext des β -Galaktosidase-GFP-Fusionsproteins generierten verkürzten Varianten enthielten alle das identifizierte NLS von B/NS1 an den Positionen 47-56 (Abb. 3.13; rechtes Panel). Da die 12 N-terminalen Aminosäuren sowohl im NS1 als auch im NEP/NS2 Protein enthalten sind, für das NEP/NS2 Protein bisher aber keine Speckle-Assoziation beschrieben ist, wurden diese Aminosäuren in den B/NS1 Proteinen aa12-90 und aa12-104 deletiert. Die C-terminal verkürzten B/NS1 Varianten wurden entsprechend einer veröffentlichten Sekundärstruktur des Proteins gewählt (Yin *et al.*, 2007). Der N-terminale Teil des B/NS1 Proteins (aa1-103) bildet drei α -Helices, welche durch Loop-Strukturen verbunden sind. Die Helices werden von den B/NS1 Aminosäuren 15-35 (α 1), 45-64 (α 2) und 74-88 (α 3) gebildet. Dementsprechend wurden die verkürzten Proteine aa1-90 mit vollständiger Helix α 3, aa1-83 mit einem Teil der Helix α 3, aa1-73 ohne Helix α 3, aber mit Loop-Struktur und 1-65 ohne Loop-Struktur zwischen Helix α 2 und α 3, gewählt. Die entsprechenden Expressionsplasmide wurden in MDCK Zellen transfiziert und die Zellen 24 h nach der Transfektion gegen SC35 gefärbt.

Alle verkürzten B/NS1 Fusionsproteine waren wie erwartet im Kern der Zelle lokalisiert (Abb. 3.13). Dort kolokalisierte lediglich das NS1_1-90-Fusionsprotein mit SC35 und bewirkte ein Abrunden der Speckle-Domänen (Abb. 3.13; linkes Panel). Diese Veränderung war jedoch geringer im Vergleich zu einer Infektion mit WT-Virus oder nach Expression des B/NS1 Fragments 1-104 (Abb. 3.3; 3.12). Sowohl eine Deletion der 12 N-terminalen Aminosäuren, als auch der Aminosäuren 66-89 verhinderten eine Assoziation der entsprechenden Fusionsproteine mit Speckle-Domänen (Abb. 3.13; linkes Panel), welche im Vergleich zu nicht behandelten Zellen keine morphologische Veränderung zeigten.

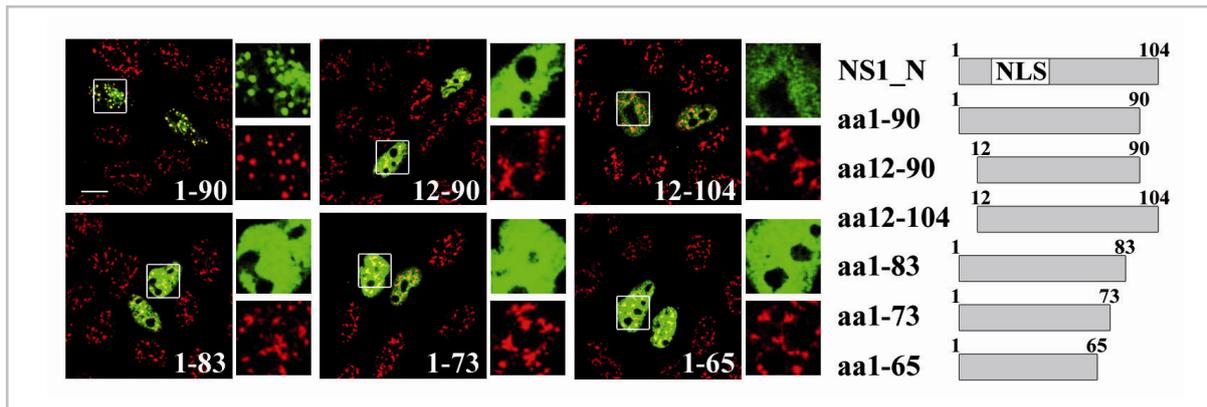


Abb. 3.13: Die N-terminalen Aminosäuren 1-90 des B/NS1 Proteins vermitteln eine Interaktion mit nuklearen Speckle-Domänen. Die Sequenzen für die verkürzten B/NS1 Fragmente 1-90, 12-90, 12-104, 1-83, 1-73 und 1-65 (schematische Darstellung, rechtes Panel) wurden aus dem Plasmid pHW-B-Lee-NS amplifiziert und in den Vektor pHM829 zwischen die kodierenden Sequenzen für die β -Galaktosidase und GFP inseriert. Die angegebenen Expressionsplasmide wurden in MDCK Zellen transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und SC35 mit einem primären monoklonalen Antikörper und einem sekundären Alexa 594-gekoppelten Maus-IgG-spezifischen Antikörper gefärbt. Die Zellen wurden mittels CLSM analysiert. Für jede Färbung ist eine Abbildung allein (Vergrößerungen - jeweils rechts) und eine entsprechende Überlagerung beider Signale dargestellt. Der Ausschnitt der Vergrößerung ist durch ein weißes Quadrat gekennzeichnet. Maßstab = 10 μ m.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist festzustellen, dass die B/NS1 Aminosäuren 1-90 die Sequenzbereiche umschließen, welche für die nukleare Lokalisation und Speckle-Interaktion sowohl notwendig als auch hinreichend sind. Im Folgenden sollte nun geklärt werden, welchen Einfluss diese beiden Eigenschaften des B/NS1 Proteins auf die Virusreplikation haben.

3.4 Analyse der Speckle-Assoziation von B/NS1 im Kontext rekombinanter Influenza B Viren und der Einfluss auf Virusreplikation

Nachdem die Signale für die B/NS1 Lokalisation in der frühen Phase der Infektion identifiziert waren, sollte der Einfluss der B/NS1 Lokalisation auf die Virusvermehrung untersucht werden. Hierfür wurden rekombinante Influenza B Viren generiert, deren NS1 Proteine nicht mehr in der Lage waren, im Kern zu lokalisieren und mit Speckle-Domänen zu interagieren. Diese Viren wurden hinsichtlich ihrer Replikationseigenschaften im Vergleich zum WT-Virus in verschiedenen Systemen getestet. Zur Verfügung standen zu Beginn die rekombinanten Influenza Viren B/Lee/NS#2 und #3, deren NS1 Proteine nur noch eingeschränkte Kernlokalisation zeigten (Abb. 3.5) (Dauber *et al.*, 2006).

3.4.1 Herstellung von rekombinanten Influenza B Virusmutanten mit 4-5 Alaninaustauschen der basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1

Gemäß der in 1.1.6 und 2.2.3 beschriebenen Methode wurden weitere rekombinante Influenza Viren *de novo* generiert, deren NS1 Proteine nicht mehr im Kern lokalisierten. Dafür wurden entweder die vier basischen Aminosäuren R47/K52/R53/K54 oder die fünf basischen Aminosäuren R47/R50/K52/R53/K54 im NLS von B/NS1 gegen Alanin ausgetauscht (Fig. 3.14A).

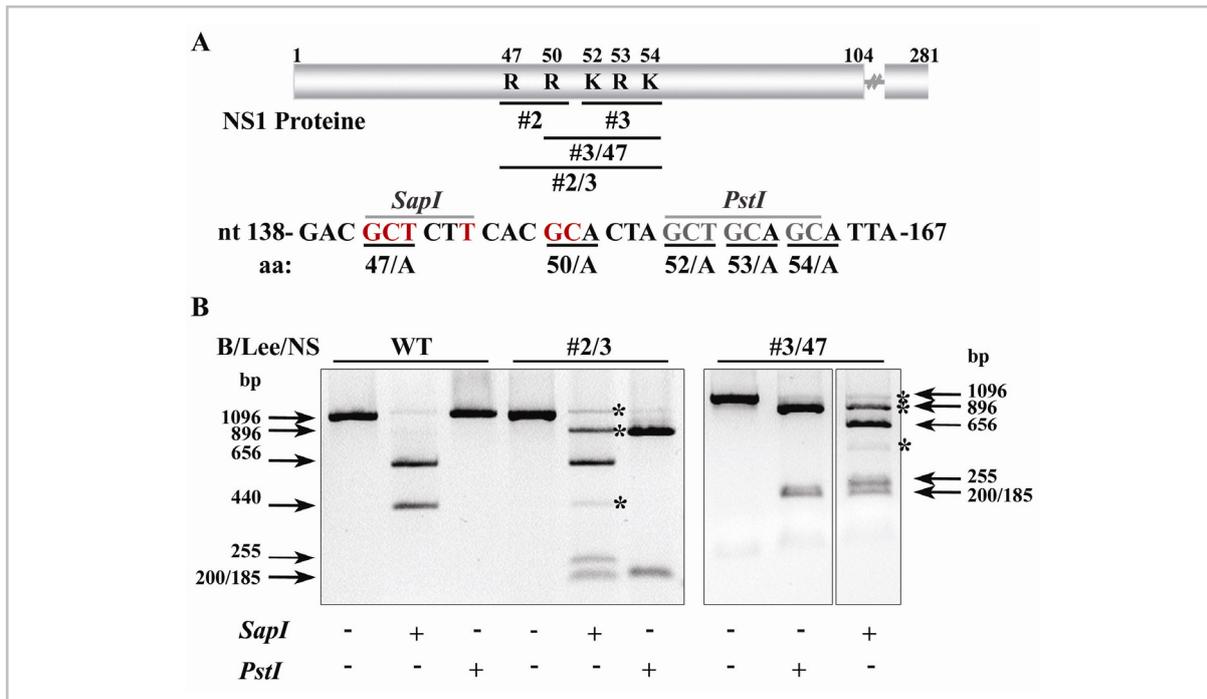


Abb. 3.14: Nachweis der Restriktionsmarker in den viralen NS-Segmenten der rekombinanten Influenza B Viren B/Lee/NS#3/47 und #2/3 (NLSmut). (A) Schematische Darstellung der in der B/NS1 Aminosäure- und Nukleotidsequenz ausgetauschten basischen Aminosäuren bzw. Nukleotide und der somit generierten B/NS1 Proteine #3/47 und #2/3 mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen in der Nukleotidsequenz. (B) Die Virusmutanten #3/47 und #2/3 enthielten im Vergleich zum WT-Virus zusätzlich die Restriktionsmarker-Schnittstellen *SapI* und *PstI* im NS-Segment. Die virale RNA wurde aus der Allantoisflüssigkeit von infizierten Hühnereiern isoliert und mit NS-Segment spezifischen Primer durch OneStep RT-PCR in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Die so erhaltenen NS-Fragmente von WT-Virus und den Mutanten wurden mit den Restriktionsenzymen *SapI* oder *PstI* verdaut. Die Nukleinsäurefragmente wurden in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die Fragmentgrößen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Unvollständig verdaute Fragmente sind mit * gekennzeichnet.

Die Herstellung der entsprechenden pHW2000 Plasmide ist in 2.2.4.14 beschrieben. Der Vektor pHW-Lee-NS#3 diente als Matrize für eine PCR mit reversen Mutagenese-Primern und einem T7 Vorwärtsprimer. Die Mutageneseprimer wiesen Nukleotidaustausche auf, welche eine Veränderung der Aminosäurekodierung von R47 zu A47 und R47/R50 zu A47/A50 zur Folge hatten (Fig3.14A). Anders als in der WT B/NS1 Nukleotidsequenz enthielten die mutierten Sequenzen die Restriktionsschnittstellen *SapI* und *PstI*. Die so erhaltenen Plasmide pHW-Lee-NS#3/47 und pHW-Lee-NS#2/3 (NLSmut) wurden jeweils zusammen mit den Plasmiden für die restlichen sieben viralen Segmente in 293T Zellen transfiziert und die Zellüberstände nach 72 h in den Allantoishöhlen sechs Tage alter Bruteier passagiert. Der Nachweis der erfolgreichen Herstellung rekombinanter Viren erfolgte durch Isolation der viralen RNA, anschließender Amplifikation der NS-Segmente durch RT-PCR und dem Kontrollverdau der PCR-

Fragmente mit den Restriktionsenzymen *SapI* und *PstI* (Abb. 3.14B). Eine Sequenzierung der RT-PCR Produkte bestätigte die Präsenz der Mutationen im Virusgenom.

Die neu generierten rekombinanten Influenza B Virusmutanten wurden anschließend hinsichtlich der Lokalisation ihrer NS1 Proteine im Verlauf einer Infektion und ihrer Replikationseigenschaften in aviären, kaninen und humanen Systemen getestet.

3.4.2 Lokalisationsanalyse der B/NS1-NLS Proteinmutanten im Kontext einer Virusreplikation

Um die Lokalisation der NS1 Proteine der generierten Virusmutanten zu untersuchen, wurden humane A549 Zellen mit den Influenza B Virusmutanten #3/47 und #2/3 (NLSmut) und zum Vergleich mit dem WT-Virus und den Virusmutanten #2 und #3 infiziert (Abb. 3.15A).

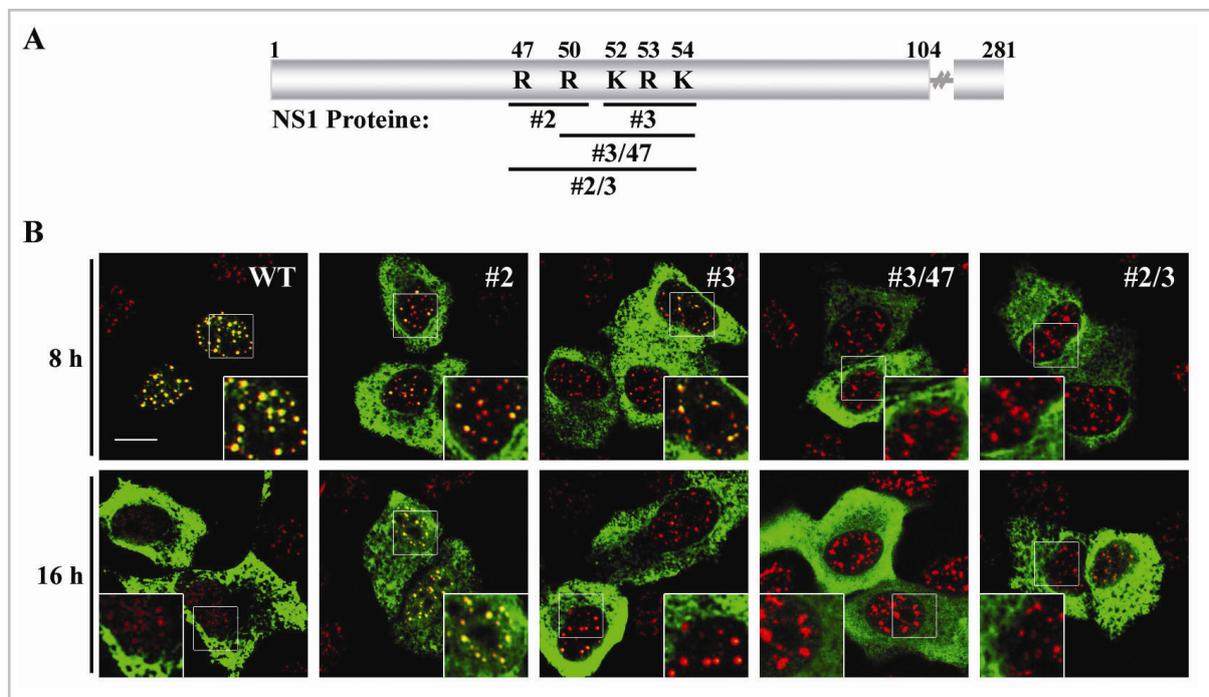


Abb. 3.15: Die NS1 Proteine der rekombinanten Influenza Viren B/Lee/NS#3/47 und #2/3 werden während einer Infektion nicht in den Kern transportiert. **(A)** Schematische Darstellung der basischen Aminosäureaustausche in der B/NS1 Sequenz und Kennzeichnung der entsprechenden Mutanten. **(B)** A549 Zellen wurden mit den rekombinanten Influenza B Viren B/Lee/NS#2, #3, #3/47 und #2/3 und WT-Virus mit einer MOI von 2 infiziert. 8 und 16 h p. i. wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die NS1 Proteine und SC35 mit B/NS1-spezifischem Kaninchen-Antiserum und monoklonalem SC35-Antikörper und sekundären anti-Kaninchen IgG-Alexa 488 und anti-Maus-IgG-Alexa 594 Antikörpern detektiert. Die gefärbten Zellen wurden mittels CLSM analysiert. Die Bilder zeigen die Überlagerung der Signale für B/NS1 und SC35. Maßstab = 10 µm. Die Ausschnitte der Vergrößerungen sind durch ein weißes Quadrat im Bild gekennzeichnet.

8 bzw. 16 h nach der Infektion wurden die Zellen gegen die NS1 Proteine und SC35 mit entsprechenden primären und sekundären Antikörpern gefärbt. Das NS1 Protein des WT-Virus war 8 h nach der Infektion im Kern lokalisiert, wo es in nuklearen Speckle-Domänen mit SC35 kolokalisierte (Abb. 3.15B). 16 h nach der Infektion war das WT-Protein im Zytoplasma lokalisiert und die Speckle-Domänen erschienen aufgelöst. Die NS1 Proteine der Virusmutanten #2 und #3 waren in der frühen

Infektionsphase nur sehr eingeschränkt im Kern lokalisiert und man sah eine starke zytoplasmatische NS1 Färbung (Abb. 3.15B). Jedoch war das schwache nukleare NS1 Signal mit Speckle-Domänen assoziiert und die Domänen erschienen gegenüber nicht infizierten Zellen morphologisch verändert (Abb. 3.15B; Abb. 3.3). In der späten Phase der Infektion war das NS1 Protein der Virusmutante #3 im Zytoplasma verteilt. Das NS1 Protein der Virusmutante #2 hingegen war sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert. Dies könnte die Folge einer eingeschränkten Replikationsfähigkeit sein, welche eine verzögerte Proteinexpression sowie einen entsprechend späteren Proteinexport mit sich bringt. Es könnte aber auch ein Hinweis auf einen nuklearen Exportdefekt der NS1 Proteinmutante #2 sein. Die NS1 Proteine der Virusmutanten #3/47 und #2/3 (NLSmut) waren in der frühen und späten Infektionsphase ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 3.15B). Dies bestätigte, dass die basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 auch im Verlauf einer Virusinfektion die nukleare Lokalisation des Proteins vermitteln, denn ein Austausch von mindestens vier der fünf Aminosäuren eliminierte den Kernimport. Ferner sah man nach Infektion mit den letztgenannten Viren keine morphologische Veränderung der SC35-Domänen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen, die offensichtlich eine entsprechende Akkumulation des NS1 Proteins erfordert (Abb. 3.15B; Abb. 3.3).

3.4.3 Replikationsanalysen der rekombinanten Influenza B Virusmutanten in aviären, kaninen und humanen IFN-kompetenten und -defizienten Systemen

Nach Lokalisationsanalyse der NS1 Proteine der Influenza B Virusmutanten sollte der Einfluss des Verlustes der nuklearen Lokalisation und der Speckle-Interaktion entsprechender NS1 Proteine auf die Virusreplikation untersucht werden. Dafür wurde die Replikationsfähigkeit der Viren zunächst in IFN-kompetenten elf Tage alten Bruteiern und auf kaninen MDCK Zellen untersucht. In beiden Systemen replizierte das Influenza B WT-Virus zu hohen Titern ($5,5 \times 10^8$ FFU/ml und 3×10^7 FFU/ml) (Abb. 3.16). Die Virusmutanten B/Lee/NS#2, #3/47 und #2/3 waren hingegen mit Titern zwischen 1×10^3 und 1×10^4 FFU/ml in ihrer Replikation im Brutei stark vermindert (Abb. 3.16A). Auf MDCK Zellen lagen die Endtiter dieser Virusmutanten unter der Nachweisgrenze von 83 FFU/ml (Abb. 3.16B). Die Virusmutante B/Lee/NS#3 war mit Titern von 4×10^7 FFU/ml im Brutei bzw. 6×10^6 FFU/ml auf MDCK Zellen um eine halbe bis 1 log-Stufe im Wachstum gegenüber dem WT-Virus eingeschränkt (Abb. 3.16).

Die stark verminderte Replikationsfähigkeit der Virusmutanten wies auf einen Einfluss der nuklearen Lokalisation und Speckle-Interaktion des NS1 Proteins auf die Virusreplikation hin. In einer vorherigen Arbeit wurde jedoch für die Proteinmutante NS1#2 gezeigt, dass diese, anders als das WT-Protein und die Mutante #3, nicht mehr in der Lage ist, die Aktivierung der zellulären Proteinkinase R (PKR) zu inhibieren (Dauber *et al.*, 2006). Da die Mutationen der Proteine NS1#3/47 und #2/3 mit denen von B/NS1#2 überlagern, war davon auszugehen, dass diese ebenfalls die Fähigkeit zur PKR Inhibition verloren hatten.

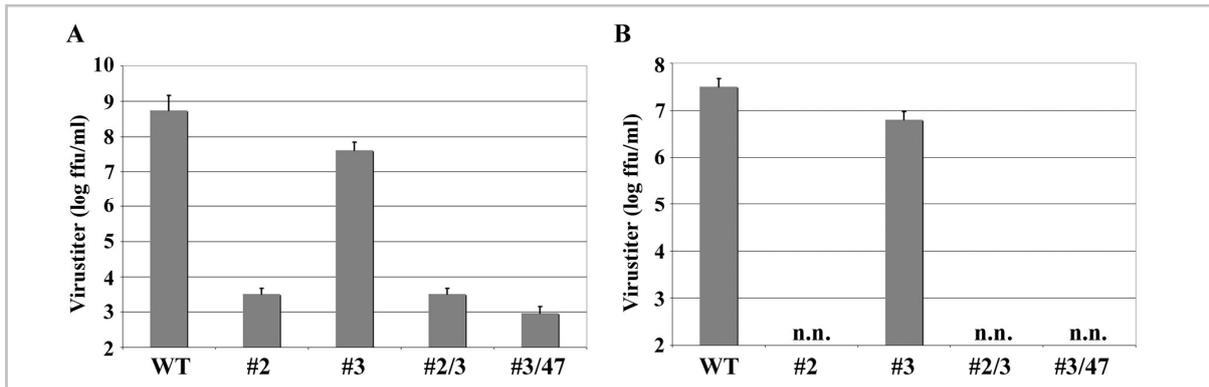


Abb. 3.16: Influenza B Virusmutanten mit defekter B/NS1 Lokalisation und Speckle-Interaktion sind in elf Tage alten Bruteiern und auf MDCK Zellen in ihrer Replikation eingeschränkt. (A) 1000 FFU von B/Lee WT-Virus und den Virusmutanten B/Lee/NS#2, #3, #3/47 und #2/3 wurden in die Allantoishöhlen von elf Tage alten Bruteiern injiziert und drei Tage bei 33°C inkubiert. Anschließend wurde die Allantoisflüssigkeit isoliert und die Virustiter ermittelt. Die Werte geben das Mittel jeweils fünf unabhängig beimpfter Hühnereier an. **(B)** 1×10^6 MDCK Zellen wurden mit B/Lee WT-Virus und den Virusmutanten B/Lee/NS#2, #3, #3/47 und #2/3 mit einer MOI von 0,001 infiziert und bei 33°C inkubiert. Drei Tage nach der Infektion wurden die Überstände der MDCK Zellen abgenommen und der Virusgehalt ermittelt. Die Werte sind Mittel von zwei jeweils unabhängigen Versuchen. Die Virustiter wurden durch Infektion von MDCK Zellen und Fluoreszenz-Färbung des viralen NP bestimmt und sind daher in FFU/ml angegeben. Virustiter, die unter der Nachweisgrenze von 83 FFU/ml lagen, sind mit n.n. (nicht nachweisbar) gekennzeichnet.

Die Aktivierung der PKR führt zur Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α und somit zur Inhibition der Translation. Dies schränkt die Replikationsfähigkeit der Virusmutanten stark ein, da auch virale Proteine nicht mehr synthetisiert werden. Da die PKR durch Typ I IFN induziert wird, wurden die Replikationsstudien für die Influenza B Virusmutanten in sechs Tage alte Bruteier wiederholt, da diese noch kein gereiftes Typ I IFN-System besitzen.

Die Virusmutanten B/Lee/NS#2, #3/47 und #2/3 replizierten in sechs Tage alten Bruteiern zu deutlich höheren Titern als in elf Tage alten Bruteiern, dennoch war ihre Replikation um das 10- bis 50-fache gegenüber dem WT-Virus vermindert (Abb. 3.17A). Die Virusmutante B/Lee/NS#3 war um die Hälfte im Wachstum gegenüber dem WT-Virus eingeschränkt (Abb. 3.17 A).

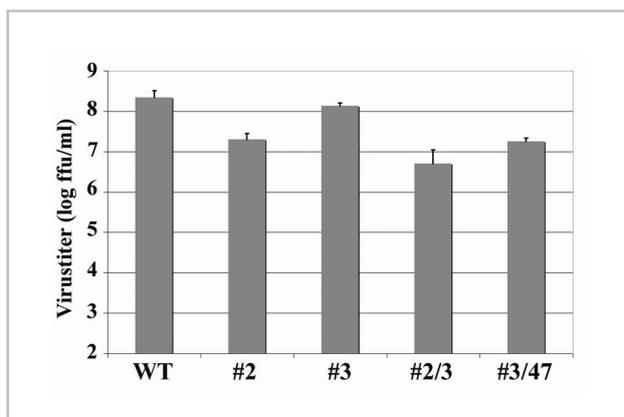


Abb. 3.17: Influenza B Virusmutanten mit defekter B/NS1 Lokalisation und Speckle-Interaktion sind in sechs Tage alten Bruteiern in ihrer Replikation eingeschränkt. 1000 FFU von B/Lee WT-Virus und den Virusmutanten B/Lee/NS#2, #3, #3/47 und #2/3 wurden in die Allantoishöhlen von sechs Tage alten Bruteiern injiziert und drei Tage bei 33°C inkubiert. Anschließend wurde die Allantoisflüssigkeit isoliert und die Virustiter ermittelt. Die Werte geben das Mittel jeweils fünf unabhängig beimpfter Hühnereier an. Die Virustiter wurden durch Infektion von MDCK Zellen und Fluoreszenz-Färbung des viralen NP bestimmt und sind daher in FFU/ml angegeben.

Sowohl die nukleare Lokalisation als auch die Speckle-Interaktion des B/NS1 Proteins sind wichtig für eine volle Virusreplikation, da Virusmutanten mit entsprechenden Defekten im NS1 Protein unabhängig vom IFN-System in ihrer Replikation eingeschränkt waren.

3.5 Einfluss der basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 auf Dimerisierung und ISG15-Bindung

Es ist beschrieben, dass die NS1 Proteine von Influenza A und B Viren die Fähigkeit haben, Dimere zu bilden (Wang and Krug, 1996). Ferner bindet das B/NS1 Protein an das Interferon stimulierte Genprodukt ISG15 (Yuan and Krug, 2001). Um zu überprüfen, ob die Proteinmutanten B/NS1#3/47 und B/NS1#2/3 funktionell sind und Defekte in der Lokalisation oder Speckle-Interaktion nicht auf einen generellen Funktionsverlust der Proteine aufgrund von Fehlfaltungen zurückzuführen sind, wurden die Fähigkeiten beider Proteine zur Dimerisierung und ISG15-Bindung untersucht.

3.5.1 Alaninaustausche von 2-5 basischen Aminosäuren in der B/NS1 Sequenz 47-54 vermindern die Bildung von B/NS1-Dimeren

Die Fähigkeit des B/NS1 WT-Proteins und der Proteinmutanten B/NS1#2, #3, #3/47 und #2/3 zur Dimerisierung wurde in einem GST-B/NS1-Kopräzipitationsassay analysiert. Dafür wurden das Fusionsprotein GST-B/NS1 WT und GST bakteriell exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *in vitro* translatierten und [35S]-Methionin markierten B/NS1 WT und den Proteinmutanten B/NS1#2, #3, #3/47 und #2/3 in einem Reaktionsansatz inkubiert. Gebundene B/NS1 Proteine wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Mit einem Phosphoimager wurden die radioaktiven Signale quantifiziert (Abb. 3.19).

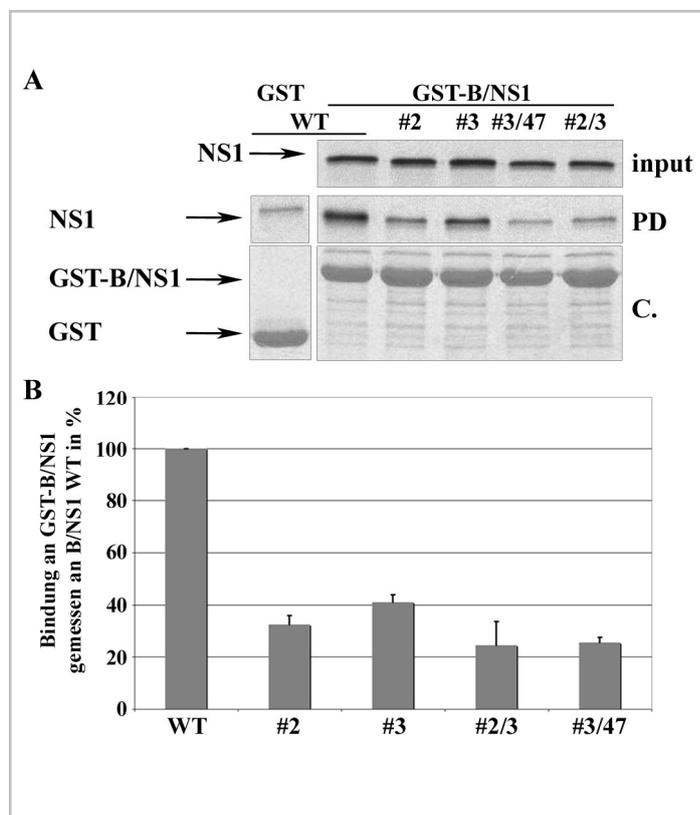


Abb. 3.19: Die basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 sind an der Dimerbildung des Proteins beteiligt. (A) GST und GST-B/NS1 Fusionsprotein wurden bakteriell exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit den angegebenen, *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten B/NS1 Proteinen in einem Bindungsansatz inkubiert. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden gereinigt und auf einer SDS-PAGE aufgetrennt (PD). Die aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie (C.) bzw. Autoradiographie detektiert (PD und input). Der Input entsprach 2,5 % der in die Reaktion eingesetzten *in vitro* translatierten Proteine. **(B)** Die radioaktiven Signale wurden mit einem Phosphoimager ausgewertet. Dabei erfolgte eine Normalisierung der Signale der kopräzipitierten B/NS1 Proteine mit den Signalen des Inputs. Die Bindung des WT-Proteins an GST-B/NS1 entsprach 100 %. Die Bindungen der Proteinmutanten wurden auf das WT-Signal bezogen berechnet und sind dementsprechend ebenfalls in % angegeben. Die Werte ergeben sich aus dem Mittel von mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Das NS1 WT-Protein kopräzipitierte mit GST-B/NS1 und war somit in der Lage, Homodimere zu bilden. Tauschte man die basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 gegen Alanin aus, verminderte sich die Fähigkeit dieser Proteine zur Dimerbildung (Abb. 3.19A). So waren die B/NS1 Proteinmutanten #2

(R47A/R50A) und #3 (K52A/R53A/K54A) um 30 % bzw. 60 % in der Fähigkeit zur Dimerbildung gegenüber dem WT-Protein vermindert (Abb. 3.19B). Die Proteine B/NS1#3/47 (R47A/K52A/R53A/K54A) und #2/3 (R47A/R50A/K52A/R53A/K54A) zeigten noch 25 % der Bindung vom WT-Protein (Abb. 3.19B). Somit leisten die basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 auch einen Beitrag zur Dimerisierung des Proteins.

3.5.2 Alaninaustausche von 2-5 basischen Aminosäuren in der B/NS1 Sequenz 47-54 haben keinen Einfluss auf die ISG15-Bindung

Einer der wenigen bekannten zellulären Interaktionspartner des B/NS1 Proteins ist ISG15 (Yuan and Krug, 2001). In vorhergehenden Analysen wurde bereits gezeigt, dass Alaninaustausche der basischen Aminosäuren R47/R50 und K52/R53/K54 in den Proteinmutanten B/NS1#2 und #3 keinen Einfluss auf die Bindung von ISG15 in GST-ISG15-Kopräzipitationsassays hatten. Dies sollte auch für die Proteinmutanten B/NS1#3/47 und #2/3 getestet werden. Dafür wurden GST und GST-ISG15 Fusionsprotein bakteriell exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und in einem Bindungsansatz mit *in vitro* translatierten und [³⁵S]-Methionin markierten B/NS1 WT und den B/NS1 Proteinmutanten #2, #3, #3/47 und #2/3 inkubiert. Gebundene B/NS1 Proteine wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Mit einem Phosphoimager wurden die radioaktiven Signale quantifiziert (Abb. 3.20).

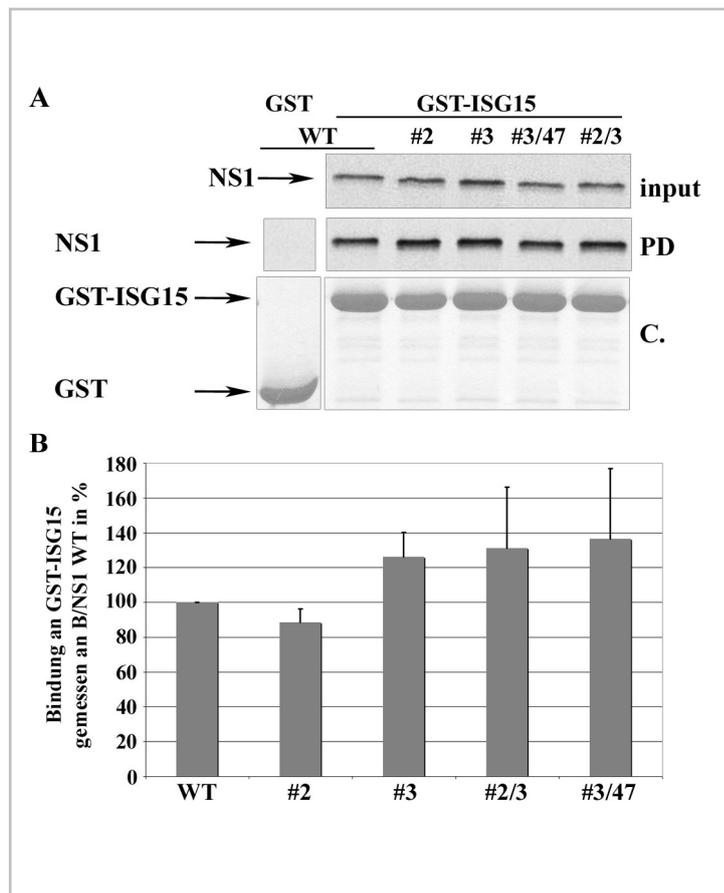


Abb. 3.20: Die basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 haben keinen Einfluss auf die ISG15-Bindung. (A) GST und GST-ISG15 Fusionsprotein wurden bakteriell exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit den angegebenen, *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten B/NS1 Proteinen in einem Bindungsansatz inkubiert. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden gereinigt und auf einer SDS-PAGE aufgetrennt (PD). Die aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie (C.) bzw. Autoradiographie detektiert (PD und input). Der Input entsprach 2,5 % der in die Reaktion eingesetzten *in vitro* translatierten Proteine. (B) Die radioaktiven Signale wurden mit einem Phosphoimager ausgewertet. Dabei erfolgte eine Normalisierung der Signale der kopräzipitierten B/NS1 Proteine mit den Signalen des Inputs. Die Bindung des WT-Proteins an GST-ISG15 entsprach 100 %. Die Bindungen der Proteinmutanten wurden auf das WT-Signal bezogen berechnet und sind dementsprechend ebenfalls in % angegeben. Die Werte ergeben sich aus dem Mittel von mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die Proteinmutanten B/NS1#2 und #3 zeigten eine mit dem WT-Protein vergleichbare Bindung an GST-ISG15 (Abb. 3.20B). Austausch von 4-5 basischen Aminosäuren im NLS der Proteinmutanten B/NS1#3/47 und 2/3 hatten keinen negativen Einfluss auf die GST-ISG15 Bindung. Diese Proteine zeigten mit 130 % eine etwas stärkere, mit dem B/NS1#3 Protein vergleichbare Bindung, als das WT-Protein an GST-ISG15 (Abb. 3.20B). Die Ergebnisse zeigten, dass die beiden Proteinmutanten B/NS1#3/47 und B/NS1#2/3 funktionell sind und daher die vorher beschriebene verminderte Virusreplikation nicht auf ein fehlerhaft gefaltetes NS1 Protein zurückzuführen ist.

3.6 Der Export des B/NS1 Proteins aus dem Zellkern in das Zytoplasma erfolgt unabhängig vom zellulären Exportrezeptor Crm1

Nachdem ein autonomes NLS im B/NS1 Protein sowie der zelluläre Import-vermittelnde Importrezeptor analysiert und charakterisiert waren, sollte nun der Export des B/NS1 Proteins aus dem Zellkern in das Zytoplasma im Infektionsverlauf untersucht werden. Ein Exportrezeptor zellulärer Proteine ist Crm1, der im Zellkern an Leucin-reiche nukleare Exportsignalsequenzen (NES) in den Kargoproteinen bindet und deren Export durch die Kernporen ins Zytoplasma vermittelt. Der Crm1-abhängige Export von Proteinen kann durch den Zusatz des Zytotoxins Leptomycin B (LMB) inhibiert werden (Pemberton and Paschal, 2005; Fornerod *et al.*, 1997).

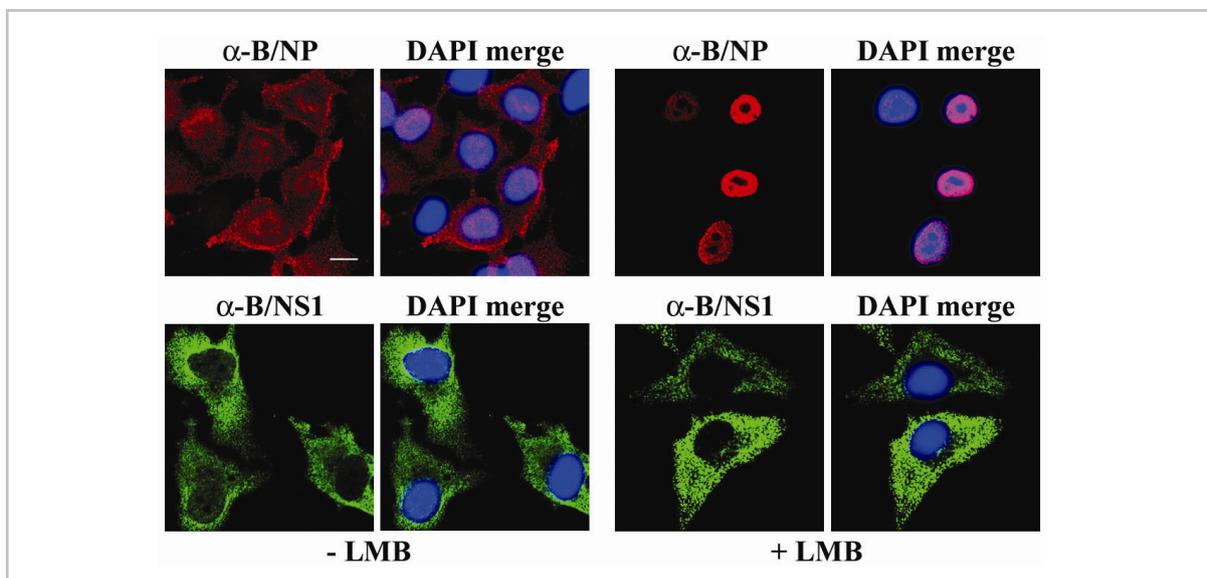


Abb. 3.18: Der Export des NS1 Proteins während einer Influenza B Infektion erfolgt unabhängig von Crm1. A549 Zellen wurden mit B/Lee WT-Virus mit einer MOI von 1 infiziert. 3,5 h p. i. wurden die Zellen nicht oder mit 10 ng/ml LMB behandelt. 20 h p. i. wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und gefärbt gegen NP und NS1 mit spezifischem primären monoklonalen NP Antikörper und NS1 Antiserum und den sekundären Alexa-594 und Alexa-488 gekoppelten IgG-Maus- und IgG-Kaninchen-spezifischen Antikörpern. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Zellen wurden mittels CLSM analysiert und DAPI wurde mit Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Für jede Färbung ist eine Abbildung allein und mit der entsprechenden DAPI-Färbung überlagert (merge) dargestellt. Maßstab = 10 μ m.

Für das virale Nukleoprotein (NP) von Influenza A Virus wurde bereits gezeigt, dass es *in vitro* an Crm1 bindet und der Export Crm1-abhängig erfolgt (Elton *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2001). Auch ist bekannt,

dass der Export viraler Ribonukleoproteinkomplexe Crm1-abhängig durch ein NES im viralen NEP/NS2 Protein erfolgt (Neumann *et al.*, 2000). Für das NS1 Protein von Influenza A Virus ist ein NES in der Aminosäuresequenz 138-147 beschrieben (Li *et al.*, 1998). Jedoch ist nicht geklärt, ob der Export von A/NS1 tatsächlich Crm1-abhängig erfolgt, da der Einfluss einer Inhibition des Crm1 Exportweges durch z. B. LMB auf den Export von A/NS1 nicht geprüft wurde.

Um den Export des NS1 Proteins in der späten Phase einer Influenza B Virusinfektion zu charakterisieren, wurden MDCK Zellen mit B/Lee Virus infiziert. 3,5 Stunden nach der Infektion wurden Zellen nicht oder mit LMB für den restlichen Verlauf der Infektion behandelt. 20 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen gegen das NP und NS1 Protein mit spezifischem primären monoklonalen NP Antikörper und NS1 Kaninchen-Antiserum und den sekundären Alexa-594 und Alexa-488 gekoppelten IgG-Maus- und IgG-Kaninchen-spezifischen Antikörpern gefärbt und für die CLSM vorbereitet. In nicht behandelten Zellen waren das B/NS1 Protein und B/NP im Zytoplasma und B/NP zu geringen Mengen auch im Zellkern lokalisiert (Abb. 3.18; linkes Panel). In LMB-behandelten Zellen sah man B/NP hingegen ausschließlich im Kern lokalisiert. Der Export des Proteins war vollständig inhibiert (Abb. 3.18; linkes Panel; oben). Dies bestätigte vorherige Befunde für das A/NP (Elton *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2001). Im Gegensatz zum B/NP war das B/NS1 Protein auch nach LMB-Behandlung unverändert im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 3.18; linkes Panel; unten). Es war kein Unterschied in der Proteinlokalisierung zu nicht behandelten Zellen zu erkennen. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Export des B/NS1 Proteins unabhängig von Crm1 erfolgt.

3.7 Spiegelt die Interaktion von B/NS1 mit nuklearen Speckle-Domänen eine Funktion des Proteins im mRNA Transport wider?

Nachdem geklärt war, welche Sequenzbereiche im B/NS1 Protein die nukleare Lokalisation und Speckle-Interaktion vermitteln und welchen Einfluss diese Eigenschaften auf die Virusreplikation haben, stellte sich die Frage, welche funktionelle Bedeutung die Assoziation des B/NS1 Proteins mit nuklearen Speckle-Domänen hat und auf welche Eigenschaft des B/NS1 Proteins diese Interaktion zurückzuführen ist. Aus der ursprünglichen Beobachtung der Koloakalisation des B/NS1 Proteins mit Faktoren des RNA Exports, wie dem UAP56 und Aly/Ref Protein, in Speckle-Domänen (Abb. 3.4), entstand die Arbeitshypothese, dass das B/NS1 Protein mit RNA Exportproteinen interagiert, diese zu viraler mRNA rekrutiert und somit deren Export unterstützt. Das UAP56 Protein koppelt den Vorgang des Spleißens mit dem Export zellulärer mRNA, da es mit Proteinen interagiert, die in beide Vorgänge involviert sind (Kohler and Hurt, 2007). Ein weiterer potentieller Interaktionspartner war der zelluläre mRNA Exportfaktor Tap, der mit RNA-bindenden Adaptoren, wie Aly/Ref interagiert. Tap kann auch direkt an RNA-Moleküle binden und durch Interaktion mit Nukleoporinen den Export der mRNA durch die Kernporen vermitteln (Kohler and Hurt, 2007). Um eine Rekrutierungsfunktion an virale mRNA zu erfüllen, müsste das B/NS1 Protein nicht nur mit RNA Exportfaktoren interagieren, sondern auch an virale mRNA *in vivo* binden können. Diese putative Eigenschaft wurde in einem RNA-Immunoprecipitationsassay untersucht.

3.7.1 B/NS1 bindet an die zelluläre RNA-Helikase UAP56 im GST-Kopräzipitationsassay

Zunächst wurde eine mögliche Bindung von B/NS1 an UAP56 in einem GST-Kopräzipitationsassay untersucht. Dafür wurde ein Expressionsplasmid für GST-UAP56 generiert, indem die kodierende Sequenz für UAP56 aus dem Plasmid pEGFP-UAP56 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in den Vektor pGex5X.1 inseriert wurde. GST und GST-UAP56 Fusionsprotein wurden bakteriell exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *in vitro* translatierten und [³⁵S]-Methionin markierten B/NS1 WT-Protein und den Proteinmutanten B/NS1#1, #2, #3, #3/47, #2/3, #4 und #6 in einem Bindungsansatz inkubiert. Die gewählten B/NS1 Proteinmutanten besaßen die bereits beschriebenen 2-5 Alaninaustausche basischer Aminosäuren im N-terminalen Bereich. Die gebundenen B/NS1 Proteine wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend autoradiographisch detektiert. Quantifiziert wurden die Signale mittels Phosphoimager.

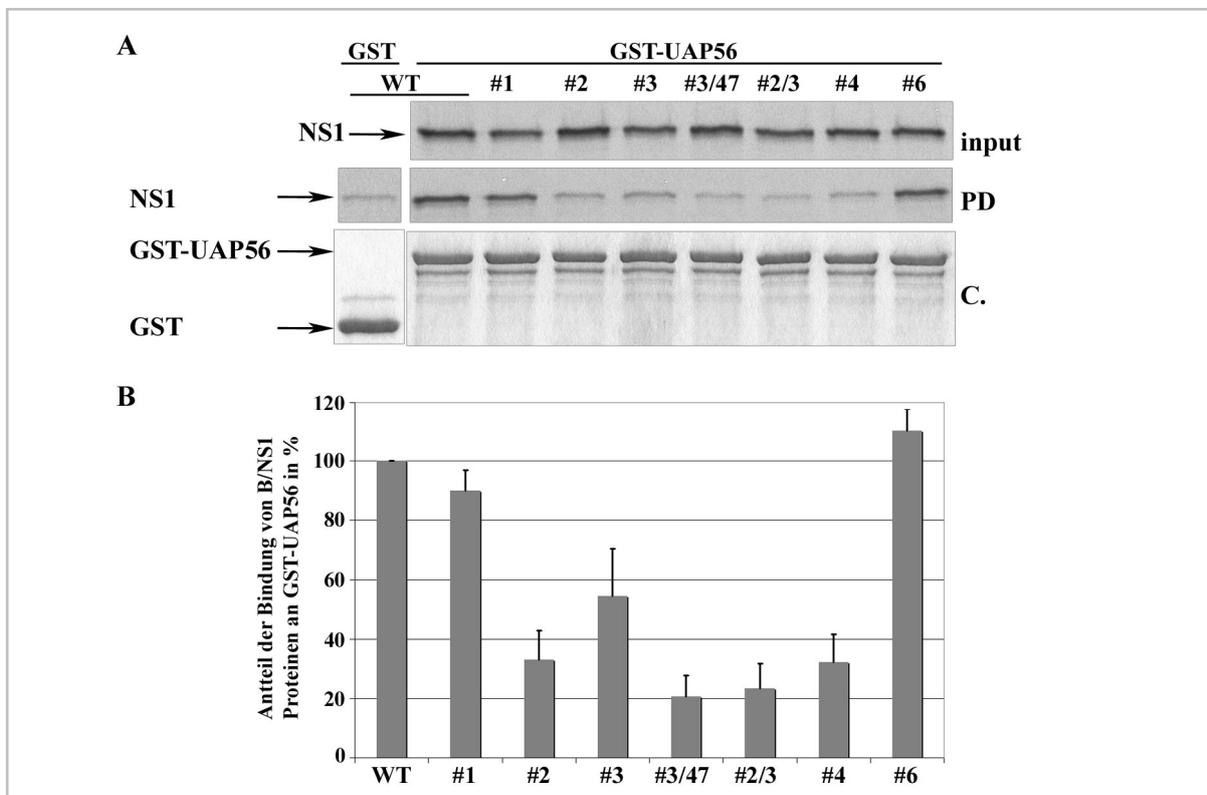


Abb. 3.21: Das B/NS1 Protein bindet an die RNA-Helikase UAP56. (A) Die kodierende Sequenz für UAP56 wurde aus dem Plasmid pEGFP-UAP56 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in den Vektor pGEX5X.1 inseriert. GST und GST-UAP56 Fusionsprotein wurden bakteriell exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit den angegebenen, *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten B/NS1 Proteinen in einem Bindungsansatz inkubiert. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden gereinigt und auf einer SDS-PAGE aufgetrennt (PD). Die aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie (C.) bzw. Autoradiographie detektiert (PD und input). Der Input entsprach 3,3 % der in die Reaktion eingesetzten *in vitro* translatierten Proteine. **(B)** Die radioaktiven Signale wurden mit einem Phosphoimager ausgewertet. Dabei erfolgte eine Normalisierung der Signale der kopräzipitierten B/NS1 Proteine mit den Signalen des Inputs. Die Bindung des WT-Proteins an GST-UAP56 entsprach 100 %. Die Bindungen der Proteinmutanten wurden auf das WT-Signal bezogen berechnet und sind dementsprechend ebenfalls in % angegeben. Die Werte ergeben sich aus dem Mittel von drei unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Das B/NS1 WT-Protein sowie die Proteinmutanten #1 und #6 kopräzipitierten mit GST-UAP56 mit ähnlicher Effizienz (Abb. 3.21A). Mutationen der basischen Aminosäuren in der Sequenz 47-64 führten

zu einer deutlichen Reduktion der GST-UAP56-Bindung der entsprechenden B/NS1 Proteinmutanten (Abb. 3.21A). Die Bindung von B/NS1#3 war im Vergleich zum WT-Protein um 50 % reduziert (Abb. 3.21B). Austausch der Aminosäuren R47A/R50A (B/NS1#2) oder K58A/R60A/K64A (B/NS1#4) bewirkten eine Abnahme der GST-UAP56-Bindung auf 30 % (Abb. 3.21B). Am stärksten reduziert war die GST-UAP56-Bindungsfähigkeit der B/NS1 Proteine #3/47 und #2/3 mit 4-5 Alaninaustauschen im NLS (Abb. 3.21B). Diese waren in ihrer Bindung im Vergleich zum WT-Protein auf 20 % reduziert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Kollokalisierung von B/NS1 mit EGFP-UAP56 auf einer Interaktion beider Proteine beruht und diese wahrscheinlich in der Umgebung nuklearer Speckle-Domänen stattfindet. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass B/NS1 Proteinmutante #2/3, welche in ihrer UAP56-Bindung am stärksten eingeschränkt war, nicht mehr mit nuklearen Speckle-Domänen assoziierte (Abb. 3.12B).

3.7.2 B/NS1 bindet an den zellulären mRNA Exportfaktor Tap/NXF1 im GST-Kopräzipitationsassay

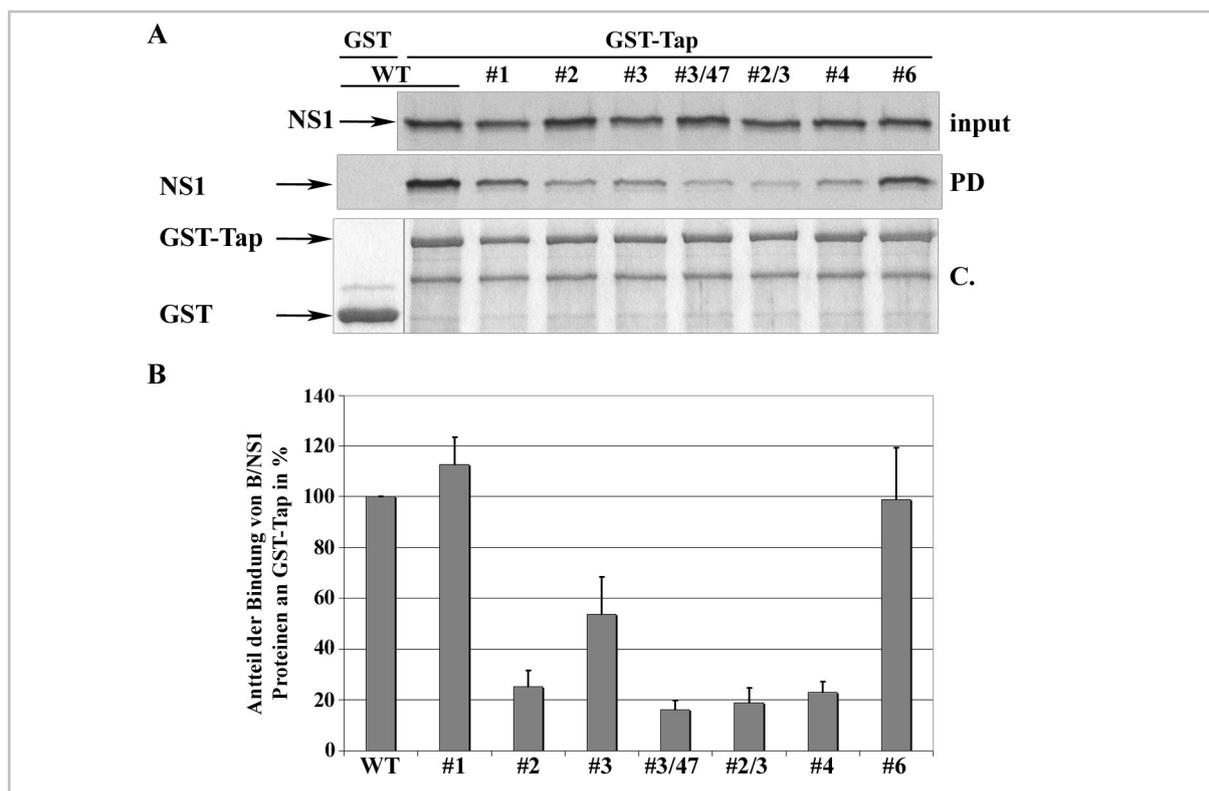


Abb. 3.22: Das B/NS1 Protein bindet den mRNA Exportfaktor Tap. (A) Die kodierende Sequenz für Tap wurde aus dem Plasmid pEGFP-Tap amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sal*II in den Vektor pGEX5X.1 inseriert. GST und GST-Tap Fusionsprotein wurden bakteriell exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit den angegebenen, *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten B/NS1 Proteinen in einem Bindungsansatz inkubiert. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden gereinigt und auf einer SDS-PAGE aufgetrennt (PD). Die aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie (C.) bzw. Autoradiographie detektiert (PD und input). Der Input entsprach 3,3 % der in die Reaktion eingesetzten *in vitro* translatierten Proteine. (B) Die radioaktiven Signale wurden mit einem Phosphoimager ausgewertet. Dabei erfolgte eine Normalisierung der Signale der koprazipitierten B/NS1 Proteine mit den Signalen des Inputs. Die Bindung des WT-Proteins an GST-Tap entsprach 100 %. Die Bindungen der Proteinmutanten wurden auf das WT-Signal bezogen berechnet und sind dementsprechend ebenfalls in % angegeben. Die Werte ergeben sich aus dem Mittel von drei unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Das UAP56 Protein ist ein Bestandteil des durch den Tap/NXF1 Exportrezeptor vermittelten mRNA Exportwegs. Daher sollte in einem GST-Kopräzitationsassay eine mögliche Interaktion zwischen dem B/NS1 Protein und dem Exportrezeptor untersucht werden. Dafür wurde das Expressionsplasmid für pGex-Tap/NXF1 generiert, in welchem die kodierende Sequenz für Tap/NXF1 über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sal*II in den Vektor pGex5X.1 inseriert wurde. GST und GST-Tap Fusionsproteine wurden bakteriell exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *in vitro* translatierten und [³⁵S]-Methionin markierten B/NS1 WT-Protein und den Proteinmutanten B/NS1#1, #2, #3, #3/47, #2/3, #4 und #6 in einem Bindungsansatz inkubiert. Die gebundenen B/NS1 Proteine wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend autoradiographisch detektiert. Quantifiziert wurden die Signale mittels Phosphorimager.

Das B/NS1 WT-Protein sowie die Proteinmutanten #1 und #6 kopräzitierten mit GST-Tap mit ähnlicher Effizienz (Abb. 3.22A). Wie auch bei der UAP56-Bindung bewirkte ein Austausch basischer Aminosäuren in der Sequenz 47-64 eine Reduktion der B/NS1-Bindung an GST-Tap (Abb. 3.22A). Das B/NS1#3 Protein war auf 50 %, die Proteinmutanten #2 und #4 auf 25 % der Bindung des Exportfaktors durch das WT-Protein reduziert. Die B/NS1 Proteine #3/47 und #2/3 waren mit 16 % und 19 % Bindungsfähigkeit am stärksten eingeschränkt (Abb. 3.22B). Überraschend war, dass die Bindungsfähigkeiten der untersuchten B/NS1 Proteinmutanten an GST-Tap genau denen an GST-UAP56 entsprachen. Dieses Ergebnis weist auf die Möglichkeit hin, dass die Bindung an Tap und UAP56 durch gleiche Sequenzbereiche im B/NS1 Protein vermittelt wird, was eine gleichzeitige Bindung beider RNA Exportfaktoren unwahrscheinlich erscheinen lässt. Eine alternative Erklärung ist eine Überbrückung der Tap- und/oder UAP56-Bindung an B/NS1 durch RNA-Moleküle, welche aus der *in vitro* Translation bzw. der Aufreinigung bakteriell exprimierter GST-Fusionsproteine stammten. Alle drei Proteine sind zur RNA-Bindung befähigt, so dass die Kopräzitation von B/NS1 nicht Folge einer direkten Bindung an UAP56 und/oder Tap sein muss, sondern die GST Fusionsproteine sowie B/NS1 Bestandteile eines RNA-Proteinkomplexes sein könnten. Daher sollte eine mögliche Brückenfunktion von RNA-Molekülen durch eine RNaseA-Behandlung entsprechender Reaktionsansätze untersucht werden.

3.7.3 RNase-Behandlung hat einen negativen Einfluss auf die Bindung von B/NS1 an UAP56 und einen positiven auf die Tap-Bindung

Um den Einfluss von RNA-Molekülen auf die Bindung von B/NS1 an Tap und UAP56 zu prüfen, wurden diese durch RNaseA-Behandlung aus den entsprechenden GST-Kopräzitationsansätzen entfernt. An Glutathion-Sepharose immobilisierte GST-Tap und GST-UAP56 Fusionsproteine wurden mit bzw. ohne RNaseA vorinkubiert. Ebenso wurden die *in vitro* Translationsansätze von B/NS1 nicht oder mit RNaseA behandelt. Die immobilisierten Fusionsproteine und GST wurden mit entsprechenden *in vitro* translatierten B/NS1 Proteinen in einem Bindungsansatz inkubiert. Die gebundenen B/NS1 Proteine wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend autoradiographisch detektiert. Mit einem Phosphorimager wurden die Signale quantifiziert.

Eine RNaseA Behandlung des GST-Tap-Bindungsansatzes verursachte eine mehr als 50 %-ige Reduktion der B/NS1-Bindung an GST-Tap (Abb. 3.23). Dies deutete darauf hin, dass RNA-Moleküle zumindest eine unterstützende Funktion bei der Interaktion von Tap und B/NS1 haben. Die Interaktion von B/NS1 mit GST-UAP56 hingegen wurde durch einen RNase-Verdau um das Dreifache verstärkt (Abb. 3.23). Entsprechend schien hier die RNA-Bindung mindestens eines Interaktionspartners einen negativen Einfluss auf die Protein-Protein Interaktion zu haben.

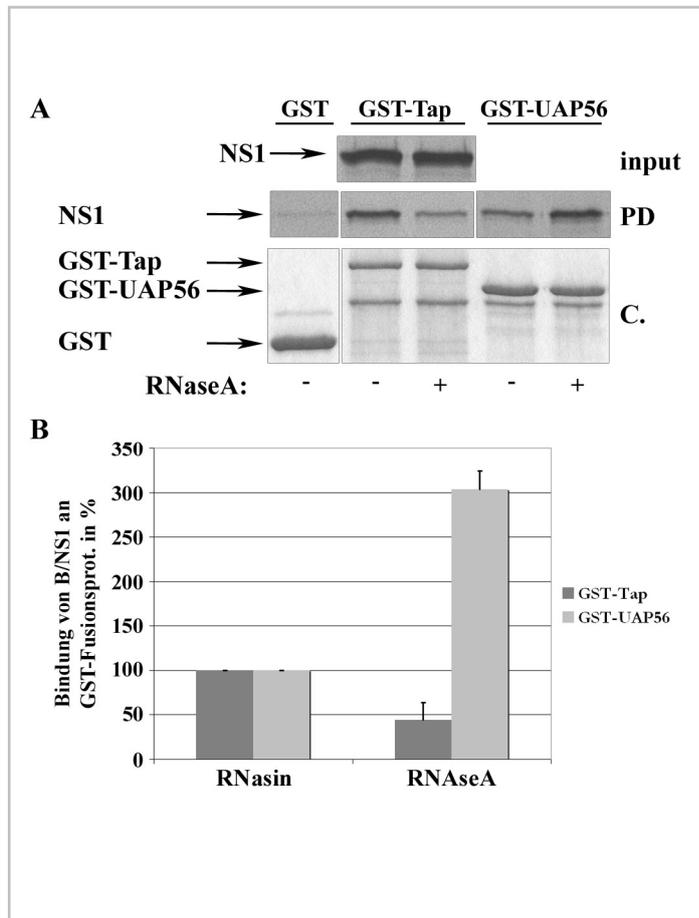


Abb. 3.23: RNase-Behandlung verstärkt die Bindung von B/NS1 an Tap, nicht aber an UAP56. (A) GST, GST-Tap und GST-UAP56 Fusionsproteine wurden bakteriell exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *in vitro* translatiertem und radioaktiv markiertem B/NS1 Protein in einem Bindungsansatz inkubiert. Je ein *in vitro* Translationsansatz und Bindungsansatz mit entsprechendem GST-Fusionsproteinen wurde nicht oder mit RNaseA behandelt. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden gereinigt und auf einer SDS-PAGE aufgetrennt (PD). Die aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie (C.) bzw. Autoradiographie detektiert (PD und input). Der Input entsprach 3,3 % der in die Reaktion eingesetzten *in vitro* translatierten Proteine. (B) Die radioaktiven Signale wurden mit einem Phosphoimager ausgewertet. Dabei erfolgte eine Normalisierung der Signale der kopräzipitierten B/NS1 Proteine mit den Signalen des Inputs. Die Bindung des B/NS1 Proteins an GST-Tap bzw. GST-UAP56 ohne RNaseA-Behandlung entsprach 100 %. Die Bindung des B/NS1 Proteins mit RNaseA Behandlung wurde auf das B/NS1-Signal ohne RNaseA-Behandlung bezogen berechnet und ist dementsprechend ebenfalls in % angegeben. Die Werte ergeben sich aus dem Mittel von drei unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

3.7.4 B/NS1 kopräzipitiert mit zellulärer und viraler mRNA aus infizierten Zellysaten

Eine Voraussetzung für eine Vermittlungsfunktion des B/NS1 Proteins im viralen mRNA Export ist eine Bindung des Proteins an RNA-Moleküle *in vivo*. Nachdem festgestellt wurde, dass das B/NS1 Protein mit den mRNA Exportfaktoren UAP56 und Tap/NXF1 interagiert, sollte daher in einem nächsten Schritt eine mögliche Kopräzipitation vom B/NS1 Protein mit viraler und zellulärer mRNA untersucht werden. Dafür wurden A549 Zellen nicht oder mit Influenza B WT-Virus oder der Virusmutante #4 infiziert, dessen NS1 Protein nicht mehr in der Lage ist, dsRNA *in vitro* zu binden (Abb. 3.5) (Dauber *et al.*, 2006). 8 h nach der Infektion wurden die Zellen lysiert. Für die Immunopräzipitation (IP) der B/NS1 Proteine und die damit verbundene RNA-Koimmunopräzipitation (RIP) wurden die Lysate mit einem an Protein G-Agarose immobilisierten B/NS1-spezifischem Kaninchen-Antiserum oder einem entsprechenden Kontroll-Prä-Immunsantisera inkubiert. Die erfolgreiche Immunopräzipitation entsprechender B/NS1 Proteine wurde in einer Hälfte der Proben im Immunoblot untersucht (Abb. 3.24, untere Panele (WB)).

Aus der anderen Hälfte der immunopräzipitierten Proben wurde RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Durch reverse Transkription poly(A)-haltiger RNA und anschließender PCR mit spezifischen Primern wurden virale NA, NP und M1 mRNA, sowie zelluläre Aktin und GAPDH mRNA in den Input und den immunopräzipitierten Proben nachgewiesen (Abb. 3.24, obere Panele).

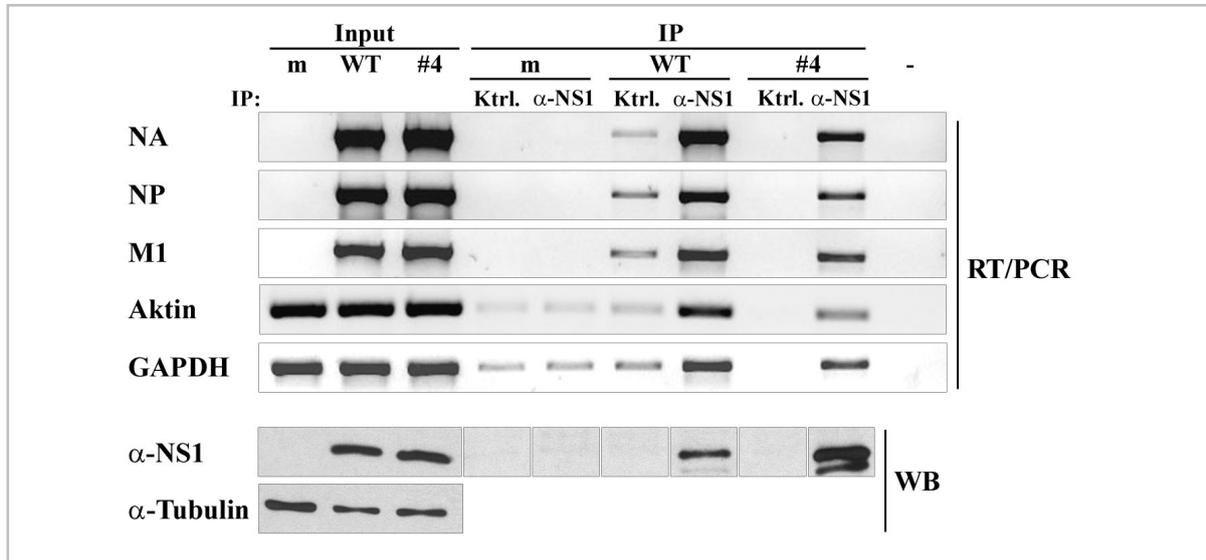


Abb. 3.23: Das NS1 Protein von Influenza B Virus interagiert während einer Infektion mit viralen und zellulären mRNAs. A549 Zellen wurden nicht oder mit Influenza B WT-Virus oder der Virusmutante #4 mit einer MOI von 2,5 infiziert. 8 h nach der Infektion wurden die Zellen lysiert. 5 % der Lysate wurden als Inputkontrolle im Immunoblot analysiert. Für die RNA-Isolierung wurden je 15 % der Lysate als Inputkontrolle eingesetzt. Die Zellysate wurden geteilt und mit an Protein G-Agarose immobilisiertem B/NS1 Antiserum oder einem Kontroll-Prä-Immunantiserum in einem Reaktionsansatz inkubiert. Die Präzipitate einer Hälfte der Proben sowie die Inputproben wurden im Immunoblot mit Antikörpern gegen B/NS1 und Tubulin, welches als Ladekontrolle diente, analysiert (untere Panele). Aus der anderen Hälfte der Proben sowie den Inputproben wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation die RNA isoliert. Poly(A)-haltige RNA wurde mit entsprechendem OligodT Primer revers transkribiert. Die cDNAs wurden in PCRs mit spezifischen Primern zur Amplifikation von viralen NA, NP und M1 und zellulären Aktin und GAPDH cDNAs eingesetzt. Die Negativkontrolle ist durch „-“ gekennzeichnet. Die PCR Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert (obere Panele).

In WT-Virus infizierten Zellen kopräzipitierten sowohl virale NA, NP und M1 mRNA als auch zelluläre Aktin und GAPDH mRNA mit dem B/NS1 Protein. Die gleiche virale und zelluläre mRNA kopräzipitierte mit der NS1 Proteinmutante #4, wenn auch in geringeren Mengen als beim WT NS1 Protein. Für das B/NS1#4 Protein wurde in vorherigen Arbeiten gezeigt, dass es in einem EMSA keine synthetischen dsRNA-Moleküle von ca. 80 nt Länge bindet (Dauber *et al.*, 2006), jedoch in *in vitro* Versuchen noch mit einer viralen Model-mRNA von ca. 50 nt Länge, welche wahrscheinlich einzel- und doppelsträngige Bereiche aufwies, kopräzipitierte. Diese Bindung war jedoch im Vergleich zum WT B/NS1 Protein erheblich eingeschränkt. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Kopräzipitationsversuche bestätigten eine solche gegenüber dem WT-Protein verminderte Bindung der Proteinmutante #4 an virale und zelluläre mRNA.

Die im Rahmen dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse geben erstmals Hinweise auf eine Funktion des B/NS1 Proteins im nuklearen Export viraler mRNA. Es wurde gezeigt, dass B/NS1 mit den mRNA

Exportfaktoren UAP56 und Tap/NXF1 interagiert. Ferner wurde gezeigt, dass B/NS1 entweder direkt an virale mRNA bindet oder mit dieser in einem Komplex vorliegt. Interessanterweise wurde auch eine Assoziation mit zellulärer mRNA gefunden. Die Identifizierung der Aminosäuresequenzen im B/NS1 Protein, welche die nukleare Lokalisation und Speckle-Interaktion des Proteins vermittelten, ermöglichte die gezielte Generation von rekombinanten Influenza B Viren, deren NS1 Proteine die entsprechenden Eigenschaften fehlten. Das eingeschränkte Wachstum der entsprechenden Virusmutanten unterstützte die Annahme, dass das B/NS1 Protein mindestens eine nukleare Funktion besitzt, welche für eine effiziente Virusreplikation wichtig ist. Teile dieser Arbeit sind bereits in Schneider *et al.*, 2009 (Schneider *et al.*, 2009) publiziert.

4. Diskussion

4.1 Übersicht der Ziele dieser Arbeit

In der Vergangenheit hat die Erforschung von Viren und deren Zusammenspiel mit zellulären Prozessen wiederholt zur Entschlüsselung wichtiger biologischer Fragestellungen geführt. 1957 identifizierten Isaacs und Lindenmann das Interferon, welches von Zellen nach Behandlung mit Hitze-inaktiviertem Influenza Virus sezerniert wurde, als einen zellulären Faktor, der in der Lage ist, die Replikation dieser Viren zu inhibieren (Isaacs and Lindenmann, 1957) und ebneten somit den Weg zur Erforschung des Interferon-Systems. Interferone werden heute u. a. zur Therapie chronischer Hepatitis-B und -C Infektionen, bei einigen Krebstherapien und der Behandlung von multipler Sklerose eingesetzt.

Im Fokus dieser Arbeit stand das NS1 Protein von Influenza B Virus. Die NS1 Proteine von Influenza A und B Viren sind für eine effiziente Virusreplikation essentiell. Beide Proteine antagonisieren das Typ I Interferonsystem der Zelle (Mibayashi *et al.*, 2007; Opitz *et al.*, 2007; Dauber *et al.*, 2006; Dauber *et al.*, 2004; Donelan *et al.*, 2004; Garcia-Sastre *et al.*, 1998). Diese Eigenschaft ist ein Grund, warum das NS1 Protein in den vergangenen Jahren immer wieder ein Kandidat für die Entwicklung antiviraler Pharmazeutika sowie ein Ansatzpunkt für die Erzeugung von attenuierten Influenza Virus Lebend-Vakzinen war (Basu *et al.*, 2009; Steel *et al.*, 2009; Wressnigg *et al.*, 2009; Maroto *et al.*, 2008; Talon *et al.*, 2000). Als mögliches Zielprotein für antivirale Wirkstoffe sollten die Eigenschaften der NS1 Proteine möglichst umfangreich bekannt und charakterisiert sein. Während das A/NS1 Protein in der Vergangenheit Gegenstand intensiver Forschungsaktivitäten war, sind für das B/NS1 Protein bisher neben seinen Interferon-antagonistischen Funktionen keine weiteren Eigenschaften beschrieben.

Für das B/NS1 Protein wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Interaktion mit nuklearen Speckle-Domänen charakterisiert und der Versuch unternommen, aus dieser spezifischen zellulären Lokalisation eine Funktion abzuleiten. In diesem Zusammenhang sollten Signale im B/NS1 Protein identifiziert werden, welche die zelluläre Lokalisation des Proteins während der Infektion regulieren, um in anschließenden Mutagenese-Studien Funktionsverluste des Proteins und deren Einfluss auf die Virusreplikation untersuchen zu können. Interessant ist, dass in nuklearen Speckle-Domänen u. a. Proteine lokalisieren, die am zellulären mRNA Export beteiligt sind. Die Lokalisation des B/NS1 Proteins in diesen Domänen war daher ein Hinweis für eine Funktion des Proteins im viralen mRNA Export. Bis heute weiß man trotz intensiver Forschung wenig darüber, wie Influenza Viren ihre mRNA aus dem Zellkern exportieren. Da virale mRNA von der viralen Polymerase synthetisiert wird und die meisten Transkripte nicht von zellulären Enzymen prozessiert werden, sind Influenza Viren auf Mechanismen angewiesen, die das Einschleusen viraler mRNA in nukleare Exportwege ermöglichen. Neueste Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass der Export viraler mRNA durch das Tap/NXF1 Protein vermittelt wird (Hao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). In dieser Arbeit sollte daher eine Verbindung zwischen dem B/NS1 Protein und dem

Tap/NXF1 Exportweg gesucht werden, welche eine mögliche Funktion des NS1 Proteins im viralen mRNA Export unterstützt.

4.2 Die Fähigkeit des NS1 Proteins zur Speckle-Interaktion ist in verschiedenen Influenza B Virusstämmen konserviert und unabhängig von der Wirtsspezies

Bis heute sind für das multifunktionelle NS1 Protein von Influenza B Viren nur Funktionen beschrieben, die sich auf die Antagonisierung des Typ I Interferonsystems der Zelle bzw. antivirale Proteine, wie PKR, beschränken (Lai *et al.*, 2009; Dauber *et al.*, 2006; Dauber *et al.*, 2004; Donelan *et al.*, 2004; Yuan and Krug, 2001). Diese Eigenschaften sind wahrscheinlich zytoplasmatische Funktionen, die im späten Infektionsstadium eine Rolle spielen. Interessanterweise zeigte das B/NS1 Protein in den hier durchgeführten Studien eine sehr dynamische Lokalisation während der Infektion. In der frühen Phase der Infektion war das Protein ausschließlich im Nukleus und in der späten Phase im Zytoplasma lokalisiert. Dies wies auf eine starke Regulation der Proteinlokalisierung während der Infektion hin. Während der nuklearen Phase war das B/NS1 Protein mit nuklearen Speckle-Domänen assoziiert. Diese Interaktion ist eine autonome Eigenschaft des B/NS1 Proteins und bedarf keiner anderen viralen Faktoren. Jedoch bleibt Plasmid-exprimiertes B/NS1 Protein mit Speckle-Domänen assoziiert, wohingegen diese Assoziation während einer Infektion nur transient ist und Speckles in der späten Infektionsphase aufgelöst sind. Nukleare Speckle-Domänen sind nicht membranumgebene, nukleare Kompartimente, in welchen Proteine akkumulieren, die in die Transkription und das Spleißen, die Qualitätskontrolle sowie den Export der mRNA involviert sind (Masuda *et al.*, 2005; Saitoh *et al.*, 2004; Mintz and Spector, 2000). Sie haben eine wichtige Rolle in der mRNA Reifung, jedoch wird angenommen, dass in ihnen keine zellulären Transkripte prozessiert werden. Vielmehr besteht die allgemeine Annahme, dass diese Kompartimente eine zeitliche und räumliche Verbindung zwischen mRNA-Reifung und Export reflektieren (Hall *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Speckle-Interaktion des NS1 Proteins in den vier getesteten Influenza B Virusstämmen B/Lee/40, B/Yam/1/73, B/Thr/2/02 und B/Bln/37/06, deren NS1 Proteine ca. 90% Sequenzidentität aufweisen, konserviert ist, was vermuten lässt, dass diese Eigenschaft generell in allen Influenza B Viren erhalten ist. Ferner beschränkte sich die Assoziation von B/NS1 mit nuklearen Speckle-Domänen nicht auf eine Wirtsspezies, sondern wurde in humanen, kaninen und murinen Zelllinien im Kontext einer Infektion nachgewiesen. Es ist somit wahrscheinlich, dass die Wechselwirkung von B/NS1 mit Speckle-Domänen auch in anderen Säugerspezies konserviert ist. Interessanterweise ist die Interaktion des NS1 Proteins mit nuklearen Speckle-Domänen eine Influenza B Virus spezifische Eigenschaft, welche für Influenza A Virus nicht nachgewiesen werden konnte. Ein Markerprotein und gleichzeitig Strukturkomponente nuklearer Speckle-Domänen ist der Spleißfaktor SC35. Neben diesem Faktor sind mehr als 150 weitere Proteine mit nuklearen Speckle-Domänen assoziiert (Saitoh *et al.*, 2004), u. a. auch das Poly(A)-Bindepotein PABP2, die für den mRNA Export wichtige RNA-Helikase UAP56 und das Tap-Adapterprotein Aly/Ref (Saitoh *et al.*, 2004; Krause *et al.*,

1994). Auch diese drei Proteine kolokalisierten mit transient exprimiertem B/NS1 Protein in nuklearen Speckle-Domänen, jedoch war die morphologische Veränderung der Domänen und deren Abrundung nicht so stark ausgeprägt, wie die in infizierten Zellen mit dem SC35-spezifischen Antikörper nachgewiesenen Veränderungen. Erklären könnte diese Beobachtung eine Faktor-spezifische Umlagerung während einer Influenza B Virusinfektion, bei der z. B. der Spleißfaktor SC35 anders betroffen ist, als die mRNA Exportfaktoren Aly und UAP56. Ferner ist das SC35 Protein eine Strukturkomponente der Speckle-Domänen, wohingegen die Proteine Aly und UAP56 nur transient mit diesen Domänen assoziiert sind (Hall *et al.*, 2006). Daher sind Strukturveränderungen der Speckle-Domänen durch Markierung des SC35 Proteins wahrscheinlich deutlicher wahrzunehmen. Die hier gewonnenen Erkenntnisse zur Assoziation des B/NS1 Proteins mit nuklearen Speckle-Domänen bildeten die Grundlage für weitere strukturelle und funktionelle Untersuchungen dieser Virus-Wirts-Interaktion.

Interessanterweise wurde bereits für einige Proteine von Mitgliedern der Herpesvirusfamilie eine Interaktion mit nuklearen Speckle-Domänen gezeigt. Während einer Herpes Simplex 1 (HSV 1) Virusinfektion kommt es ähnlich wie in einer Influenza B Virusinfektion zur Abrundung von Speckle-Domänen (Phelan *et al.*, 1993). Es wurde gezeigt, dass das virale ICP27 Protein mit diesen Domänen assoziiert ist. ICP27 ist ein multifunktionales Protein, welches den Export intronloser viraler mRNA vermittelt (Chen *et al.*, 2002). Es interagiert in nuklearen Speckle-Domänen mit Aly/Ref und rekrutiert dieses Protein im Laufe der Virusinfektion an die Orte der viralen Genexpression (Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2002). Durch die Beladung viraler Transkripte mit Aly/Ref werden diese *per se* nicht Export-kompetenten viralen mRNAs durch Tap/NXF1 gebunden und ins Zytoplasma transportiert. Ähnliches wurde für das ORF 57 Protein des Karposi Sarcoma-assoziierten Herpesvirus (KSHV) beschrieben (Boyne *et al.*, 2008). Auch dieses Protein kolokalisiert mit SC35 in nuklearen Speckle-Domänen und rekrutiert Aly/Ref zu intronlosen viralen Transkripten. Eine ähnliche Funktion des B/NS1 Proteins könnte dessen Lokalisation in Speckle-Domänen bewirken.

In der Literatur wurde eine nukleare Lokalisation des B/NS1 Proteins im Jahr 1987 von Norton und Kollegen beschrieben (Norton *et al.*, 1987). Jedoch wurden bisher weder die Signale, welche diese Lokalisation vermitteln, noch eine entsprechende nukleare Funktion des Proteins beschrieben. Daher wurden zunächst Sequenzmotive in der B/NS1 Aminosäuresequenz identifiziert, welche sowohl die nukleare Lokalisation sowie die Assoziation mit Speckle-Domänen vermitteln.

4.3 Identifizierung und Charakterisierung eines nuklearen Lokalisationssignals im B/NS1 Protein

Die nukleare Lokalisation von Proteinen wird u. a. durch klassische nukleare Lokalisationssignale (NLS) vermittelt, die sich durch die Abfolge mehrerer basischer Aminosäuren auszeichnen und von dem Importprotein Importin α erkannt und gebunden werden (Radu *et al.*, 1995). Ein klassisches NLS zeichnet sich durch drei Eigenschaften aus: I. Die Sequenz vermittelt den nuklearen Import des Kargoproteins und

Mutationen im NLS führen zum Abbruch des nuklearen Imports. II. Die Sequenz allein ist ausreichend, um ein nicht nukleares Reporterprotein in den Kern zu transportieren. III. Das Protein interagiert direkt mit dem Importrezeptor und diese Interaktion wird durch das NLS vermittelt (Lange *et al.*, 2007).

Die Signale, welche die Kernlokalisierung und Speckle-Interaktion des B/NS1 Proteins vermitteln, wurden im N-terminalen Bereich des Proteins, innerhalb der Aminosäuren 1-104, identifiziert. Die Analysen machten deutlich, dass das B/NS1 Protein, anders als einige A/NS1 Proteine, kein zweites NLS in der C-terminalen Domäne besitzt (Melen *et al.*, 2007; Greenspan *et al.*, 1988). Das B/NS1 Protein hat in seiner N-terminalen Domäne (Aminosäuren 1-104) mehrere basische Aminosäurebereiche. Austausch der basischen Aminosäuren an den Positionen R47/R50 und K52/R53/K54 zu Alanin führten zur Einschränkung der nuklearen Lokalisation des B/NS1 Proteins. Im Kontext eines β -Galaktosidase-GFP-Fusionsproteins bewirkte eine gleichzeitige Mutation aller fünf basischen Aminosäuren R47/R50/K52/R53/K54 im N-terminalen B/NS1-Fragment eine vollständig zytoplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins. Ferner vermittelten die elf B/NS1 Aminosäuren 46-DRLHRLKRRKLE-56 allein die Translokation des Fusionsproteins in den Zellkern (Abb. 4.1). Auch hier führte ein Austausch der fünf basischen Aminosäuren zu Alanin zur Inhibition des nuklearen Imports. Die Bedeutung der basischen Aminosäuren in der B/NS1 Sequenz 46-DRLHRLKRRKLE-56 für den nuklearen Import des Proteins wurde außerdem im Kontext einer Virusinfektion zweifelsfrei bestätigt. NS1 Proteine mit zwei bis drei Alaninaustauschen im NLS waren während einer Virusinfektion mit rekombinanten Influenza B Viren in der nuklearen Lokalisation eingeschränkt, der Austausch von vier bis fünf basischen Aminosäuren führte dann zur vollständigen Inhibition des nuklearen NS1-Imports.

Konsensus-Sequenz	K [K/R] X K/R
SV40 T-Antigen	126-P K K K R K V-132
A/NS1 NLS1	34-D R L R R D Q K S L R-44
B/NS1	46-D R L H R L K R K L E-56

Abb. 4.1: Vergleich der nuklearen Lokalisationssignale der B/NS1 und A/NS1 Proteine mit dem klassischen monopartiten NLS. Die Aminosäurepositionen, welche für die Importin α Bindung wichtig sind, sind fett unterlegt. Das X in der Konsensus-Sequenz entspricht meist einem Arg, Lys, Pro, Val oder Ala (Chelsky *et al.*, 1989).

Ein GST-Kopräzipitationsassay zeigte, dass das B/NS1 Protein mit dem Importrezeptor Importin α interagiert. Für einige virale Proteine, wie z.B. das NP von Influenza A Virus, das E1A Protein von Adenovirus, das W Protein von Nipahvirus oder das N Protein von Hantaan Virus ist beschrieben, dass diese bevorzugt an bestimmte Importin α Homologe binden (Taylor *et al.*, 2009; Shaw *et al.*, 2005; Melen *et al.*, 2003; Kohler *et al.*, 2001). Das B/NS1 Protein hingegen wies keine Bindungsspezifität für ein Importin α Homolog auf, da es mit allen untersuchten Importin α Homologen $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, und $\alpha 7$ (Köhler *et al.*, 1997) interagierte. Die universelle Importin α -Bindung durch das NS1 Protein bietet einen strategischen Vorteil für das Virus, welches den nuklearen Import des viralen Proteins in einem breiten Spektrum verschiedener Zelltypen sicherstellt. Die elf B/NS1 Aminosäuren 46-DRLHRLKRRKLE-56 waren für eine Bindung des Reporterproteins an Importin α ausreichend. Erstaunlich war, dass das NLS

von B/NS1 eine stärkere Bindung des Reporterproteins vermittelte, als das klassische NLS von SV40 Tag (Abb. 4.1). Die Sequenz 46-DRLHRLKRRKLE-56 des B/NS1 Proteins erfüllte somit alle oben genannten Merkmale eines klassischen NLS. Das NLS von B/NS1 besitzt wie ein klassisches monopartites NLS mehrere aufeinander folgende basische Aminosäuren, dennoch gibt es Abweichungen von der allgemeinen Konsensus-Sequenz K [K/R] X [K/R] (das X entspricht meist der Aminosäure Arg, Lys, Pro, Val oder Ala) (Chelsky *et al.*, 1989). Jedoch weiß man heute, dass die wenigsten nuklearen Lokalisationssignale genau der Konsensus-Sequenz entsprechen (Kosugi *et al.*, 2009; Lange *et al.*, 2007). Die Tatsache, dass die basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 an den Positionen 47, 50, 52 und 54 in mehr als 179 Sequenzen natürlich vorkommender Influenza B Viren konserviert sind, unterstützt die große funktionelle Bedeutung dieser Aminosäuren.

Auch für das A/NS1 Protein wurde bereits ein NLS in der N-terminalen Domäne an den Positionen 34-DRLRRDQK-41 beschrieben (Melen *et al.*, 2007; Greenspan *et al.*, 1988). Sowohl auf Sequenzebene, als auch in der dreidimensionalen Struktur sind die N-terminalen NLS beider NS1 Proteine sehr ähnlich (Abb. 4.2) (Yin *et al.*, 2007). Interessanterweise überlappen beide NLS mit Aminosäuren, welche die RNA-Bindung der NS1 Proteine vermitteln. Die RNA-Bindedomänen der NS1 Proteine umfassen die N-terminalen 73 (Typ A) bzw. 93 (Typ B) Aminosäuren, welche eine ungewöhnliche Faltung, bestehend aus sechs α -Helices, aufweisen, die sich von zellulären RNA-Bindemotiven unterscheidet (Wang *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2007). Damit gehören die NS1 Proteine zu einer Reihe von viralen Faktoren, die überlappende nukleare Lokalisationssequenzen und RNA-Bindedomänen aufweisen, wie z. B. das UL69 Protein des humanen Cytomegalovirus (HCMV), das UL47 Protein von Herpes Simplex Virus Typ1 (HSV-1) und das Rev Protein des humanen Immundefizienz Virus (HIV) (Donnelly *et al.*, 2007; Toth *et al.*, 2006; Hope, 1999).

Das Rev Protein von HIV vermittelt den Export viraler intronhaltiger mRNA durch die Bindung an das Rev responsive Element (RRE) in der viralen mRNA und an den Exportfaktor Crm1. Für Rev wurde gezeigt, dass RNA-Bindung und die Vermittlung des nuklearen Imports nicht gleichzeitig geschehen können. Diese Eigenschaft verhindert den Rückimport bereits aus dem Zellkern transportierter RRE-beinhalten der viralen mRNAs. Erst ein Abdissoziieren der mRNA ermöglicht eine erneute Bindung des Rev Proteins an seinen Importrezeptor und somit die Translokation in den Zellkern (Hope, 1999). Für das A/NS1 Protein wurde hingegen in *in vitro* Experimenten gezeigt, dass die Bindung des Proteins an RNA und an Importin α simultan erfolgen kann (Melen *et al.*, 2007). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass im A/NS1 Protein die Signale für die RNA-Bindung und den nuklearen Import nicht vollständig überlappen. Die Tatsache, dass das B/NS1 Protein, anders als das A/NS1 Protein, während der späten Infektionsphase fast ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, deutet darauf hin, dass der Import des Proteins zu diesem Zeitpunkt der Infektion blockiert wird. Inwieweit diese Eigenschaft mit einer ausschließlichen RNA- und Importin α -Bindung des B/NS1 Proteins korreliert, muss jedoch in weiteren Untersuchungen erst noch abgeklärt werden.

4.4 Die N-terminalen 90 Aminosäuren von B/NS1 vermitteln die Interaktion mit nuklearen Speckle-Domänen

In der Literatur sind einige verschiedene nicht verwandte Proteinsequenzen beschrieben, die eine Akkumulierung entsprechender Proteine in nuklearen Speckle-Domänen vermitteln. Zu diesen Sequenzelementen gehören die Argin (R)/Serin (S)-reichen Domänen der humanen SR Spleißfaktoren SC35, SRp20 und des Tra Proteins von *Drosophila melanogaster* (Caceres *et al.*, 1997; Hedley *et al.*, 1995), zwei aneinander grenzende Argenin/Serin/Prolin-reiche Sequenzen des Spleißfaktors SRm160 (Wagner *et al.*, 2003), eine Threonin/Prolin-reiche Sequenz im Spleißfaktor SF3b (Eilbracht and Schmidt-Zachmann, 2001), sowie das RNA-Bindemotiv „SELOR“ im putativen mRNA Exportprotein MLN51 und zwei RNA Erkennungsmotive (RRM) des alternativen Spleißfaktors ASF/SF2 (Degot *et al.*, 2004; Caceres *et al.*, 1997). Vor kurzem wurde beschrieben, dass die Aufeinanderfolge von fünf oder mehr Histidinen in der Sequenz von 15 Proteinen deren Lokalisation in nuklearen Speckle-Domänen vermittelt (Salichs *et al.*, 2009). Nah verwandte paraloge Proteine hingegen, die keine Histidin-Wiederholungen aufwiesen, waren nicht in der Lage, in nuklearen Speckle-Domänen zu lokalisieren. Die mechanistische Grundlage der Vermittlung der Speckle-Lokalisation durch diese Sequenzmotive ist noch nicht verstanden. Es ist aber wahrscheinlich, dass Interaktionen zwischen verschiedenen Speckle-assoziierten Faktoren oder von Proteinen mit der nuklearen Matrix zur Lokalisation von Faktoren in diesen Domänen beitragen (Wagner *et al.*, 2003; Caceres *et al.*, 1997).

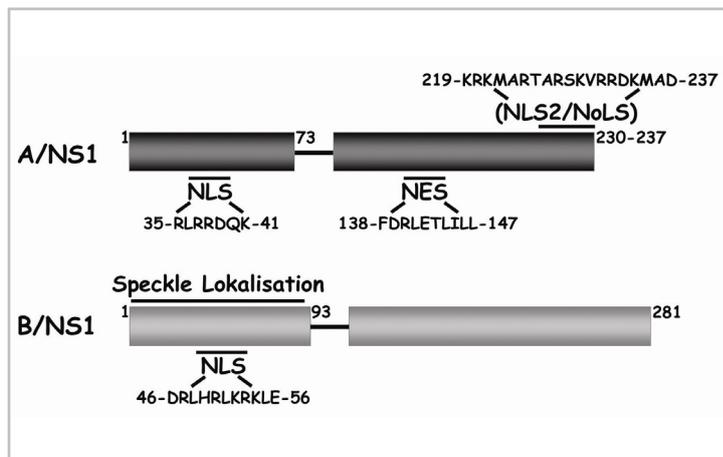


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Lokalisationssignale in den NS1 Proteinen von Influenza A und B Viren. Das A/NS1 Protein besitzt ein NLS in der N-terminalen Domäne. Für einige Influenza A Virusstämme wurde ein zweites NLS im C-terminalen Bereich des Proteins identifiziert. Dieses überlappt mit einer Signalsequenz für die Lokalisation des Proteins in Nukleoli. Ferner wurden die Aminosäurepositionen 138-147 als ein nukleares Exportsignal beschrieben. Das B/NS1 Protein besitzt ein NLS in der N-terminalen Domäne. Die N-terminalen 90 Aminosäuren vermitteln die Speckle-Assoziation des Proteins.

Interessanterweise stellten sich die basischen Aminosäuren im NLS des B/NS1 Proteins nicht nur für die nukleare Lokalisation des Proteins, sondern auch für dessen Interaktion mit Speckle-Domänen als essentiell heraus (Abb. 4.2). Dabei sind die Aminosäuren an den Positionen R47 und R50 gleichzeitig auch für die RNA-Bindung des B/NS1 Proteins wichtig (Yin *et al.*, 2007). Alaninaustausche der basischen Aminosäuren im NLS von B/NS1 verhinderten die Translokation eines Reporterfusionsproteins mit den N-terminalen 104 Aminosäuren von B/NS1 in den Zellkern. Um die Aktivität dieser Aminosäuren für die Speckle-Assoziation untersuchen zu können, wurde das heterologe NLS vom SV40 T-ag im Fusionsprotein koexprimiert. Das SV40 T-ag NLS vermittelte die Relokalisation des Fusionsproteins in den Zellkern, dieses war jedoch nukleoplasmatisch diffus verteilt und bewirkte keine morphologische

Veränderung der Speckle-Domänen. Da das Reporterfusionsprotein mit dem NLS von B/NS1 (46-DRLHRLKRRKLE-56) zwar im Kern lokalisiert, dort jedoch diffus nukleoplasmatisch verteilt war, waren die basischen Aminosäuren im NLS somit notwendig, aber nicht ausreichend für eine Speckle-Interaktion.

Die minimale B/NS1 Sequenz, welche im Kontext des Reporterfusionsproteins noch in der Lage war, eine Lokalisation in Speckle-Domänen zu vermitteln, umfasste die N-terminalen Aminosäuren 1-90 (Abb. 4.2). Weitere N-terminale (aa12-90) oder C-terminale (aa1-83) Verkürzungen der B/NS1 Aminosäuresequenz führten zum Verlust der Speckle-Interaktion. Daher sind die B/NS1 Aminosäuren 1-12 und 83-90 entweder direkt an einer Interaktion mit Speckle-Domänen beteiligt oder tragen zur Aufrechterhaltung einer funktionellen Konformation des B/NS1 Proteins bei. Inwieweit die RNA-Bindung des B/NS1 Proteins bei der Speckle-Interaktion eine Rolle spielt oder ob die Speckle-Interaktion des B/NS1 Proteins auf eine Wechselwirkung mit Speckle-assoziierten Faktoren zurückzuführen ist, bleibt zu untersuchen. Jedoch weist die Überlappung der Sequenzbereiche, welche die nukleare und Speckle-Lokalisation, sowie die RNA-Bindung und Dimerisierung vermitteln, darauf hin, dass eine zeitliche Abfolge von Interaktionen des B/NS1 Proteins im Verlauf der Infektion mit verschiedenen Proteinen oder RNA-Molekülen zur Verdeckung vorher zugänglicher Signalsequenzen, wie z. B. dem NLS, führt.

4.5 Influenza B Virusmutanten, deren NS1 Proteine die Fähigkeit zur Kernlokalisierung und Speckle-Interaktion verloren haben, sind in ihrer Replikation eingeschränkt

Um den Einfluss der nuklearen Lokalisation und Speckle-Interaktion des NS1 Proteins auf die Replikationsfähigkeit von Influenza B Virus untersuchen zu können, wurden rekombinante Influenza B Viren mit Mutationen des NLS-Motivs generiert. Die NS1 Proteine der Influenza B Virusmutanten #2 (R47A/R50A) und #3 (K52A/R53A/K54A) (Dauber *et al.*, 2006) wurden während der Infektion stark vermindert in den Zellkern transportiert. Die minore im Zellkern lokalisierte B/NS1-Fraktion kolokalisierte allerdings mit SC35 und die Speckle-Domänen waren morphologisch verändert. Interessanterweise war das B/NS1#2 Protein auch in der späten Infektionsphase im Zellkern vorhanden, wohingegen das Wildtyp-Protein fast ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert war. Dies könnte auf einen defekten Exportmechanismus des B/NS1#2 Proteins hinweisen. Die Virusmutanten B/Lee/NS#3/47 und #2/3 exprimierten NS1 Proteine mit Alaninaustauschen an den Positionen R47/K52/R53/K54 und R47/R50/K52/R53/K54. Beide NS1 Proteine waren in infizierten Zellen vom Kernkompartiment ausgeschlossen und die Speckle-Domänen blieben morphologisch unverändert. Dies zeigt, dass die Abrundung dieses Kernkompartiments direkt von der Präsenz des NS1 Proteins abhängt und nicht indirekt, z. B. über eine Inhibition der RNA-Prozessierung, verursacht wird.

Um auszuschließen, dass der Verlust der Speckle-Interaktion auf einen generellen Verlust der Funktionalität eines mutierten B/NS1 Proteins zurückzuführen war, wurden beispielhaft die Homodimerbildung und ISG15 Interaktion des Proteins getestet. Austausche der basischen Aminosäuren gegen Alanin im NLS von B/NS1 schränkten die Dimerbildung der *in vitro* translatierten B/NS1 Proteine

mit GST-B/NS1 um bis zu 75% im Vergleich zum WT-Protein ein. Daher überlappen das NLS und die Dimerisierungssequenz im B/NS1 Protein. Es bleibt zu klären, inwieweit die Dimerisierung des B/NS1 Proteins eine Voraussetzung für die Interaktion mit Importin α ist. Austausch basischer Aminosäuren im NLS hatten hingegen keinen Einfluss auf die Bindung von B/NS1 an GST-ISG15 und somit wiesen die Proteinmutanten keine generelle Fehlfaltung auf.

Die Interpretation der Replikationsstudien von rekombinanten Viren mit Mutationen im NLS wird durch den Umstand erschwert, dass die beteiligten Aminosäuren nicht nur wichtig für die Lokalisation sind, sondern auch für andere Funktionen, wie die Blockade der PKR (Dauber *et al.*, 2006). Daher können die Auswirkungen von Mutationen in diesem Sequenzbereich auf die Virusreplikation nicht eindeutig einer Eigenschaft des NS1 Proteins zugeordnet werden. PKR ist in basalen Mengen in der Zelle vorhanden und wird durch Typ I Interferone (IFN) induziert (Samuel, 2001). Die Aktivierung der PKR während der Infektion erfolgt durch virale RNA. Die Fähigkeit des B/NS1 Proteins zur RNA-Bindung ist notwendig für dessen Inhibition der PKR (Dauber *et al.*, 2006). Wird die PKR während der Infektion aktiviert, kommt es zum Translationsstop und somit werden weder zelluläre noch virale Proteine synthetisiert. Dieser Abwehrmechanismus der Zelle schränkt die Virusreplikation sehr stark ein (Dauber *et al.*, 2006). Entsprechend replizierten die Virusmutanten B/Lee/NS#2, #3/47 und #2/3 in IFN-kompetenten MDCK Zellen und elf Tage alten Bruteiern nur sehr stark eingeschränkt und die Virustiter waren um 4-5 Log-Stufen geringer als Wildtyp-Virustiter. Das NS1 Protein der Virusmutante B/Lee/NS#3 ist eingeschränkt im Kern lokalisiert und in der Lage, die Aktivierung der PKR zu inhibieren. Dennoch war diese Virusmutante in IFN-kompetenten Systemen in seinem Wachstum um das bis zu Zehnfache gegenüber dem WT-Virus eingeschränkt. Um den negativen Einfluss der PKR auf die Vermehrung der Virusmutanten möglichst auszuschalten, wurden die Replikationsstudien in IFN-defizienten sechs Tage alten Bruteiern wiederholt. Hier waren die Influenza B/Lee Viren #2, #3/47 und #2/3 weniger im Wachstum eingeschränkt, wuchsen aber dennoch nur zu zehnfach bis hundertfach geringeren Titern als das WT-Virus. Die Virusmutante B/Lee/NS#3 replizierte ähnlich wie in IFN-kompetenten Systemen in sechs Tage alten Bruteiern bis zu zehnfach geringeren Titern als das WT-Virus. Die Ergebnisse der Wachstumsanalysen deuten auf einen unmittelbaren Einfluss der nuklearen Lokalisation des B/NS1 Proteins und somit der Speckle-Interaktion auf die Virusreplikation hin.

4.6 Das B/NS1 Protein interagiert mit zellulären mRNA Exportfaktoren

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, der Assoziation des B/NS1 Proteins mit Speckle-Domänen eine Funktion zuzuordnen. Interessanterweise wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Kolo-kalisation von transient exprimiertem B/NS1 Protein mit den mRNA Exportproteinen Aly/Ref und UAP56 in nuklearen Speckle-Domänen beobachtet. Die RNA-Helikase UAP56 ist ein essentieller mRNA Exportfaktor. Sie ist Bestandteil des während der Prozessierung an mRNA rekrutierten Exon-Junction-Komplexes (EJC) sowie des Transkription/Export Komplexes (TREX) (Le Hir and Andersen, 2008; Masuda *et al.*, 2005). UAP56 rekrutiert das Adapterprotein Aly/Ref an die Transkripte und verbindet

somit den Exportprozess mit der Prozessierung von intronhaltiger mRNA (Abb. 4.3) (Luo *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2000). In GST-Kopräzipitationsversuchen wurde gezeigt, dass das B/NS1 Protein sowohl mit UAP56 als auch dem mRNA Exportrezeptor Tap/NXF1 interagiert. Mutationen der basischen Aminosäuren im Abschnitt 46-QDRLHRLKRLKLESRIKTHNK-64 führten zu einer starken Einschränkung der Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins an GST-UAP56 und GST-Tap. Da bekannt war, dass die Aminosäuren an den Positionen R47/R50 und R50/K60/K64 für die dsRNA-Bindung des B/NS1 Proteins wichtig sind (Donelan *et al.*, 2004), ergab sich die Vermutung, dass das B/NS1 Protein möglicherweise unter Vermittlung von RNA mit den RNA-Exportfaktoren interagiert. Die Tatsache, dass eine RNase-Behandlung die Interaktion von B/NS1 mit GST-Tap um 50% reduzierte, lässt den Schluss zu, dass RNA-Moleküle zumindest einen stabilisierenden Einfluss auf diese Interaktion haben. Es war unerwartet, dass eine RNase-Behandlung die Interaktion von B/NS1 mit GST-UAP56 um das Dreifache erhöhte. Dies zeigt, dass der Abschnitt 46-64 im B/NS1 einen direkten, vermutlich RNA-unabhängigen, Einfluss auf die UAP56-Bindung von B/NS1 ausübt. Sowohl UAP56 als auch B/NS1 sind RNA-bindende Proteine. Entspräche der RNA-Bindungsereich dem Protein-Interaktionsbereich eines oder beider Proteine, könnten RNA-Moleküle und Protein-Interaktionspartner um eine Bindung konkurrieren. Die Abwesenheit von RNA-Molekülen würde somit eine verstärkte Protein-Protein Interaktion fördern.

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse ist derzeit nicht ausgeschlossen, dass das B/NS1 Protein gleichzeitig im Komplex mit Tap/NXF1 und UAP56 vorliegt. Da in den *in vitro* Translationsansätzen vermutlich auch die nuklearen Proteine UAP56 und Tap/NXF1 enthalten sind, kann die Bindung von B/NS1 an Tap/NXF1 indirekt durch UAP56 vermittelt sein. Ferner bleibt zu überprüfen, ob das B/NS1 Protein an weitere RNA-Exportfaktoren, wie Aly/Ref, bindet.

Die beobachteten Interaktionen des B/NS1 Proteins mit nuklearen Exportproteinen unterstützen eine Funktion des B/NS1 Proteins im Export viraler mRNA. Eine solche Funktion setzt eine Bindung des Proteins an virale Transkripte voraus. In RNA-Kopräzipitationsversuchen wurde hier gezeigt, dass das B/NS1 Protein *in vivo* an die viralen Transkripte NA, NP und M bindet. Ferner war das Protein mit den zellulären Transkripten GAPDH und Aktin assoziiert, welche Tap/NXF1-vermittelt exportiert werden. Die B/NS1 Proteinmutante #4, welche doppelsträngige RNA nicht mehr bindet (Donelan *et al.*, 2004), war während der Infektion deutlich schwächer als das WT-Protein mit viralen und zellulären Transkripten assoziiert. Dies ist im Einklang mit vorhergehenden *in vitro* Studien, in welchen gezeigt wurde, dass das Protein B/NS1#4 schwächer als das WT-Protein mit einer viralen Model-mRNA koprizipitierte. Die Assoziation von B/NS1 mit zellulärer und viraler mRNA spricht für eine generelle Bindung des Proteins an Transkripte, welche Tap/NXF1-vermittelt exportiert werden. Bisher wurde keine sequenzspezifische Bindung des NS1 Proteins beschrieben. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass B/NS1 virale mRNA direkt erkennt oder an virale mRNA-bindende Proteine, wie z. B. die virale Polymerase bindet und somit virale Transkripte für den Export markiert. Dies schließt nicht aus, dass B/NS1 durch die Bindung an zelluläre mRNA Exportfaktoren auch mit zellulären Transkripten im Komplex vorliegt.

4.7 Influenza Viren und der nukleare Export ihrer mRNA – ein Modell

Der Export zellulärer mRNA durch den Tap/NXF1 Exportweg ist in Vertebratenzellen stark an die verschiedenen Schritte der Genexpression, insbesondere die Transkription durch die zelluläre Polymerase II und das Spleißen, gekoppelt (Iglesias and Stutz, 2008; Luna *et al.*, 2008; Reed and Hurt, 2002). Obwohl seit langem bekannt ist, dass Influenza Viren ihr Genom im Zellkern replizieren und transkribieren, weiß man bis heute relativ wenig darüber, wie Influenza Viren ihre mRNA aus dem Zellkern exportieren. Anders als die meisten zellulären Transkripte werden sieben der acht viralen Influenza B Virus Transkripte nicht gespleißt (Palese and Shaw, 2007). Ferner werden alle viralen mRNAs, obwohl sie zellulärer mRNA sehr ähneln, ausschließlich von viralen Proteinen generiert (Palese and Shaw, 2007). Daher stellt sich die Frage, wie die viralen Transkripte von der zellulären Exportmaschinerie erkannt werden.

Eine Strategie von Influenza Viren, den Export der durch die virale Polymerase generierten mRNA mit der zellulären Transkriptionsmaschinerie zu koppeln, deutet sich durch die Interaktion des viralen Polymerasekomplexes mit der Carboxy-terminalen Domänen (CTD) der zellulären Polymerase II an (Engelhardt *et al.*, 2005). Durch die CTD werden Faktoren, welche in die Prozessierung, Qualitätskontrolle und den Export zellulärer Transkripte involviert sind, schon kotranskriptionell an die prä-mRNA rekrutiert (Luna *et al.*, 2008; Aguilera, 2005). Durch die Interaktion der viralen Polymerase mit der CTD könnten virale Transkripte daher Zugang zu ansonsten nur während der Transkription durch die zelluläre Polymerase II vermittelte Funktionen, wie die Beladung der mRNA mit heterogenen nuklearen RNPs, gewinnen (Amorim *et al.*, 2007). Übereinstimmend mit einem solchen Vorgang wurde gezeigt, dass eine aktive Polymerase II Transkription essentiell für den Export viraler Transkripte ist (Amorim *et al.*, 2007). Dies ist eine, neben der Bereitstellung der 5'-Kappenstrukturen, für die virale mRNA Synthese zusätzliche Voraussetzung für eine effiziente Virusreplikation. Amorim und Kollegen zeigten, dass nach Inhibition der prozessiven Polymerase II durch 5,6- Dichloro-1-b-D-ribofuranosyl-benzimidazole (DRB) zwar virale Transkripte in normalem Umfang synthetisiert werden, es jedoch zu keiner Proteinexpression kommt. Die Inhibition der viralen Genexpression konnte dabei auf eine Blockade des Exports viraler Transkripte zurückgeführt werden (Amorim *et al.*, 2007). Interessanterweise wurde gezeigt, dass das NS1 Protein von Influenza A Virus mit der viralen Polymerase interagiert (Kuo and Krug, 2009; Marion *et al.*, 1997). Inwieweit diese Interaktion eine Rolle für den Export der viralen Transkripte spielt, bleibt jedoch noch zu untersuchen.

Kürzlich publizierte Forschungsergebnisse brachten Licht in den zweiten bisher ungeklärten Aspekt des mRNA Exports von Influenza Virus. Sie weisen auf eine Rolle des Tap/NXF1 Exportrezeptors im viralen mRNA Export hin. So wurde berichtet, dass die mRNA von Influenza A Virus mit dem Tap/NXF1 Exportrezeptor kopräzipitierte und ein durch siRNAs vermittelter Knockdown von Tap/NXF1 zu einer verminderten Influenza A Virusreplikation führte (Hao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Die Tatsache, dass der Export viraler mRNA durch den Crm1 Inhibitor Leptomycin B nicht unterbunden wird, schließt

einen Crm1-vermittelten viralen mRNA Export aus und spricht für eine Funktion von Tap/NXF1 in diesem Vorgang (Wang *et al.*, 2008; Amorim *et al.*, 2007).

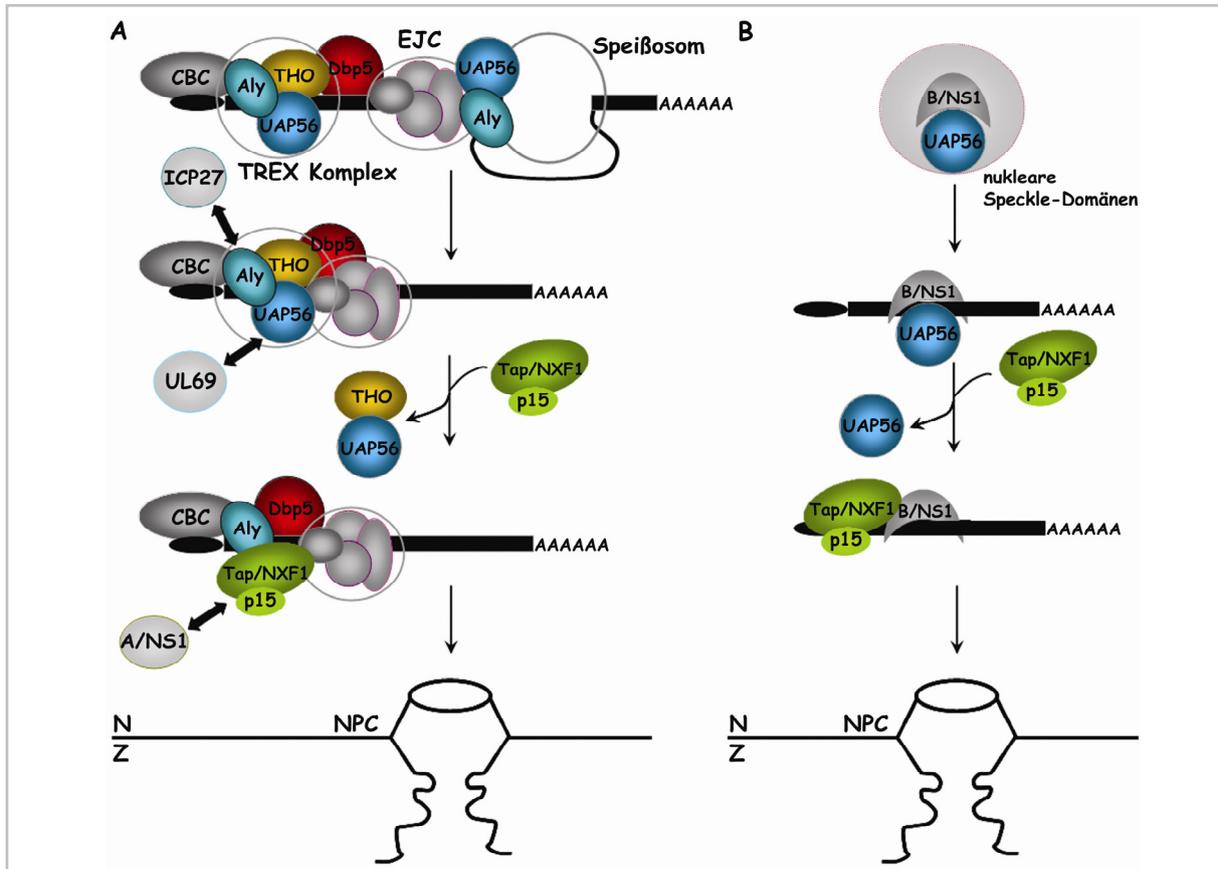


Abb. 4.3: (A) Schematische Darstellung des nuklearen Exports intronhaltiger mRNA in Metazoa. Im Zuge des Spleißvorganges wird der Exon-Junction-Multiproteinkomplex (EJC) aufwärts der Verknüpfungsstelle zweier aufeinander folgender Exons auf die mRNA geladen. Der EJC ist involviert in die mRNA Qualitätskontrolle und den Export und dient wahrscheinlich als Bindungsplattform für Proteine, die in diese Prozesse involviert sind. Die Exportfaktoren Aly/Ref und UAP56 sind transient mit dem EJC assoziiert und werden somit an den Spleißvorgang gekoppelt zur mRNA rekrutiert. Zusammen mit dem THO-Komplex bilden UAP56 und Aly/Ref den Transkriptions/Export (TREX) Komplex, welcher in Abhängigkeit von der Transkription und der 5'-Kappenstruktur zur mRNA rekrutiert wird. Aly/Ref ist ein Adapterprotein für den Exportrezeptor Tap/NXF1. Durch die Bindung von Tap/NXF1 kommt es zum Abdissoziieren von UAP56 aus dem mRNP Komplex. Tap/NXF1 interagiert mit den FG-repeats bestimmter Nukleoporine und vermittelt somit den Transport des mRNP Komplexes durch die Kernpore. Die Herpesvirus Proteine ICP27 von HSV-1 und UL69 von HCMV, sowie das NS1 Protein von Influenza A Virus interagieren mit verschiedenen Faktoren des Tap/NXF1 mRNA Exportwegs und sind entsprechend im Schema gekennzeichnet. **(B) Arbeitsmodell: Das NS1 Protein von Influenza B Virus rekrutiert UAP56 zu viralen mRNAs und vermittelt so deren Transport ins Zytoplasma.** Das B/NS1 Protein interagiert mit UAP56. Diese Interaktion könnte in nuklearen Speckle-Domänen stattfinden. UAP56 vermittelt die Bindung von B/NS1 an virale mRNA. Dies könnte die Affinität von B/NS1 zu UAP56 vermindern und die Bindungsaffinität für Tap/NXF1 erhöhen. Tap/NXF1 bindet an B/NS1 und vermittelt den Transport des viralen mRNP Komplexes ins Zytoplasma.

Doch wie genau werden die viralen Transkripte, die aufgrund der Synthese durch die virale Polymerase sowie fehlende Prozessierung *per se* keine guten Zielmoleküle für den zellulären mRNA Exportrezeptor Tap/NXF1 sind, in diesen Transportweg eingeschleust? Sicher ist, dass virale Transkripte, welche während der primären Transkription in der ersten Stunde der Infektion synthetisiert werden, in Abwesenheit des viralen Nichtstrukturproteins exportiert werden (Palese and Shaw, 2007). Dennoch verdichten sich die Hinweise, dass die NS1 Proteine von Influenza A und B Virus eine verstärkende Rolle

beim Export viraler mRNA in späteren Infektionsstadien spielen. Schon in früheren Studien mit Temperatur-sensitiven Influenza Viren wurde gezeigt, dass Mutationen im NS1 Gen zu Defekten in der Expression „später“ viraler Gene, wie M1 und HA, führen (Garaigorta *et al.*, 2005; Ludwig *et al.*, 1995). Erst vor kurzem zeigten Satterly und Kollegen in GST-Präzipitationsversuchen, dass das A/NS1 Protein mit den zellulären mRNA Exportfaktoren Tap/NXF1, p15, Rae1 und dem Nukleoporin Nup98 interagiert (Satterly *et al.*, 2007). Nup98 interagiert mit Tap/NXF1 und ist eine wichtige Komponente der zellulären mRNA Exportmaschinerie (Bachi *et al.*, 2000; Powers *et al.*, 1997). Interessanterweise nimmt die Konzentration dieses Nukleoporins im Verlauf einer Influenza A Virusinfektion ab (Satterly *et al.*, 2007). Satterly und Kollegen schlugen vor, dass die beschriebenen Interaktionen des A/NS1 Proteins mit nukleären Exportfaktoren eine inhibitorische Funktion des viralen Proteins im mRNA Export widerspiegeln. Die Tatsache, dass neuere Forschungsergebnisse auf einen Tap/NXF1 vermittelten Export viraler mRNA hinweisen, lässt die Eigenschaften des A/NS1 Proteins jedoch in einem anderen Licht erscheinen.

Auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und bereits für das A/NS1 beschriebener Eigenschaften wird in Abb. 4.3 für das NS1 Protein von Influenza B Virus ein mechanistisches Modell vorgeschlagen, welches eine Rekrutierungsfunktion nuklearer mRNA Exportproteine zur Unterstützung des viralen mRNA Exports durch das B/NS1 Protein beschreibt. In Einklang mit einer solchen Funktion wurde gezeigt, dass virale Transkripte mit dem B/NS1 Protein kopräzipitieren. Ähnliche Befunde wurden bereits von Wang und Kollegen für das A/NS1 Protein vorgelegt (Wang *et al.*, 2008).

Das B/NS1 Protein interagiert mit dem Exportprotein UAP56. Bis heute ist nicht vollständig geklärt, welche exakte Funktion das UAP56 Protein, außer der Rekrutierung des Aly/Ref Proteins, beim mRNA Export vermittelt (Luo *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2000). Es wurde jedoch vorgeschlagen, dass UAP56 wie ein Chaperon funktioniert, welches mRNA mit Proteinen wie Aly/Ref belädt (Taniguchi and Ohno, 2008). Das UL69 Protein des humanen Cytomegalovirus (hCMV) bindet an UAP56 und rekrutiert diesen Faktor zu intronloser viraler mRNA, um so deren Export zu vermitteln. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass diese Funktion unabhängig von der RNA-Bindfähigkeit des UL69 Proteins ist (Toth and Stamminger, 2008; Toth *et al.*, 2006). Auch hier wurde ein Mechanismus postuliert, welcher die Beladung viraler mRNA mit UL69 durch UAP56 vorschlägt (Abb. 4.3).

Ähnliches könnte auch für das B/NS1 Protein gelten, da für das A/NS1 eine niedrige Bindungskonstante für RNA-Moleküle ermittelt wurde (Yin *et al.*, 2007; Chien *et al.*, 2004). UAP56 könnte wie ein Chaperon die Bindung von B/NS1 an virale mRNA verstärken (Abb. 4.3). Anschließend rekrutiert B/NS1 den Exportrezeptor Tap/NXF1 zur viralen mRNA. Bei einer direkten Bindung von B/NS1 an Tap/NXF1 bliebe zu klären, ob die Bindungsstellen für Tap/NXF1 und UAP56 überlappen und deren Bindung an B/NS1 daher exklusiv ist. Ferner besteht die Möglichkeit, dass die RNA-Bindung von B/NS1, vermittelt durch UAP56, eine Konformationsänderung des viralen Proteins bewirkt, welche ein Abdissoziieren von

UAP56 und eine Bindung von Tap/NXF1 ermöglicht. Die Tatsache, dass die Tap/NXF1 Bindung von B/NS1 durch RNA-Moleküle begünstigt wird, spricht für einen solchen Mechanismus.

Die Interaktion des B/NS1 Proteins mit Speckle-assoziierten mRNA Exportproteinen steht wahrscheinlich in unmittelbarem Zusammenhang mit der Lokalisation des Proteins in Speckle-Domänen. Die Tatsache, dass der Crm1-Inhibitor Leptomycin B keinen Einfluss auf einen Export des B/NS1 Proteins aus dem Zellkern in das Zytoplasma hatte, schließt einen Crm1-vermittelten Export des Proteins aus und lässt einen Tap/NXF1-vermittelten Exports als wahrscheinlich erscheinen. Replikationsstudien mit rekombinanten Influenza B Viren, deren NS1 Proteine nicht mehr im Kern lokalisierten und mit Speckle-Domänen interagierten, zeigten, dass diese Funktionen wichtig für eine optimale Virusreplikation sind.

4.8 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse hinsichtlich der nuklearen Funktionen des B/NS1 Proteins stützen die Hypothese einer Funktion des Proteins im viralen mRNA Export. Dennoch bleiben einige Schlüsselfragen und Nachweise offen, deren Beantwortung zum Verständnis des Exports der Mehrheit intronloser viraler Transkripte beitragen würde:

1) Neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass ein siRNA Knockdown von Tap/NXF1 zu einer verminderten Influenza A Virusreplikation führt (Hao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Ferner war der Exportrezeptor in Influenza A Virus infizierten Zellen mit viraler mRNA assoziiert. Dennoch steht ein direkter Nachweis für die Aktivität von Tap/NXF1 als Exportrezeptor von viraler mRNA aus. Ein siRNA Knockdown von Tap/NXF1 und ein anschließender Nachweis einer Blockade des viralen mRNA Exports würden einen direkten Zusammenhang zwischen Tap/NXF1 und dem viralen mRNA Export herstellen.

2) Die Interaktionen beider NS1 Proteine mit nuklearen Exportfaktoren deuten stark auf eine Funktion der NS1 Proteine im Export viraler mRNA hin. Dennoch wurde bis heute keine direkte Verbindung zwischen viralem mRNA Export und den NS1 Proteinen, sowie eine mechanistische Grundlage einer solchen Funktion, gezeigt. Da im Rahmen dieser Arbeit Sequenzmotive ermittelt wurden, welche die nuklearen Funktionen des B/NS1 Proteins komplett inhibieren, können diese Aspekte nun anhand von in diesen Signalen mutagenisierten rekombinanten Viren untersucht werden.

3) Es wurde gezeigt, dass die NS1 Proteine von Influenza A und B Virus *in vitro* und *in vivo* mit viraler mRNA interagieren, doch kopräzipitierte auch prozessierte zelluläre mRNA mit beiden NS1 Proteinen (Wang *et al.*, 2008; Wang and Krug, 1996). Es wird interessant sein zu sehen, ob die Interaktion von NS1 mit viraler mRNA ein selektiver Prozess ist oder eher die Bildung eines Komplexes reflektiert, der neben viraler und zellulärer mRNA auch RNA Exportproteine und NS1 beinhaltet, unabhängig von der RNA-

Bindungsaktivität des Proteins. Der berichtete Einfluss des A/NS1 Proteins auf die Expression später Gene deutet eher auf einen Segment-spezifischen selektiven Prozess hin (Garaigorta *et al.*, 2005; Ludwig *et al.*, 1995). In Übereinstimmung damit wurde für das NP Transkript gezeigt, dass es sich in seinen Exporteigenschaften von den anderen viralen Transkripten unterscheidet (Amorim *et al.*, 2007). So wurde NP z. B. unabhängig von der Aktivität der zellulären RNA-Polymerase II exprimiert. Ferner bleibt zu überprüfen, ob die ein (Typ B Virus) oder zwei (Typ A Virus) prozessierten viralen Transkripte für NS1 bzw. M1, durch das Spleißosom unabhängig von NS1 in den zellulären mRNA Exportweg integriert werden.

4) Haben die NS1 Proteine von Influenza A und B Virus unterschiedliche Mechanismen entwickelt, den Export viraler mRNA zu fördern? Es ist auffällig, dass die NS1 Proteine während der Infektion eine sehr unterschiedliche zelluläre Verteilung aufweisen, obwohl beide Proteine ein sehr ähnliches N-terminales NLS besitzen. Die NS1 Proteine zeigen jedoch weniger als 20 % Sequenzidentität und somit ist eine unterschiedliche Lokalisation nicht verwunderlich. Die Interaktion mit nuklearen Speckle-Domänen ist Influenza B Virus-spezifisch. Dies könnte darauf hindeuten, dass das B/NS1 Protein mit anderen, nämlich Speckle-assoziierten Faktoren interagiert, als das A/NS1 Protein. So wurde in dieser Arbeit eine Interaktion von B/NS1 mit UAP56 gezeigt. Eine solche Funktion ist jedoch für das A/NS1 Protein bisher nicht beschrieben. Ähnliches kennt man von den Herpesviren. Dort rekrutieren die Mitglieder der Virusfamilie unterschiedliche Exportfaktoren zu intronloser viralen mRNA, um deren Export zu fördern. Das ICP27 Protein von HSV-1 interagiert mit Aly/Ref und ist aufgrund dieser Funktion mit nuklearen Speckle-Domänen assoziiert (Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2002). Das UL69 Protein von HCMV hingegen interagiert mit UAP56 und ist nicht in Speckle-Domänen lokalisiert sondern nukleoplasmatisch verteilt (Lischka *et al.*, 2006). Es bleibt zu untersuchen, ob die NS1 Proteine Influenza A und B Viren ähnliche Unterschiede aufweisen. Beide Proteine könnten auf unterschiedlichen Ebenen die viralen Transkripte in den Tap/NXF1 Exportweg einschleusen und somit deren Export fördern.

Die NS1 Proteine von Influenza A und B Viren sind für eine effiziente Virusreplikation essentiell. Daher stehen die beiden Proteine im Fokus der Entwicklung von lebend-attenuierten Impfstoffen bzw. antiviralen Medikamenten. Die Basis solcher Entwicklungen ist die umfassende Beschreibung der Funktionen beider NS1 Proteine sowie die Aufklärung ihrer mechanistischen Grundlagen. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben erstmalig Hinweise auf eine spezifische nukleare Funktion des NS1 Proteins von Influenza B Virus. Sie sind eine profunde und richtungsweisende Grundlage für eine weitergehende Charakterisierung des Proteins.

Zusammenfassung

Die NS1 Proteine von Influenza A und B Viren sind für eine effiziente Virusreplikation essentiell. Dies spiegelt sich in dem stark eingeschränkten Wachstum eines Influenza NS1 Deletionsvirus (A/delNS1; B/delNS1) wider. Interessanterweise replizierte A/delNS1 Virus effizient in IFN-defizienten Vero Zellen, wohingegen ein B/delNS1 Virus auf diesen Zellen stark eingeschränkt war (Dauber *et al.*, 2004; Garcia-Sastre *et al.*, 1998). Dieses Ergebnis deutet auf eine weitere für die Virusreplikation wichtige Eigenschaft des B/NS1 Proteins hin, welche von der Interferon-Antagonisierung verschieden ist. Neueste Forschungsergebnisse bringen das NS1 Protein von Influenza Virus in Verbindung mit dem durch das Rezeptorprotein Tap/NXF1 vermittelten mRNA Exportweg (Hao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Satterly *et al.*, 2007). Da die viralen Transkripte von der viralen Polymerase synthetisiert und die meisten Transkripte nicht prozessiert werden, werden sie *per se* nicht effizient von der nuklearen Exportmaschinerie erkannt (Palese and Shaw, 2007). Daher mussten Influenza Viren Mechanismen entwickeln, die eine Integration ihrer mRNA in einen nuklearen Exportweg erlauben.

Interessanterweise akkumuliert das B/NS1 Protein in der frühen Infektionsphase in nuklearen Speckle-Domänen, jedoch konnte dieser Wechselwirkung bisher keine Funktion zugeordnet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Interaktionen des B/NS1 Proteins mit nuklearen Faktoren charakterisiert. Das B/NS1 Protein interagiert mit den nuklearen mRNA Exportproteinen UAP56 und Tap/NXF1 in GST-Kopräzipitationsassays und Immunfluoreszenzanalysen zeigten eine Kolo-kalisation der mRNA Exportfaktoren Aly/Ref und UAP56 mit B/NS1 in nuklearen Speckle-Domänen. Ferner spricht die Kopräzipitation viraler mRNA mit B/NS1 aus infizierten Zellysaten für eine Funktion des Proteins im mRNA Export. Die Lokalisation des B/NS1 Proteins ist während des Infektionsverlaufes sehr dynamisch. In der frühen Infektionsphase ist es im Nukleus und zu späteren Zeitpunkten im Zytoplasma lokalisiert. Die N-terminalen Aminosäuren 46-56 wurden als ein nukleares Lokalisationssignal (NLS) identifiziert, welches die Bindung an den Importrezeptor Importin α vermittelte. Überraschend war, dass die basischen Aminosäuren im NLS auch für die Speckle-Lokalisation notwendig, aber nicht hinreichend waren. Die Expression von trunkierten B/NS1 Fragmenten im Kontext auto-fluoreszierender β -Galaktosidase-GFP-Fusionsproteine ergab, dass die Aminosäuren 1-90 für eine Interaktion von B/NS1 mit Speckle-Domänen notwendig sind. Das verminderte Wachstum rekombinanter Influenza B Virusmutanten, welche NS1 Proteine mit eingeschränkter nuklearer Lokalisation und Speckle-Assoziation exprimierten, wies darauf hin, dass diese Eigenschaften wichtig für die Virusreplikation sind.

Neben neuesten Ergebnissen, welche auf eine Funktion des Tap/NXF1 Rezeptors im nuklearen viralen mRNA Export hinweisen (Hao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Satterly *et al.*, 2007), unterstützt diese Arbeit eine Funktion des viralen NS1 Proteins in diesem Prozess. Die Interaktion des B/NS1 Proteins mit nuklearen mRNA Exportproteinen, wahrscheinlich in Speckle-Domänen, und die Bindung an virale Transkripte *in vivo* sind Hinweise auf eine rekrutierende Funktion des B/NS1 Proteins, welche die Integration viraler Transkripte in den Tap/NXF1 mRNA Exportweg ermöglicht.

Summary

The NS1 proteins of influenza A and B virus are essential for full level virus replication. This is reflected by a strong attenuation of influenza NS1 deletion virus (A/delNS1, B/delNS1). Interestingly, the type A delNS1 virus can replicate efficiently in IFN-deficient Vero cells, whereas the B/delNS1 virus is strongly attenuated also in these hosts (Dauber *et al.*, 2004; Garcia-Sastre *et al.*, 1998). This suggests that the B/NS1 protein serves another important, yet unknown function in viral replication that is distinct from IFN suppression. However, recent data link the NS1 protein of influenza virus to the cellular Tap/NXF1 mediated mRNA export pathway (Hao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Satterly *et al.*, 2007). The export of cellular mRNA is tightly coupled to transcription and processing events. Since viral mRNA is synthesized by the viral polymerase and most transcripts remain unprocessed they are *per se* not well recognized by the nuclear export machinery (Palese and Shaw, 2007). Therefore influenza viruses must have evolved mechanisms to integrate viral mRNA into a nuclear export pathway.

Interestingly, it has been shown, that the NS1 protein of influenza B virus accumulates in nuclear speckle domains early in infection, but up to now no function has been connected to the protein's nuclear localization. For the first time, this study characterized interactions of the B/NS1 protein with nuclear factors. The B/NS1 protein was shown to interact with the nuclear mRNA export proteins Tap/NXF1 and UAP56 in GST-coprecipitation assays. Immunofluorescence analysis showed a colocalization of the mRNA export proteins UAP56 and Aly/Ref with the B/NS1 protein in nuclear speckle domains, indicating that the interaction of B/NS1 and UAP56 takes place in these subdomains. In addition, viral transcripts coprecipitated with B/NS1 from infected cell lysates, supporting a role of the protein in viral mRNA export. The trafficking of the B/NS1 protein during infection is very dynamic. Early in infection the protein localized to the nuclear compartment, whereas late in infection it was localized in the cytoplasm. The N-terminal amino acids 46-56 were determined to comprise a nuclear localization signal (NLS), which mediated binding to the import receptor importin α in GST-coprecipitation assays. Surprisingly, the basic amino acids within the NLS were also necessary, but not sufficient for speckle localization. Expression of truncated B/NS1 fragments in an auto-fluorescent β -galactosidase-GFP fusion protein revealed the N-terminal 90 amino acids to be necessary for speckle localization. The attenuation of recombinant influenza B viruses expressing NS1 mutant proteins with impaired nuclear localization and speckle association suggested that these properties contribute to viral propagation.

In addition to recently published data, suggesting a function of the Tap/NXF1 receptor in the nuclear viral mRNA export (Hao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Satterly *et al.*, 2007), this study supports a role of the viral NS1 protein in this process. The interaction of the B/NS1 protein with nuclear mRNA export factors and its *in vivo* association with viral mRNA may reflect a recruiting function of the protein which allows the integration of viral transcripts into the nuclear Tap/NXF1 mRNA export pathway.

Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AA	Aminosäure
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinder Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	zenti
ca.	zirka
cDNA	„copy DNA“ kopierte DNA
CO ₂	Kohlendioxid
C-terminal	carboxyterminal
CTD	C-terminalen Domäne
Ci	Curie
CIAP	„calf intestine alkaline phosphatase“, alkalische Phosphatase (Kälberdarm)
CPSF	„cleavage and polyadenylation specificity factor“
Crm1	„chromosome region maintenance 1“ oder Exportin-1
cRNA	„copy/complementary“ RNA
CTE	„constitutive transport element“
d	Tag
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMEM	„Dulbecco's modified Eagle's Medium“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
EJC	„exon junction complex“
FCS	Fetales Kälberserum
FFU	„fluorescence forming units“
g	Gramm
G	Guanin
GST	Glutathion-S-Transferase
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
hCMV	humanes Cytomegalovirus
H ₂ O	Wasser
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSV-1	Humanes Herpes Simplex Virus 1
IFN	Interferon
Imp	Importin
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalactopyranosid
ISG15	„interferon stimulated gene product 15“
ISRE	„Interferon stimulated responsive element“
k	kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter

LMB	Leptomycin B
m	milli
M	Matrixprotein
M	molar
Mda-5	„melanoma differentiation-associated gene 5“
MEM	„Minimal Essential Medium“
miRNA	„micro“ RNA
MOI	„multiplicity of infection“
min	Minute
MPMV	Mason-Pfizer monkey Virus
mRNA	„messenger“ RNA
NA	Neuraminidase
NEP	nukleares Export Protein
NES	„nuclear export signal“, Kernexportsignal
NLS	„nuclear localization signal“, Kernlokalisierungssignal
NPC	„nuclear pore complex“, Kernporenkomplex
Nup	Nukleoporin
nm	Nanometer
NMD	„nonsense mediated decay“
NP	Nukleoprotein
NS1	Nichtstrukturprotein
N-terminal	aminoterminal
NXF	nukleare Export Familie
OD	optische Dichte
PA	Polymeraseuntereinheit, azidisch
PABP	Poly(A)-Bindeprotein
p.i.	„post infection“, nach Infektion
PB	Polymeraseuntereinheit, basisch
PBS	„Phosphate buffered saline“
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PKR	dsRNA-abhängige Proteinkinase R
RIG-I	„Retinoic acid inducible gene I“
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRE	„Rev recognition motif“
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
snRNA	„small nuclear“ RNA
snoRNA	„small nucleolar“ RNA
ssRNA	„singlestranded RNA“, einzelsträngige RNA
STAT	„Signal transducer and activator of transcription“
T	Thymidin
Tap	„Tip associated protein“
TBST	„tris buffered saline with tween“
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyldiamin
TREX	Transkription/Export Komplex
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
V	Volt
vRNA	virale RNA
WT	Wildtyp

Aminosäuren

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

Literaturverzeichnis

- Aguilera, A. (2005) Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 242-250.
- Alonso-Caplen, F.V., Nemeroff, M.E., Qiu, Y. and Krug, R.M. (1992) Nucleocytoplasmic transport: the influenza virus NS1 protein regulates the transport of spliced NS2 mRNA and its precursor NS1 mRNA. *Genes Dev*, **6**, 255-267.
- Amorim, M.J., Read, E.K., Dalton, R.M., Medcalf, L. and Digard, P. (2007) Nuclear export of influenza A virus mRNAs requires ongoing RNA polymerase II activity. *Traffic*, **8**, 1-11.
- Andrejeva, J., Childs, K.S., Young, D.F., Carlos, T.S., Stock, N., Goodbourn, S. and Randall, R.E. (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 17264-17269.
- Aragon, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortin, J. and Nieto, A. (2000) Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol*, **20**, 6259-6268.
- Area, E., Martin-Benito, J., Gastaminza, P., Torreira, E., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L. and Ortin, J. (2004) 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 308-313.
- Arimoto, K., Konishi, H. and Shimotohno, K. (2008) UbcH8 regulates ubiquitin and ISG15 conjugation to RIG-I. *Mol Immunol*, **45**, 1078-1084.
- Askjaer, P., Jensen, T.H., Nilsson, J., Englmeier, L. and Kjems, J. (1998) The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem*, **273**, 33414-33422.
- Baccala, R., Hoebe, K., Kono, D.H., Beutler, B. and Theofilopoulos, A.N. (2007) TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med*, **13**, 543-551.
- Bachi, A., Braun, I.C., Rodrigues, J.P., Pante, N., Ribbeck, K., von Kobbe, C., Kutay, U., Wilm, M., Gorlich, D., Carmo-Fonseca, M. and Izaurralde, E. (2000) The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *Rna*, **6**, 136-158.
- Basu, D., Walkiewicz, M.P., Frieman, M., Baric, R.S., Auble, D.T. and Engel, D.A. (2009) Novel influenza virus NS1 antagonists block replication and restore innate immune function. *J Virol*, **83**, 1881-1891.
- Beaton, A.R. and Krug, R.M. (1986) Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 6282-6286.
- Beloso, A., Martinez, C., Valcarcel, J., Santaren, J.F. and Ortin, J. (1992) Degradation of cellular mRNA during influenza virus infection: its possible role in protein synthesis shutoff. *J Gen Virol*, **73 (Pt 3)**, 575-581.
- Betakova, T., Nermut, M.V. and Hay, A.J. (1996) The NB protein is an integral component of the membrane of influenza B virus. *J Gen Virol*, **77 (Pt 11)**, 2689-2694.
- Borden, E.C., Sen, G.C., Uze, G., Silverman, R.H., Ransohoff, R.M., Foster, G.R. and Stark, G.R. (2007) Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov*, **6**, 975-990.
- Boyne, J.R., Colgan, K.J. and Whitehouse, A. (2008) Herpesvirus saimiri ORF57: a post-transcriptional regulatory protein. *Front Biosci*, **13**, 2928-2938.
- Bray, M., Prasad, S., Dubay, J.W., Hunter, E., Jeang, K.T., Rekosh, D. and Hammarskjold, M.L. (1994) A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1256-1260.
- Burgui, I., Aragon, T., Ortin, J. and Nieto, A. (2003) PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol*, **84**, 3263-3274.
- Caceres, J.F., Misteli, T., Sreaton, G.R., Spector, D.L. and Krainer, A.R. (1997) Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J Cell Biol*, **138**, 225-238.
- Carmo-Fonseca, M., Pepperkok, R., Sproat, B.S., Ansorge, W., Swanson, M.S. and Lamond, A.I. (1991) In vivo detection of snRNP-rich organelles in the nuclei of mammalian cells. *Embo J*, **10**, 1863-1873.

- Casseti, M.C., Noah, D.L., Montelione, G.T. and Krug, R.M. (2001) Efficient translation of mRNAs in influenza A virus-infected cells is independent of the viral 5' untranslated region. *Virology*, **289**, 180-185.
- Chang, Y.G., Yan, X.Z., Xie, Y.Y., Gao, X.C., Song, A.X., Zhang, D.E. and Hu, H.Y. (2008) Different roles for two ubiquitin-like domains of ISG15 in protein modification. *J Biol Chem*, **283**, 13370-13377.
- Chelsky, D., Ralph, R. and Jonak, G. (1989) Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Mol Cell Biol*, **9**, 2487-2492.
- Chen, B.J., Leser, G.P., Jackson, D. and Lamb, R.A. (2008) The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. *J Virol*, **82**, 10059-10070.
- Chen, B.J., Leser, G.P., Morita, E. and Lamb, R.A. (2007) Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J Virol*, **81**, 7111-7123.
- Chen, I.H., Li, L., Silva, L. and Sandri-Goldin, R.M. (2005) ICP27 recruits Aly/REF but not TAP/NXF1 to herpes simplex virus type 1 transcription sites although TAP/NXF1 is required for ICP27 export. *J Virol*, **79**, 3949-3961.
- Chen, I.H., Sciabica, K.S. and Sandri-Goldin, R.M. (2002) ICP27 interacts with the RNA export factor Aly/REF to direct herpes simplex virus type 1 intronless mRNAs to the TAP export pathway. *J Virol*, **76**, 12877-12889.
- Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R. and Yewdell, J.W. (2001) A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, **7**, 1306-1312.
- Chen, Z. and Krug, R.M. (2000) Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells. *Trends Microbiol*, **8**, 376-383.
- Chen, Z., Li, Y. and Krug, R.M. (1999) Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *Embo J*, **18**, 2273-2283.
- Cheng, H., Dufu, K., Lee, C.S., Hsu, J.L., Dias, A. and Reed, R. (2006) Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell*, **127**, 1389-1400.
- Chien, C.Y., Xu, Y., Xiao, R., Aramini, J.M., Sahasrabudhe, P.V., Krug, R.M. and Montelione, G.T. (2004) Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode. *Biochemistry*, **43**, 1950-1962.
- Colwill, K., Pawson, T., Andrews, B., Prasad, J., Manley, J.L., Bell, J.C. and Duncan, P.I. (1996) The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *Embo J*, **15**, 265-275.
- Compans, R.W., Content, J. and Duesberg, P.H. (1972) Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol*, **10**, 795-800.
- Conzelmann, K.K. (2004) Reverse genetics of mononegavirales. *Curr Top Microbiol Immunol*. **283**: 1-41.
- Cros, J.F., Garcia-Sastre, A. and Palese, P. (2005) An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic*, **6**, 205-213.
- Cullen, B.R. (2003) Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci*, **28**, 419-424.
- D'Cunha, J., Ramanujam, S., Wagner, R.J., Witt, P.L., Knight, E., Jr. and Borden, E.C. (1996) In vitro and in vivo secretion of human ISG15, an IFN-induced immunomodulatory cytokine. *J Immunol*, **157**, 4100-4108.
- Darzacq, X., Jady, B.E., Verheggen, C., Kiss, A.M., Bertrand, E. and Kiss, T. (2002) Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *Embo J*, **21**, 2746-2756.
- Dastur, A., Beaudenon, S., Kelley, M., Krug, R.M. and Huibregtse, J.M. (2006) Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells. *J Biol Chem*, **281**, 4334-4338.
- Dauber, B., Heins, G. and Wolff, T. (2004) The influenza B virus nonstructural NS1 protein is essential for efficient viral growth and antagonizes beta interferon induction. *J Virol*, **78**, 1865-1872.
- Dauber, B., Schneider, J. and Wolff, T. (2006) Double-stranded RNA binding of influenza B virus nonstructural NS1 protein inhibits protein kinase R but is not essential to antagonize production of alpha/beta interferon. *J Virol*, **80**, 11667-11677.

- Degot, S., Le Hir, H., Alpy, F., Kedinger, V., Stoll, I., Wendling, C., Seraphin, B., Rio, M.C. and Tomasetto, C. (2004) Association of the breast cancer protein MLN51 with the exon junction complex via its speckle localizer and RNA binding module. *J Biol Chem*, **279**, 33702-33715.
- Desselberger, U., Racaniello, V.R., Zazra, J.J. and Palese, P. (1980) The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene*, **8**, 315-328.
- Donelan, N.R., Dauber, B., Wang, X., Basler, C.F., Wolff, T. and Garcia-Sastre, A. (2004) The N- and C-terminal domains of the NS1 protein of influenza B virus can independently inhibit IRF-3 and beta interferon promoter activation. *J Virol*, **78**, 11574-11582.
- Donnelly, M., Verhagen, J. and Elliott, G. (2007) RNA binding by the herpes simplex virus type 1 nucleocytoplasmic shuttling protein UL47 is mediated by an N-terminal arginine-rich domain that also functions as its nuclear localization signal. *J Virol*, **81**, 2283-2296.
- Ehrhardt, C., Marjuki, H., Wolff, T., Nurnberg, B., Planz, O., Pleschka, S. and Ludwig, S. (2006) Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence. *Cell Microbiol*, **8**, 1336-1348.
- Ehrhardt, C., Wolff, T. and Ludwig, S. (2007a) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by the nonstructural NS1 protein is not conserved among type A and B influenza viruses. *J Virol*, **81**, 12097-12100.
- Ehrhardt, C., Wolff, T., Pleschka, S., Planz, O., Beermann, W., Bode, J.G., Schmolke, M. and Ludwig, S. (2007b) Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J Virol*, **81**, 3058-3067.
- Eilbracht, J. and Schmidt-Zachmann, M.S. (2001) Identification of a sequence element directing a protein to nuclear speckles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3849-3854.
- Elton, D., Simpson-Holley, M., Archer, K., Medcalf, L., Hallam, R., McCauley, J. and Digard, P. (2001) Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol*, **75**, 408-419.
- Enami, K., Sato, T.A., Nakada, S. and Enami, M. (1994) Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol*, **68**, 1432-1437.
- Engelhardt, O.G., Smith, M. and Fodor, E. (2005) Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol*, **79**, 5812-5818.
- Fagerlund, R., Kinnunen, L., Kohler, M., Julkunen, I. and Melen, K. (2005) NF- κ B is transported into the nucleus by importin α 3 and importin α 4. *J Biol Chem*, **280**, 15942-15951.
- Fagerlund, R., Melen, K., Cao, X. and Julkunen, I. (2008) NF- κ B p52, RelB and c-Rel are transported into the nucleus via a subset of importin α molecules. *Cell Signal*, **20**, 1442-1451.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W. and Luhrmann, R. (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, **82**, 475-483.
- Flick, R., Neumann, G., Hoffmann, E., Neumeier, E. and Hobom, G. (1996) Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *Rna*, **2**, 1046-1057.
- Fodor, E., Devenish, L., Engelhardt, O.G., Palese, P., Brownlee, G.G. and Garcia-Sastre, A. (1999) Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol*, **73**, 9679-9682.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. and Mattaj, I.W. (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, **90**, 1051-1060.
- Fortes, P., Beloso, A. and Ortin, J. (1994) Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *Embo J*, **13**, 704-712.
- Fortes, P., Lamond, A.I. and Ortin, J. (1995) Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components. *J Gen Virol*, **76 (Pt 4)**, 1001-1007.
- Garaigorta, U., Falcon, A.M. and Ortin, J. (2005) Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles. *J Virol*, **79**, 15246-15257.
- Garaigorta, U. and Ortin, J. (2007) Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res*, **35**, 4573-4582.
- Garcia-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D.E., Durbin, J.E., Palese, P. and Muster, T. (1998) Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*, **252**, 324-330.

- Garfinkel, M.S. and Katze, M.G. (1993) Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *J Biol Chem*, **268**, 22223-22226.
- Gatfield, D., Le Hir, H., Schmitt, C., Braun, I.C., Kocher, T., Wilm, M. and Izaurralde, E. (2001) The DExH/D box protein HEL/UAP56 is essential for mRNA nuclear export in *Drosophila*. *Curr Biol*, **11**, 1716-1721.
- Gomez-Puertas, P., Albo, C., Perez-Pastrana, E., Vivo, A. and Portela, A. (2000) Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol*, **74**, 11538-11547.
- Gorlich, D. and Kutay, U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 607-660.
- Greenspan, D., Palese, P. and Krystal, M. (1988) Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. *J Virol*, **62**, 3020-3026.
- Gruter, P., Taberner, C., von Kobbe, C., Schmitt, C., Saavedra, C., Bachi, A., Wilm, M., Felber, B.K. and Izaurralde, E. (1998) TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol Cell*, **1**, 649-659.
- Guerra, S., Caceres, A., Knobloch, K.P., Horak, I. and Esteban, M. (2008) Vaccinia virus E3 protein prevents the antiviral action of ISG15. *PLoS Pathog*, **4**, e1000096.
- Hall, L.L., Smith, K.P., Byron, M. and Lawrence, J.B. (2006) Molecular anatomy of a speckle. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, **288**, 664-675.
- Handwerger, K.E. and Gall, J.G. (2006) Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol*, **16**, 19-26.
- Hao, L., Sakurai, A., Watanabe, T., Sorensen, E., Nidom, C.A., Newton, M.A., Ahlquist, P. and Kawaoka, Y. (2008) *Drosophila* RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature*, **454**, 890-893.
- Hatada, E. and Fukuda, R. (1992) Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J Gen Virol*, **73 (Pt 12)**, 3325-3329.
- Hatada, E., Takizawa, T. and Fukuda, R. (1992) Specific binding of influenza A virus NS1 protein to the virus minus-sense RNA in vitro. *J Gen Virol*, **73 (Pt 1)**, 17-25.
- Hedley, M.L., Amrein, H. and Maniatis, T. (1995) An amino acid sequence motif sufficient for subnuclear localization of an arginine/serine-rich splicing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11524-11528.
- Heikkinen, L.S., Kazlauskas, A., Melen, K., Wagner, R., Ziegler, T., Julkunen, I. and Saksela, K. (2008) Avian and 1918 Spanish influenza A virus NS1 proteins bind to Crk/CrkL Src homology 3 domains to activate host cell signaling. *J Biol Chem*, **283**, 5719-5727.
- Helenius, A. (1992) Unpacking the incoming influenza virus. *Cell*, **69**, 577-578.
- Hirst, G.K. (1941) The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryos Infected with Influenza Virus. *Science*, **94**, 22-23.
- Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G. and Webster, R.G. (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6108-6113.
- Holt, I., Mittal, S., Furling, D., Butler-Browne, G.S., Brook, J.D. and Morris, G.E. (2007) Defective mRNA in myotonic dystrophy accumulates at the periphery of nuclear splicing speckles. *Genes Cells*, **12**, 1035-1048.
- Hope, T.J. (1999) The ins and outs of HIV Rev. *Arch Biochem Biophys*, **365**, 186-191.
- Horvath, C.M., Williams, M.A. and Lamb, R.A. (1990) Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: identification of the influenza B virus BM2 polypeptide. *Embo J*, **9**, 2639-2647.
- Huang, S., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H. and Spector, D.L. (1994) In vivo analysis of the stability and transport of nuclear poly(A)⁺ RNA. *J Cell Biol*, **126**, 877-899.
- Huang, Y., Gattoni, R., Stevenin, J. and Steitz, J.A. (2003) SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol Cell*, **11**, 837-843.
- Huang, Y. and Steitz, J.A. (2001) Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol Cell*, **7**, 899-905.
- Huang, Y., Yario, T.A. and Steitz, J.A. (2004) A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9666-9670.
- Iglesias, N. and Stutz, F. (2008) Regulation of mRNP dynamics along the export pathway. *FEBS Lett*, **582**, 1987-1996.
- Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **147**, 258-267.

- Izaurrealde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W. and Gorlich, D. (1997) The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *Embo J*, **16**, 6535-6547.
- Jady, B.E., Richard, P., Bertrand, E. and Kiss, T. (2006) Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol Biol Cell*, **17**, 944-954.
- Johnson, C., Primorac, D., McKinstry, M., McNeil, J., Rowe, D. and Lawrence, J.B. (2000) Tracking COL1A1 RNA in osteogenesis imperfecta. splice-defective transcripts initiate transport from the gene but are retained within the SC35 domain. *J Cell Biol*, **150**, 417-432.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D. and Smith, A.E. (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, **39**, 499-509.
- Katahira, J., Strasser, K., Podtelejnikov, A., Mann, M., Jung, J.U. and Hurt, E. (1999) The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *Embo J*, **18**, 2593-2609.
- Kates, M., Allison, A.C., Tyrell, D.A. and James, A.T. (1962) Origin of lipids in influenza virus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **27**, 293-301.
- Kerr, I.M. and Brown, R.E. (1978) pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 256-260.
- Kido, H., Murakami, M., Oba, K., Chen, Y. and Towatari, T. (1999) Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses. *Mol Cells*, **9**, 235-244.
- Kim, K.I., Giannakopoulos, N.V., Virgin, H.W. and Zhang, D.E. (2004) Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation. *Mol Cell Biol*, **24**, 9592-9600.
- Kim, T., Kim, T.Y., Lee, W.G., Yim, J. and Kim, T.K. (2000) Signaling pathways to the assembly of an interferon-beta enhanceosome. Chemical genetic studies with a small molecule. *J Biol Chem*, **275**, 16910-16917.
- Kiss, A.M., Jady, B.E., Darzacq, X., Verheggen, C., Bertrand, E. and Kiss, T. (2002) A Cajal body-specific pseudouridylation guide RNA is composed of two box H/ACA snoRNA-like domains. *Nucleic Acids Res*, **30**, 4643-4649.
- Klenk, H.D. and Garten, W. (1994) Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol*, **2**, 39-43.
- Koffa, M.D., Clements, J.B., Izaurrealde, E., Wadd, S., Wilson, S.A., Mattaj, I.W. and Kuersten, S. (2001) Herpes simplex virus ICP27 protein provides viral mRNAs with access to the cellular mRNA export pathway. *Embo J*, **20**, 5769-5778.
- Kohler, A. and Hurt, E. (2007) Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 761-773.
- Kohler, M., Ansieau, S., Prehn, S., Leutz, A., Haller, H. and Hartmann, E. (1997) Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. *FEBS Lett*, **417**, 104-108.
- Kohler, M., Gorlich, D., Hartmann, E. and Franke, J. (2001) Adenoviral E1A protein nuclear import is preferentially mediated by importin alpha3 in vitro. *Virology*, **289**, 186-191.
- Kohler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F.R., Prehn, S., Haller, H., Gorlich, D. and Hartmann, E. (1999) Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Mol Cell Biol*, **19**, 7782-7791.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M. and Yanagawa, H. (2009) Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J Biol Chem*, **284**, 478-485.
- Krause, S., Fakan, S., Weis, K. and Wahle, E. (1994) Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. *Exp Cell Res*, **214**, 75-82.
- Kuo, R.L. and Krug, R.M. (2009) Influenza A virus polymerase is an integral component of the CPSF30-NS1A protein complex in infected cells. *J Virol*, **83**, 1611-1616.
- Kutay, U. and Panse, V.G. (2008) Gle1 does double duty. *Cell*, **134**, 564-566.
- Lai, C., Struckhoff, J.J., Schneider, J., Martinez-Sobrido, L., Wolff, T., Garcia-Sastre, A., Zhang, D.E. and Lenschow, D.J. (2009) Mice lacking the ISG15 E1 enzyme Ube1L demonstrate increased susceptibility to both mouse-adapted and non-mouse-adapted influenza B virus infection. *J Virol*, **83**, 1147-1151.
- Lamond, A.I. and Spector, D.L. (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 605-612.

- Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E. and Corbett, A.H. (2007) Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem*, **282**, 5101-5105.
- Le Hir, H. and Andersen, G.R. (2008) Structural insights into the exon junction complex. *Curr Opin Struct Biol*, **18**, 112-119.
- Lenschow, D.J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N.V., Lutz, A., Wolff, T., Osiak, A., Levine, B., Schmidt, R.E., Garcia-Sastre, A., Leib, D.A., Pekosz, A., Knobeloch, K.P., Horak, I. and Virgin, H.W.t. (2007) IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1371-1376.
- Li, Y., Wang, X., Zhang, X. and Goodrich, D.W. (2005) Human hHpr1/p84/Thoc1 regulates transcriptional elongation and physically links RNA polymerase II and RNA processing factors. *Mol Cell Biol*, **25**, 4023-4033.
- Li, Y., Yamakita, Y. and Krug, R.M. (1998) Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4864-4869.
- Lischka, P., Toth, Z., Thomas, M., Mueller, R. and Stamminger, T. (2006) The UL69 transactivator protein of human cytomegalovirus interacts with DEXD/H-Box RNA helicase UAP56 to promote cytoplasmic accumulation of unspliced RNA. *Mol Cell Biol*, **26**, 1631-1643.
- Loeb, K.R. and Haas, A.L. (1992) The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J Biol Chem*, **267**, 7806-7813.
- Lu, Y., Qian, X.Y. and Krug, R.M. (1994) The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev*, **8**, 1817-1828.
- Ludwig, S., Vogel, U. and Scholtissek, C. (1995) Amino acid replacements leading to temperature-sensitive defects of the NS1 protein of influenza A virus. *Arch Virol*, **140**, 945-950.
- Luna, R., Gaillard, H., Gonzalez-Aguilera, C. and Aguilera, A. (2008) Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus. *Chromosoma*, **117**, 319-331.
- Luo, G.X., Luytjes, W., Enami, M. and Palese, P. (1991) The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol*, **65**, 2861-2867.
- Luo, M.L., Zhou, Z., Magni, K., Christoforides, C., Rappsilber, J., Mann, M. and Reed, R. (2001) Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. *Nature*, **413**, 644-647.
- Ma, J. and Cao, X. (2006) Regulation of Stat3 nuclear import by importin alpha5 and importin alpha7 via two different functional sequence elements. *Cell Signal*, **18**, 1117-1126.
- Malakhov, M.P., Kim, K.I., Malakhova, O.A., Jacobs, B.S., Borden, E.C. and Zhang, D.E. (2003) High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *J Biol Chem*, **278**, 16608-16613.
- Malakhov, M.P., Malakhova, O.A., Kim, K.I., Ritchie, K.J. and Zhang, D.E. (2002) UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. *J Biol Chem*, **277**, 9976-9981.
- Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J.V. and Cullen, B.R. (1989) The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*, **338**, 254-257.
- Marion, R.M., Zurcher, T., de la Luna, S. and Ortin, J. (1997) Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *J Gen Virol*, **78 (Pt 10)**, 2447-2451.
- Maroto, M., Fernandez, Y., Ortin, J., Pelaez, F. and Cabello, M.A. (2008) Development of an HTS assay for the search of anti-influenza agents targeting the interaction of viral RNA with the NS1 protein. *J Biomol Screen*, **13**, 581-590.
- Masuda, S., Das, R., Cheng, H., Hurt, E., Dorman, N. and Reed, R. (2005) Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Dev*, **19**, 1512-1517.
- Matera, A.G. and Shpargel, K.B. (2006) Pumping RNA: nuclear bodybuilding along the RNP pipeline. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 317-324.
- Matlin, K.S., Reggio, H., Helenius, A. and Simons, K. (1981) Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J Cell Biol*, **91**, 601-613.
- Melen, K., Fagerlund, R., Franke, J., Kohler, M., Kinnunen, L. and Julkunen, I. (2003) Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J Biol Chem*, **278**, 28193-28200.

- Melen, K., Kinnunen, L., Fagerlund, R., Ikonen, N., Twu, K.Y., Krug, R.M. and Julkunen, I. (2007) Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *J Virol*, **81**, 5995-6006.
- Mibayashi, M., Martinez-Sobrido, L., Loo, Y.M., Cardenas, W.B., Gale, M., Jr. and Garcia-Sastre, A. (2007) Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol*, **81**, 514-524.
- Min, J.Y. and Krug, R.M. (2006) The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7100-7105.
- Min, J.Y., Li, S., Sen, G.C. and Krug, R.M. (2007) A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology*, **363**, 236-243.
- Mintz, P.J. and Spector, D.L. (2000) Compartmentalization of RNA processing factors within nuclear speckles. *J Struct Biol*, **129**, 241-251.
- Mould, J.A., Paterson, R.G., Takeda, M., Ohigashi, Y., Venkataraman, P., Lamb, R.A. and Pinto, L.H. (2003) Influenza B virus BM2 protein has ion channel activity that conducts protons across membranes. *Dev Cell*, **5**, 175-184.
- Narasimhan, J., Wang, M., Fu, Z., Klein, J.M., Haas, A.L. and Kim, J.J. (2005) Crystal structure of the interferon-induced ubiquitin-like protein ISG15. *J Biol Chem*, **280**, 27356-27365.
- Neumann, G., Brownlee, G.G., Fodor, E. and Kawaoka, Y. (2004) Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol*, **283**, 121-143.
- Neumann, G., Hughes, M.T. and Kawaoka, Y. (2000) Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *Embo J*, **19**, 6751-6758.
- Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D.R., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G. and Kawaoka, Y. (1999) Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9345-9350.
- Norton, G.P., Tanaka, T., Tobita, K., Nakada, S., Buonagurio, D.A., Greenspan, D., Krystal, M. and Palese, P. (1987) Infectious influenza A and B virus variants with long carboxyl terminal deletions in the NS1 polypeptides. *Virology*, **156**, 204-213.
- O'Keefe, R.T., Mayeda, A., Sadowski, C.L., Krainer, A.R. and Spector, D.L. (1994) Disruption of pre-mRNA splicing in vivo results in reorganization of splicing factors. *J Cell Biol*, **124**, 249-260.
- O'Neill, R.E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P. and Moroianu, J. (1995) Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem*, **270**, 22701-22704.
- Odagiri, T., Hong, J. and Ohara, Y. (1999) The BM2 protein of influenza B virus is synthesized in the late phase of infection and incorporated into virions as a subviral component. *J Gen Virol*, **80 (Pt 10)**, 2573-2581.
- Ogg, S.C. and Lamond, A.I. (2002) Cajal bodies and coilin--moving towards function. *J Cell Biol*, **159**, 17-21.
- O'Keefe, R.T., Mayeda, A., Sadowski, C.L., Krainer, A.R. and Spector, D.L. (1994) Disruption of pre-mRNA splicing in vivo results in reorganization of splicing factors. *J Cell Biol*, **124**, 249-260.
- O'Neill, R.E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P. and Moroianu, J. (1995) Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem*, **270**, 22701-22704.
- Opitz, B., Rejaibi, A., Dauber, B., Eckhard, J., Vinzing, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Suttorp, N. and Wolff, T. (2007) IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cell Microbiol*, **9**, 930-938.
- Palese, P. (1977) The genes of influenza virus. *Cell*, **10**, 1-10.
- Palese, P. and Shaw, M. (2007) *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. In Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fields - Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1647-1690.
- Palese, P., Tobita, K., Ueda, M. and Compans, R.W. (1974) Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology*, **61**, 397-410.
- Paterson, R.G., Takeda, M., Ohigashi, Y., Pinto, L.H. and Lamb, R.A. (2003) Influenza B virus BM2 protein is an oligomeric integral membrane protein expressed at the cell surface. *Virology*, **306**, 7-17.

- Pathak, V.K., Schindler, D. and Hershey, J.W. (1988) Generation of a mutant form of protein synthesis initiation factor eIF-2 lacking the site of phosphorylation by eIF-2 kinases. *Mol Cell Biol*, **8**, 993-995.
- Pemberton, L.F. and Paschal, B.M. (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*, **6**, 187-198.
- Phelan, A., Carmo-Fonseca, M., McLaughlan, J., Lamond, A.I. and Clements, J.B. (1993) A herpes simplex virus type 1 immediate-early gene product, IE63, regulates small nuclear ribonucleoprotein distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9056-9060.
- Pinto, L.H., Holsinger, L.J. and Lamb, R.A. (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, **69**, 517-528.
- Platanias, L.C. (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*, **5**, 375-386.
- Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U.R. and Ludwig, S. (2001) Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol*, **3**, 301-305.
- Portela, A. and Digard, P. (2002) The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol*, **83**, 723-734.
- Powers, M.A., Forbes, D.J., Dahlberg, J.E. and Lund, E. (1997) The vertebrate GLFG nucleoporin, Nup98, is an essential component of multiple RNA export pathways. *J Cell Biol*, **136**, 241-250.
- Qiu, Y. and Krug, R.M. (1994) The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J Virol*, **68**, 2425-2432.
- Qiu, Y., Nemeroff, M. and Krug, R.M. (1995) The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *Rna*, **1**, 304-316.
- Radu, A., Blobel, G. and Moore, M.S. (1995) Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1769-1773.
- Rebouillat, D. and Hovanessian, A.G. (1999) The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res*, **19**, 295-308.
- Reed, R. and Hurt, E. (2002) A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell*, **108**, 523-531.
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. and Dingwall, C. (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmic nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, **64**, 615-623.
- Sacco-Bubulya, P. and Spector, D.L. (2002) Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol*, **156**, 425-436.
- Sadler, A.J. and Williams, B.R. (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol*, **8**, 559-568.
- Saitoh, N., Spahr, C.S., Patterson, S.D., Bubulya, P., Neuwald, A.F. and Spector, D.L. (2004) Proteomic analysis of interchromatin granule clusters. *Mol Biol Cell*, **15**, 3876-3890.
- Salichs, E., Ledda, A., Mularoni, L., Alba, M.M. and de la Luna, S. (2009) Genome-wide analysis of histidine repeats reveals their role in the localization of human proteins to the nuclear speckles compartment. *PLoS Genet*, **5**, e1000397.
- Samuel, C.E. (1993) The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans. *J Biol Chem*, **268**, 7603-7606.
- Samuel, C.E. (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*, **14**, 778-809, table of contents.
- Sandri-Goldin, R.M. (2008) The many roles of the regulatory protein ICP27 during herpes simplex virus infection. *Front Biosci*, **13**, 5241-5256.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Satterly, N., Tsai, P.L., van Deursen, J., Nussenzweig, D.R., Wang, Y., Faria, P.A., Levay, A., Levy, D.E. and Fontoura, B.M. (2007) Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1853-1858.
- Schmidt, U., Richter, K., Berger, A.B. and Lichter, P. (2006) In vivo BiFC analysis of Y14 and NXF1 mRNA export complexes: preferential localization within and around SC35 domains. *J Cell Biol*, **172**, 373-381.
- Schneider, J., Dauber, B., Melen, K., Julkunen, I. and Wolff, T. (2009) Analysis of influenza B Virus NS1 protein trafficking reveals a novel interaction with nuclear speckle domains. *J Virol*, **83**, 701-711.

- Scholtissek, C., Rohde, W., Von Hoyningen, V. and Rott, R. (1978) On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology*, **87**, 13-20.
- Semler, B.L., Dorner, A.J. and Wimmer, E. (1984) Production of infectious poliovirus from cloned cDNA is dramatically increased by SV40 transcription and replication signals. *Nucleic Acids Res*, **12**, 5123-5141.
- Shaw, M.L., Cardenas, W.B., Zamarin, D., Palese, P. and Basler, C.F. (2005) Nuclear localization of the Nipah virus W protein allows for inhibition of both virus- and toll-like receptor 3-triggered signaling pathways. *J Virol*, **79**, 6078-6088.
- Shaw, M.W., Choppin, P.W. and Lamb, R.A. (1983) A previously unrecognized influenza B virus glycoprotein from a bicistronic mRNA that also encodes the viral neuraminidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 4879-4883.
- Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, **69**, 531-569.
- Sleeman, J., Lyon, C.E., Platani, M., Kreivi, J.P. and Lamond, A.I. (1998) Dynamic interactions between splicing snRNPs, coiled bodies and nucleoli revealed using snRNP protein fusions to the green fluorescent protein. *Exp Cell Res*, **243**, 290-304.
- Smith, G.L., Levin, J.Z., Palese, P. and Moss, B. (1987) Synthesis and cellular location of the ten influenza polypeptides individually expressed by recombinant vaccinia viruses. *Virology*, **160**, 336-345.
- Smith, K.P., Byron, M., Johnson, C., Xing, Y. and Lawrence, J.B. (2007) Defining early steps in mRNA transport: mutant mRNA in myotonic dystrophy type I is blocked at entry into SC-35 domains. *J Cell Biol*, **178**, 951-964.
- Sorg, G. and Stamminger, T. (1999) Mapping of nuclear localization signals by simultaneous fusion to green fluorescent protein and to beta-galactosidase. *Biotechniques*, **26**, 858-862.
- Spector, D.L. (2001) Nuclear domains. *J Cell Sci*, **114**, 2891-2893.
- Spector, D.L., Fu, X.D. and Maniatis, T. (1991) Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *Embo J*, **10**, 3467-3481.
- Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C. and Weis, K. (1997) Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell*, **90**, 1041-1050.
- Steel, J., Lowen, A.C., Pena, L., Angel, M., Solorzano, A., Albrecht, R., Perez, D.R., Garcia-Sastre, A. and Palese, P. (2009) Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *J Virol*, **83**, 1742-1753.
- Steinhauer, D.A., Wharton, S.A., Skehel, J.J., Wiley, D.C. and Hay, A.J. (1991) Amantadine selection of a mutant influenza virus containing an acid-stable hemagglutinin glycoprotein: evidence for virus-specific regulation of the pH of glycoprotein transport vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 11525-11529.
- Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H.D. and Garten, W. (1992) Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *Embo J*, **11**, 2407-2414.
- Stow, N.D. (1981) Cloning of a DNA fragment from the left-hand terminus of the adenovirus type 2 genome and its use in site-directed mutagenesis. *J Virol*, **37**, 171-180.
- Strom, A.C. and Weis, K. (2001) Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol*, **2**, REVIEWS3008.
- Sugrue, R.J. and Hay, A.J. (1991) Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology*, **180**, 617-624.
- Talon, J., Horvath, C.M., Polley, R., Basler, C.F., Muster, T., Palese, P. and Garcia-Sastre, A. (2000a) Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol*, **74**, 7989-7996.
- Talon, J., Salvatore, M., O'Neill, R.E., Nakaya, Y., Zheng, H., Muster, T., Garcia-Sastre, A. and Palese, P. (2000b) Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: A vaccine approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4309-4314.
- Taniguchi, I. and Ohno, M. (2008) ATP-dependent recruitment of export factor Aly/REF onto intronless mRNAs by RNA helicase UAP56. *Mol Cell Biol*, **28**, 601-608.
- Taylor, S.L., Frias-Staheli, N., Garcia-Sastre, A. and Schmaljohn, C.S. (2009) Hantaan virus nucleocapsid protein binds to importin alpha proteins and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced activation of nuclear factor kappa B. *J Virol*, **83**, 1271-1279.

- Tiley, L.S., Hagen, M., Matthews, J.T. and Krystal, M. (1994) Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs. *J Virol*, **68**, 5108-5116.
- Tomlinson, R.L., Ziegler, T.D., Supakorndej, T., Terns, R.M. and Terns, M.P. (2006) Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell*, **17**, 955-965.
- Toth, Z., Lischka, P. and Stamminger, T. (2006) RNA-binding of the human cytomegalovirus transactivator protein UL69, mediated by arginine-rich motifs, is not required for nuclear export of unspliced RNA. *Nucleic Acids Res*, **34**, 1237-1249.
- Toth, Z. and Stamminger, T. (2008) The human cytomegalovirus regulatory protein UL69 and its effect on mRNA export. *Front Biosci*, **13**, 2939-2949.
- Verheggen, C., Lafontaine, D.L., Samarsky, D., Mouaikel, J., Blanchard, J.M., Bordonne, R. and Bertrand, E. (2002) Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. *Embo J*, **21**, 2736-2745.
- Vreede, F.T., Jung, T.E. and Brownlee, G.G. (2004) Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol*, **78**, 9568-9572.
- Wagner, S., Chiosea, S. and Nickerson, J.A. (2003) The spatial targeting and nuclear matrix binding domains of SRm160. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3269-3274.
- Wang, W., Cui, Z.Q., Han, H., Zhang, Z.P., Wei, H.P., Zhou, Y.F., Chen, Z. and Zhang, X.E. (2008) Imaging and characterizing influenza A virus mRNA transport in living cells. *Nucleic Acids Res*, **36**, 4913-4928.
- Wang, W. and Krug, R.M. (1996) The RNA-binding and effector domains of the viral NS1 protein are conserved to different extents among influenza A and B viruses. *Virology*, **223**, 41-50.
- Wang, W., Riedel, K., Lynch, P., Chien, C.Y., Montelione, G.T. and Krug, R.M. (1999) RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *Rna*, **5**, 195-205.
- Watanabe, K., Takizawa, N., Katoh, M., Hoshida, K., Kobayashi, N. and Nagata, K. (2001) Inhibition of nuclear export of ribonucleoprotein complexes of influenza virus by leptomycin B. *Virus Res*, **77**, 31-42.
- Weis, K., Mattaj, I.W. and Lamond, A.I. (1995) Identification of hSRP1 alpha as a functional receptor for nuclear localization sequences. *Science*, **268**, 1049-1053.
- Williams, B.J., Boyne, J.R., Goodwin, D.J., Roaden, L., Hautbergue, G.M., Wilson, S.A. and Whitehouse, A. (2005) The prototype gamma-2 herpesvirus nucleocytoplasmic shuttling protein, ORF 57, transports viral RNA through the cellular mRNA export pathway. *Biochem J*, **387**, 295-308.
- Wolff, T., O'Neill, R.E. and Palese, P. (1998) NS1-Binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. *J Virol*, **72**, 7170-7180.
- Wolff, T., Snacken R. (2003) Influenza: The virus, the disease, and its control. In Rüsamen-Waigmann, H., Deres, K., Hewlett, G., Welker, R. (ed.). Marcel Dekker, Inc., pp. 39-90.
- Wolff, T., Ziebeck, F., Abt, M., Voss, D., Semmler, I. and Matthaei, M. (2008) Sabotage of antiviral signaling and effectors by influenza viruses. *Biol Chem*, **389**, 1299-1305.
- Wong, J.J., Pung, Y.F., Sze, N.S. and Chin, K.C. (2006) HERC5 is an IFN-induced HECT-type E3 protein ligase that mediates type I IFN-induced ISGylation of protein targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10735-10740.
- Wressnigg, N., Voss, D., Wolff, T., Romanova, J., Ruthsatz, T., Mayerhofer, I., Reiter, M., Nakowitsch, S., Humer, J., Morokutti, A., Muster, T., Egorov, A. and Kittel, C. (2009) Development of a live-attenuated influenza B DeltaNS1 intranasal vaccine candidate. *Vaccine*, **27**, 2851-2857.
- Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T. and Ishihama, A. (1993) Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology*, **196**, 249-255.
- Yeakley, J.M., Tronchere, H., Olesen, J., Dyck, J.A., Wang, H.Y. and Fu, X.D. (1999) Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *J Cell Biol*, **145**, 447-455.
- Yin, C., Khan, J.A., Swapna, G.V., Ertekin, A., Krug, R.M., Tong, L. and Montelione, G.T. (2007) Conserved surface features form the double-stranded RNA binding site of non-structural protein 1 (NS1) from influenza A and B viruses. *J Biol Chem*, **282**, 20584-20592.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. and Fujita, T. (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*, **5**, 730-737.

- Yuan, W., Aramini, J.M., Montelione, G.T. and Krug, R.M. (2002) Structural basis for ubiquitin-like ISG15 protein binding to the NS1 protein of influenza B virus: a protein-protein interaction function that is not shared by the corresponding N-terminal domain of the NS1 protein of influenza A virus. *Virology*, **304**, 291-301.
- Yuan, W. and Krug, R.M. (2001) Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *Embo J*, **20**, 362-371.
- Zeng, C., Kim, E., Warren, S.L. and Berget, S.M. (1997) Dynamic relocation of transcription and splicing factors dependent upon transcriptional activity. *Embo J*, **16**, 1401-1412.
- Zhao, C., Beaudenon, S.L., Kelley, M.L., Waddell, M.B., Yuan, W., Schulman, B.A., Huibregtse, J.M. and Krug, R.M. (2004) The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7578-7582.
- Zhao, C., Denison, C., Huibregtse, J.M., Gygi, S. and Krug, R.M. (2005) Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10200-10205.
- Zhou, Z., Luo, M.J., Straesser, K., Katahira, J., Hurt, E. and Reed, R. (2000) The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature*, **407**, 401-405.
- Zou, W. and Zhang, D.E. (2006) The interferon-inducible ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3) EFP also functions as an ISG15 E3 ligase. *J Biol Chem*, **281**, 3989-3994.
-

Auszeichnungen und Veröffentlichungen

Auszeichnungen

ESWI Travel Fund; 2008; Funding of all costs for the attendance of the Fourth Orthomyxovirus Research Conference; Woods Hole, MA, USA

ESWI Young Scientists Award 2007; Invitation to the Third European Influenza Conference; Vilamoura, Portugal; September 2008

Publikationen

Bianca Dauber, Luis Martínez-Sorbido, Jana Schneider, Rong Hai, Zoe Waibler, Ulrich Kalinke, Adolfo García-Sastre, and Thorsten Wolff. Influenza B Virus Ribonucleoprotein is a potent activator of the antiviral kinase PKR. PLOS Pathogens, accepted.

Jana Schneider, Thorsten Wolff. Nuclear functions of the influenza A and B viruses NS1 proteins: Do they play a role in viral mRNA export? Vaccine; accepted.

Schneider J, Dauber B, Melén K, Julkunen I, Wolff T. Analysis of influenza B Virus NS1 protein trafficking reveals a novel interaction with nuclear speckle domains. J. Virol., 2009 Jan; 83(2): 701-711

Lai C, Struckhoff JJ, Schneider J, Martinez-Sobrido L, Wolff T, García-Sastre A, Zhang DE, Lenschow DJ. Mice lacking the ISG15 E1 enzyme UBE1L demonstrate increased susceptibility to both mouse-adapted and non-mouse-adapted influenza B virus infection. J. Virol., 2009 Jan; 83(2):1147-51.

Dauber B., Schneider J, Wolff T. Double-stranded RNA binding of influenza B virus nonstructural NS1 protein inhibits protein kinase R but is not essential to antagonize production of alpha/beta interferon. J. Virol. 2006 Dec; 80(23): 11667-77

Vorträge

Schneider J, Dauber B., Wolff T.; The nonstructural NS1 protein of influenza B virus interacts with nuclear speckle domains. Third European Influenza Conference; Vilamoura, Portugal; September 2008

Schneider J, Dauber B., Wolff T.; Trafficking of the nonstructural NS1 protein of influenza B virus. Fourth Orthomyxovirus Research Conference; Woods Hole, MA, USA; September, 2007

Schneider J., Dauber B., Standke A., Wolff T.; Influenza B virus targets nuclear speckle domains. Third European Congress of Virology; Nürnberg; September 2007

Schneider J, Dauber B., Standke A., Wolff T.; Interaction of the non-structural NS1 protein of influenza B virus with intranuclear speckle domains. Virologisches Seminar; Robert Koch-Institut Berlin; Juni 2007

Schneider J, Dauber B., Wolff T.; The influenza B virus NS1 protein accumulates in and disintegrates intranuclear SC35 speckle domains. Fourth workshop study section cell biology of the German Society for Virology; Deidesheim; September 2005

Poster Präsentationen

Schneider J., Dauber B., Wolff T.; The influenza B virus NS1 protein accumulates in and disintegrates intranuclear speckle domains containing the splicing factor SC35. Annual Meeting of the German Society for Virology; Hannover; 2005

Schneider J., Dauber B., Wolff T.; Identification of basic amino acids in the influenza B virus NS1 protein required for nuclear localization and dimer formation. Annual Meeting of the German Society for Virology; Munich; March 2006

Schneider J., Dauber B., Wolff T.; Analysis of the nuclear trafficking of the influenza B virus NS1 protein. Young Investigator Meeting of the Center of Infection Biology and Immunity; Würzburg; March 2007

Mein herzlicher Dank geht an:

Herrn Priv.-Doz. Dr. Thorsten Wolff, der mir sein Vertrauen geschenkt hat, aus diesem Forschungsthema etwas Besonderes zu machen. Ich danke Dir für Deine stete Unterstützung sowie die fachlich interessanten und motivierenden Diskussionen. Ich habe vieles von Dir lernen können und hoffe, dass am Ende doch noch ein halbwegs annehmbarer Virologe, bestimmt aber ein guter Zellbiologe aus mir geworden ist.

Herrn Professor Mutzel für seine kurzfristige Bereitschaft, diese Arbeit von Seiten der Freien Universität in Berlin zu betreuen.

Illka Julkunen und Krister Mélen für die GST-Importin-Bindungsexperimente, die sehr interessante und aufschlussreiche Ergebnisse brachten.

Die Arbeitsgruppe P15...den „jetzigen“ wie den „ehemaligen“: Aline, Anne, Viola, Daniel, Markus, Florian, Melanie, Marion, Ilia, Karsten...für ein entspanntes Arbeitsklima und Euer Verständnis, wenn es mal nicht so gut lief. Mein besonderer Dank geht an Andrea und Gudrun...weil ihr immer für mich da wart und mich über die Arbeit hinweg unterstützt habt.

Die Korrekturleser Guni, Bianca und Nadine...für Eure Ausdauer und die Bereitschaft, hundert Seiten spannender Forschungsergebnisse dem Spielen mit Kalle, dem Packen von Umzugskartons und dem alltäglichen Wahnsinn auf Arbeit vorzuziehen! Katta für Deine stilsichere Beratung in Sachen Layout.

Guni und Bianca für Eure Freundschaft und den fachlichen Rat über unsere gemeinsame Laborzeit hinweg. Ich habe viel von Euch gelernt und bin für die Zeit mit Euch in Berlin sehr dankbar.

Katta, Nadine, Seve und Anja für Eure tiefe und treue Freundschaft.

Meine Familie für Eure grenzenlose Unterstützung.

Meine Mutti und Sascha...ihr habt immer an mich geglaubt und seid mit mir durch die Höhen und Tiefen gegangen. Ich bin, weil ihr seid.

Stephan...für alles und noch so vieles mehr!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel:

„Charakterisierung nuklearer Funktionen des Nichtstrukturproteins von Influenza B Virus“
selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die Arbeit wurde bisher noch nicht anderweitig als Dissertation eingereicht oder veröffentlicht.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden im *Journal of Virology* (Schneider *et al.*, 2009) veröffentlicht.

Berlin, den 28.05.2009

Jana Schneider
