

Charakterisierung einer potentiellen Rolle des Nicht-
Strukturproteins (NS) 1 der Influenza A Viren im viralen mRNA
Export

**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

Dipl. Biol. Melanie Franz

aus Berlin

Januar 2012

Angefertigt von Februar 2008 bis Oktober 2011 unter der Leitung von PD Dr.
Thorsten Wolff am Robert Koch-Institut in Berlin

1. Gutachter: Prof. Rupert Mutzel

2. Gutachter: PD Dr. Thorsten Wolff

Disputation am 26.03.2012

Gewidmet: Brigitte und Peter Franz

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Influenza Viren	10
1.1.1	Taxonomie	10
1.1.2	Virion	11
1.1.3	Genomorganisation	13
1.1.4	Virale Proteine	15
1.1.5	Replikation	23
1.2	Der Nukleus	26
1.2.1	Organisation des Zellkerns	26
1.2.2	Nuklearer mRNA Export	28
1.2.3	SF2/ASF	32
1.2.4	Aly	34
1.2.5	Viren und mRNA Export	34
1.3	Fragestellung	36
2	Material & Methoden	38
2.1	Material	38
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	38
2.1.2	Bakterienstämme	41
2.1.3	Zelllinien	41
2.1.4	Virusstämme	41
2.1.5	Medien für Bakterien	41
2.1.6	Medien für Zellkultur	42
2.1.7	Restriktionsendonukleasen	43
2.1.8	Enzyme	44
2.1.9	Kits	44
2.1.10	Oligonukleotide	44
2.1.11	Plasmide	46
2.1.12	siRNA	48
2.1.13	Antikörper	48
2.1.14	Puffer und Lösungen	49
2.1.15	Radiochemikalien	52
2.1.16	Geräte	52
2.1.17	Software	53
2.2	Methoden	54
2.2.1	Zellkultur	54
2.2.1.1	Passagieren von Zellen	54
2.2.1.2	Einfrieren von Zellen	54
2.2.1.3	Transfektion von eukaryotischen Zellen	54
2.2.1.4	Infektion von eukaryotischen Zellen	55

2.2.2	Arbeiten mit Influenza A Viren	56
2.2.2.1	Virusanzucht im Hühnerei	56
2.2.2.2	Hämagglutinationstest (HA-Test)	56
2.2.2.3	Plaqueassay zur Titerbestimmung von Influenza A Viren	57
2.2.2.4	Isolierung viraler RNA	57
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	58
2.2.3.1	Reverse Transkription	58
2.2.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	60
2.2.3.3	Restriktionsverdau	61
2.2.3.4	Reinigung und Aufkonzentrierung von PCR-Fragmenten	61
2.2.3.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	61
2.2.3.6	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	61
2.2.3.7	Ligation von DNA-Fragmenten	62
2.2.3.8	Transformation kompetenter <i>E.coli</i>	62
2.2.3.9	Plasmidpräparation	62
2.2.3.10	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	63
2.2.3.11	DNA-Sequenzierung nach Sanger	63
2.2.3.12	Herstellung der pEYN, pEYC und pEYFP Plasmide zur Durchführung des BiFC Assays	65
2.2.3.13	Herstellung der pGex Plasmide für die Expression von GST-Fusionsproteinen	65
2.2.3.14	Isolierung von RNA durch Phenol-Chloroform Extraktion und Ethanolfällung	65
2.2.4	Zellbiologische Methoden	66
2.2.4.1	Analyse der Virusreplikation auf Zellkultur	66
2.2.4.2	Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation (BiFC)	66
2.2.4.3	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	66
2.2.4.4	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)	67
2.2.4.5	Luziferase-Reportergen-Test	67
2.2.4.6	Zytotoxizitäts-Test (MTT Test)	68
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden	69
2.2.5.1	Herstellung von Zelllysaten	69
2.2.5.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	69
2.2.5.3	Immunoblot	70
2.2.5.4	Fixieren und Trocknen von SDS-PAA Gelen	70
2.2.5.5	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	71
2.2.5.6	<i>In vitro</i> Translation	71
2.2.5.7	GST-Kopräzipitationsassay	72
2.2.5.8	Ko-Immunpräzipitation	73
2.2.5.9	RNA-Immunpräzipitation	73
2.2.5.10	Fraktionierung	74

3	Ergebnisse	77
3.1	Etablierung eines bimolekularen Fluoreszenz Komplementations Assays zur Untersuchung von Interaktionen des viralen NS1 Proteins mit zellulären Faktoren	77
3.1.1	Kontrolle der Fusionskonstrukte und Überprüfung des BiFC Assays	78
3.2	Identifizierung und Charakterisierung von neuen Interaktionspartnern von NS1	84
3.2.1	BiFC Assays	84
3.2.2	Die zellulären mRNA Exportfaktoren Aly und SF2/ASF interagieren im BiFC Assay mit NS1	85
3.2.3	Die Interaktionen zwischen NS1 und den Exportfaktoren Aly und SF2/ASF sind RNA-abhängig	87
3.2.4	Die Interaktion von NS1 mit Exportfaktoren beruht auf direkter Protein-Protein Interaktion	91
3.2.5	Der N-Terminus von NS1 ist essentiell und notwendig für die Interaktion mit SF2/ASF und Aly	93
3.2.6	SF2/ASF und Aly kopräzipitieren mit viralem NS1 Protein aus infizierten Zellen	94
3.3	Charakterisierung der Bindungsdomänen von SF2/ASF und Aly für NS1	95
3.3.1	Die RS Domäne des SF2/ASF ist nicht an einer Interaktion mit NS1 beteiligt	96
3.3.2	Charakterisierung der Interaktion von Aly und NS1	99
3.3.3	Aly Δ RGG1 interagiert mit dem viralen NS1 Protein	101
3.3.4	Der Carboxyterminus von Aly ist für eine Interaktion mit NS1 notwendig	104
3.4	Assoziation von viraler mRNA mit SF2/ASF	106
3.4.1	NS1 präzipitiert virale mRNAs	107
3.4.2	SF2/ASF präzipitiert virale mRNAs	108
3.5	SF2/ASF stimuliert die Expression viraler Transkripte	109
3.6	Verteilung viraler mRNA	111
3.6.1	HA, NA und M1 mRNA werden durch SF2/ASF und NS1 vermehrt exportiert	112
3.7	Analyse der Replikationseffizienz von Influenza A/WSN nach siRNA Behandlung	114
3.7.1	Knock-down durch SF2/ASF- und Aly-spezifische siRNAs hat keine zytotoxischen Effekte	114
3.7.2	Exportfaktor Aly hat einen signifikanten Einfluss auf die Replikationseffizienz von Influenza A Viren	115
3.8	YN-NS1 und YC-NS1 exprimierende Viren	119
3.8.1	Konstruktion der rekombinanten Viren	119
3.8.2	Charakterisierung der Expression von YN-NS1 und YC-NS1 Fusionsproteinen	120
3.8.3	Analyse der rekombinanten YN-NS1 und YC-NS1 Viren im BiFC Assay	122
3.8.4	SF2/ASF und Aly interagieren mit viralen NS1-YFP Fusionsproteinen	123
4	Diskussion	127
4.1	Übersicht der Ziele der Arbeit	127
4.2	Charakterisierung der Interaktion von NS1 mit den Exportfaktoren SF2/ASF und Aly	128
4.3	Stimulierender Effekt von NS1 und SF2/ASF auf den viralen mRNA Export	134

4.4	Aly beeinflusst die effiziente Replikation von Influenza A Viren	135
4.5	Rekombinante Influenza A Viren	137
4.6	Nuklearer Export der mRNA von Influenza A Viren – ein Modell	138
4.7	Ausblick	142
5	Zusammenfassung	145
6	Summary	146
7	Abkürzungsverzeichnis	147
8	Literaturverzeichnis	152
9	Anhang	169

1 Einleitung

Als Viren (lat. *virus* = Gift, Saft, Schleim) bezeichnet man infektiöse Partikel, die sich nur innerhalb einer Wirtszelle (intrazellulär) vermehren können. Viren besitzen keinen eigenen Metabolismus und sind daher auf unterschiedliche Wirtsfunktionen angewiesen. Viruspartikel (Virionen) bestehen aus Proteinen und Nukleinsäuren, bei einigen Viren sind die Virionen zusätzlich von einer Lipidmembran umgeben. In den Virionen ist das virale Genom enthalten. Es kann aus DNA oder RNA, einzelsträngig, doppelsträngig, linear, ringförmig oder segmentiert vorkommen. Einzelsträngige Genome können zudem in unterschiedlichen Polaritäten auftreten.

1.1 Influenza Viren

Influenza Viren sind die Verursacher der echten Virus-Grippe, einer akuten respiratorischen Erkrankung. Die Übertragung erfolgt durch Aerosole (Wright und Webster 2007), hierbei können Personen jeden Alters infiziert werden. Influenza Viren verursachen jährliche Epidemien, die ihren Höhepunkt in den Wintermonaten haben, und auch weltweit auftretende Pandemien. Die Viren spielen daher eine große Rolle als Krankheitserreger. Zu den bisher dokumentierten Pandemien zählt man die „Spanische Grippe“ (1918-1920), die „Asiatische Grippe“ (1957), die „Hongkong Grippe“ (1968) und die „H1N1-2009 Grippe“. Mit Ausnahme der H1N1-2009 Pandemie, die relativ milde Infektionen verursachte, forderten die zuvor dokumentierten Pandemien Millionen Todesopfer. In der Saison 2010/2011 zirkulierten in Europa vor allem Influenza A (H1N1) 2009 Viren und zu einem geringeren Bestandteil Influenza B Viren (Abb. 1.1). Kaum detektiert wurden Influenza A (H3N2). In der ersten postpandemischen Saison gingen in Deutschland im 1. Quartal 43.000 Influenzameldungen ein, 15% dieser Fälle mussten im Krankenhaus versorgt werden (Robert Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin; 9.Mai.2011; Nr. 18).

1.1.1 Taxonomie

Das Influenza Virus gehört zu der Familie der *Orthomyxoviridae* (griech.: orthos = richtig, myxo = Schleim). Diese Familie umfasst neben den Influenza A, B und C Viren auch das Thogotovirus und das Isavirus. Während Influenza A Viren ein weites Wirtsspektrum infizieren, wozu neben Menschen sowohl weitere Säuger, wie Schweine, Pferde, Seehunde als auch freilebende und auch domestizierte Vögel zählen, ist das Wirtsspektrum der Influenza B und C Viren eingeschränkt. So infizieren Influenza B Viren neben Menschen vermutlich noch Seehunde. Influenza C Viren können Menschen und Schweine infizieren, spielen aber epidemiologisch eine untergeordnete Rolle, weil sie keine schweren Erkrankungen verursachen.

**Distribution of virus subtypes by influenza transmission zone
October 2010 – April 2011**

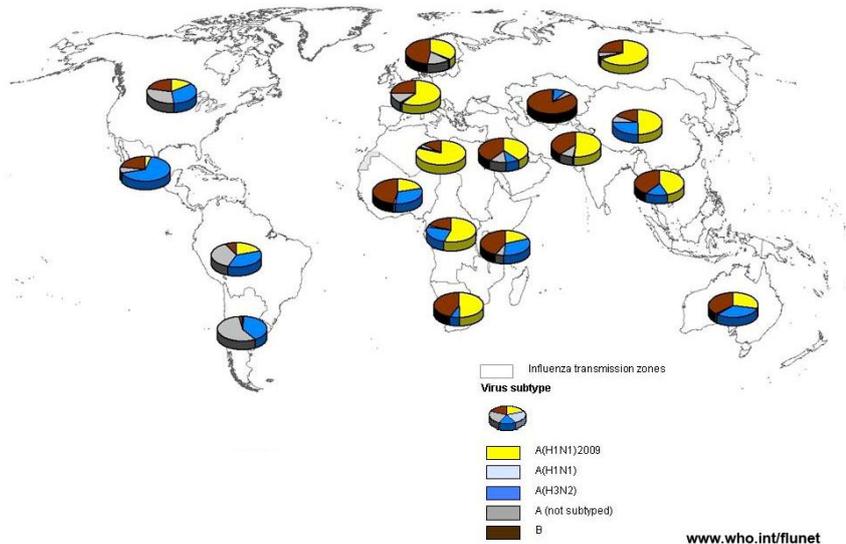


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Verteilung von Influenza Virus Subtypen in der Saison 2010-2011. Die Graphik ist eine Zusammenstellung von Daten aus Publikationen der Gesundheitsministerien der jeweiligen Länder und wurden durch das FluNet ausgewertet und zusammengestellt (WHO Weekly Epidemiological Record [WER] 27 May 2011, vol. 86, pp 221-232).

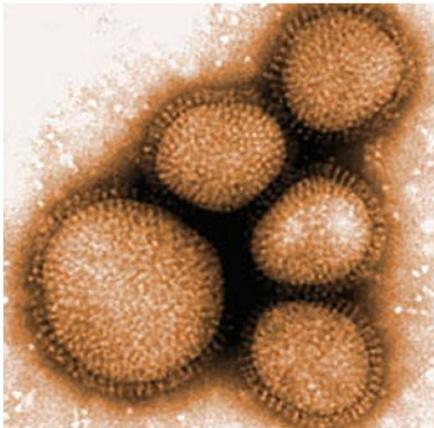
Die drei Genera der Influenza Viren werden durch die antigenen Eigenschaften des Nukleoproteins und des Matrixproteins unterschieden (Palese und Young 1982). Influenza A Viren werden weiterhin aufgrund der antigenen Eigenschaften der beiden Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase in Subtypen eingeteilt. Bisher sind 16 verschiedene Hämagglutinine (H1 bis H16) und 9 verschiedene Neuraminidasen (N1 bis N9) bekannt. Die Benennung der Viren erfolgt nach einem von der WHO im Jahr 1980 festgelegten Schema. Der Angabe des Virustyps (A, B oder C) folgt die Spezies, aus der das Virus isoliert wurde, der Ort der Erstisolierung, die Nummer des Isolats, das Isolationsjahr und bei Influenza A Viren die Angabe des Subtyps. Bsp: Influenza A/chicken/Hongkong/258/97 (H5N1); bei humanen Influenzaviren entfällt die Angabe der Spezies.

1.1.2 Virion

Influenza A Virus Partikel sind membranumhüllt und besitzen eine pleomorphe Gestalt. Meist sind die Partikel sphärisch und besitzen einen Durchmesser von 100 nm (Abb. 1.2 A), klinische Isolate enthalten jedoch häufig auch filamentöse Partikel (CHOPPIN, MURPHY, und TAMM 1960). Das virale Genom ist segmentiert und besteht aus einzelsträngiger RNA in Negativstrang-Orientierung (Lamb und Choppin 1983; P. Palese und Shaw 2007). Am 3'- und 5'-Ende jedes viralen Segments befindet sich eine nicht kodierende Sequenz (non coding region). Diese Regionen sind zum Teil komplementär zueinander und bilden den viralen Promoter (Desselberger u. a. 1980). Die acht genomischen Segmente kodieren für bis zu 11

virale Proteine - PB1, PB2, PA, NP, HA, NA, M1, M2, NS1, NEP/NS2 und PB1-F2 (Palese und Shaw 2007). Es gibt Hinweise für ein zwölftes Protein, N40, welches eine verkürzte Version des PB1 ist (Wise u. a. 2009). Die Funktion dieses Proteins ist aber bisher nicht verstanden. In der von der Wirtszelle abgeleiteten Hüllmembran (KATES u. a. 1962) sind die beiden Glykoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase eingebettet. Das Hämagglutinin bildet Homotrimere und vermittelt die Rezeptorbindung und Fusion, die Neuraminidase bildet Homotetramere und ist verantwortlich für die Abspaltung endständiger N-Acetyl-Neuraminsäuren. Zusätzlich eingebaut in die Membranhülle ist das M2 Protein, welches einen Ionenkanal formt (Lamb, Zebedee, und Richardson 1985; Pinto, Holsinger, und Lamb 1992; Sugrue und Hay 1991). Die Innenseite der Membran ist mit einer Schicht aus M1 Proteinen ausgekleidet, welche zusätzlich mit den acht viralen Ribonukleoproteinkomplexen (vRNPs) assoziiert sind. Die vRNPs bestehen aus den acht viralen RNA-Segmenten, welche über die gesamte Länge mit dem Nukleoprotein komplexiert sind und einen Polymerasekomplex tragen. Der virale Polymerasekomplex besteht aus PB1, PB2 und PA (Baudin u. a. 1994; Compans, Content, und Duesberg 1972; Martín-Benito u. a. 2001). In sehr geringer Kopienzahl kann auch das NS2/NEP in viralen Partikeln gefunden werden (J. C. Richardson und Akkina 1991; Yasuda u. a. 1993). NS1 und PB1-F2 werden hingegen nicht in neu entstehende Virione verpackt, sondern sind nur in infizierten Zellen zu detektieren (Abb. 1.2 B).

A



B

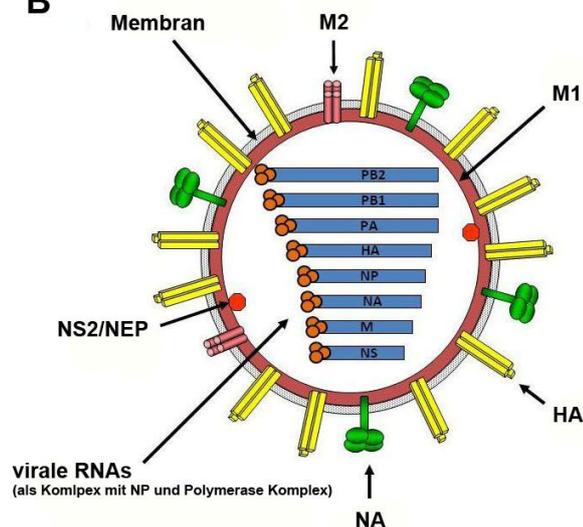


Abb. 1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme und schematisches Diagramm eines Influenza A Virus Partikels. A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines gefärbten Influenza A Virus Partikels (Durchmesser ~100nm). Auf der Oberfläche sind die HA und NA Spikes deutlich zu sehen. (http://www.rsc.org/images/b517734k-250_tcm18-52931.jpg) B) Das Hämagglutinin (HA), die Neuraminidase (NA) und das M2 Protein sind in die Membran des Virions eingebaut. HA formt trimere Komplexe, NA und M2 formen Tetramere. Das Matrix (M1) Protein kleidet die Innenseite der Lipidmembran aus. Das nukleare Exportprotein NS2/NEP ist ebenfalls im Virion enthalten. Die viralen RNA Segmente sind mit Nukleoproteinen (NP) bedeckt und tragen assoziiert den viralen Polymerasekomplex (basierend auf Fields Virology, 5th Edition, Chapter of *Orthomyxoviridae*, Palese und Shaw).

1.1.3 Genomorganisation

Das virale Genom der Influenza A Viren besteht aus 8 einzelsträngigen RNA Segmenten mit einer Länge von 0,9 – 2,4 kb. Das Gesamtgenom hat eine Länge von ungefähr 13,6 kb. Die virale RNA (vRNA) liegt nach Konvention in negativer Orientierung vor, da von ihr positiv orientierte Boten-RNA (messenger RNA, mRNA) transkribiert wird. Die kodierenden Segmente werden von segmentspezifischen nichtkodierenden Bereichen (non-coding region [NCR]) flankiert. Die ersten 13 Nukleotide am 5´-Ende und die ersten 12 Nukleotide am 3´-Ende bilden die virale NCRs, die zwischen den Virusstämmen hochkonserviert sind (Desselberger u. a. 1980) (Abb. 1.3).

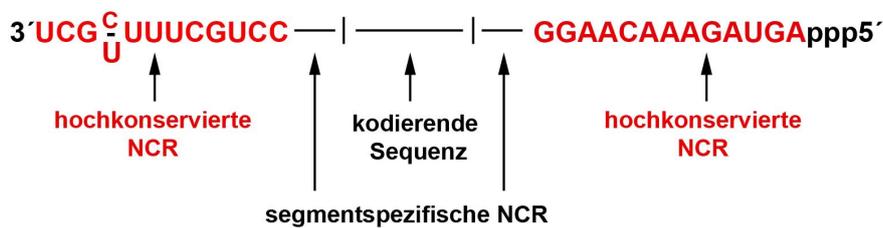
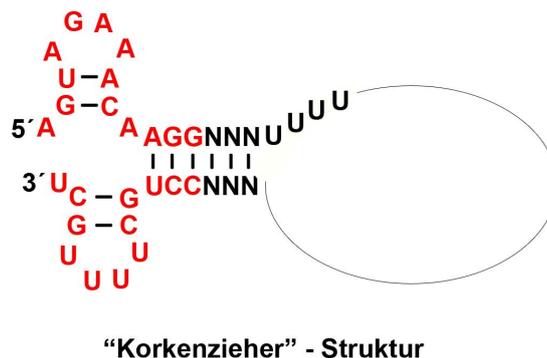


Abb. 1.3: Promoterregion der vRNA Segmente. Die terminalen 12 und 13 Nukleotide der nichtkodierenden Bereiche (NCR) der vRNA sind hochkonserviert und dienen als virale Promotoren.

Segmentspezifische NCRs können in ihrer Länge von 8 bis 45 Nukleotiden variieren. Notwendig für die Transkription und Replikation durch den RNA-abhängigen viralen RNA-Polymerasekomplex ist die Ausbildung von virus-spezifischen Promotorstrukturen durch die terminalen Regionen der vRNA Segmente (Flick u. a. 1996).



„Korkenzieher“ - Struktur

Abb. 1.4: Schematische Darstellung der für den RNA-Promotor postulierten „Korkenzieher“-Struktur. Die zueinander komplementären Basen des 5´- und 3´-Endes bilden einen Doppelstrang aus (modifiziert nach Fields Virology, 5th Edition, Chapter on *Orthomyxoviridae*, Wright und Webster).

Die Bereiche der 5´- und 3´-Enden sind teilweise komplementär, somit kann es nach dem „Korkenzieher“-Modell zu Basenpaarungen zwischen den vRNA-Termini und der Bildung von

Haarnadelstreifen innerhalb der vRNA Termini kommen (Abb. 1.4). Diese „Korkenzieher“-Struktur ist maßgebend für die Aktivität des viralen Promotors, denn es stabilisiert die Interaktion zwischen Promotor und Polymerasekomplex und ermöglicht auf diese Weise die Bildung von vRNA und mRNA. Dasselbe Modell gilt ebenfalls für die Enden der cRNA (copy RNA), die während der Replikation entsteht (Neumann u. a. 2004). Eine Auflistung aller acht Segmente und ihrer Funktion ist in Tabelle 1.1 zu finden.

Tab. 1.1: Eigenschaften der vRNA Segmente und viralen Proteine des Influenza A/PR/8/34 Virus.

Segment	vRNA (nt)	Kodiertes Protein (AS)	Funktion
1	2341	PB2 (759)	Untereinheit der viralen RNA-Polymerase, bindet mRNA-Kappen
2	2341	PB1 (757)	Katalytische Untereinheit der viralen RNA-Polymerase
		PB1-F2 (87)	Mitochondriale Lokalisation, Induktion von Apoptose
3	2233	PA (716)	Untereinheit der viralen RNA-Polymerase, Endonukleaseaktivität
4	1778	HA (565)	Hämagglutinin, Membranfusion, Typ I Membranprotein, Rezeptorbindung, Induktion neutralisierender Antikörper
5	1565	NP (498)	Nukleoprotein, Enkapsidierung von vRNA und cRNA, über NLS Kernlokalisierung der RNP's
6	1413	NA (454)	Neuraminidase, Typ II Membranprotein
7	1027	M1 (252)	Matrixprotein, Funktion in der Morphogenese
		M2 (97)	Ionenkanal, Ansäuerung der Virionen, Schutz der HA-Konformation
8	890	NS1 (230)	Post-transkriptionaler Regulator und IFN-Antagonist, inhibiert PKR-Aktivierung
		NS2/NEP (121)	Nuklearer Exportfaktor

1.1.4 Virale Proteine

Hämagglutinin (HA)

Der Name des Proteins beruht auf der Fähigkeit Erythrozyten zu agglutinieren. Die Agglutination kommt durch die Bindung des HA an salinsäurehaltige Oberflächenrezeptoren der Erythrozyten zustande. Menschliche und aviäre Influenzaviren unterscheiden sich dabei in ihrer Spezifität für unterschiedlich verknüpfte Salinsäuren. Menschliche Viren bevorzugen überwiegend α 2,3-, aviäre Viren hingegen α 2,6-verknüpfte Salinsäurereste (Connor u. a. 1994).

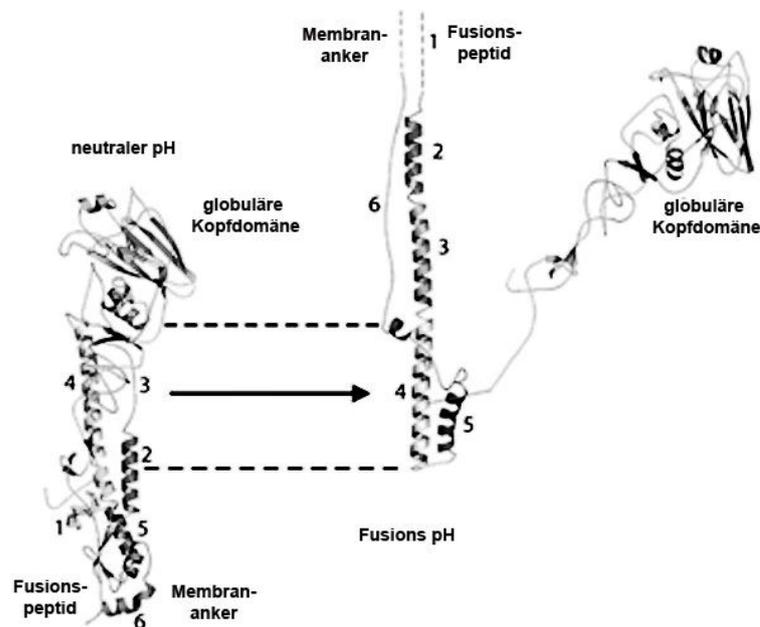


Abb. 1.5: Modell der strukturellen Veränderung des HA Proteins bei niedrigem pH Wert. Einzelne Proteindomänen sind mit Ziffern gekennzeichnet, um ihre Position nach der strukturellen Umlagerung der Domänen zu verfolgen, die bei der Membranfusion erfolgen (basieren auf Fields Virology, 5th Edition, Chapter of *Orthomyxoviridae*, Palese und Shaw).

Das HA Protein formt Homotrimere und ist das Haupt-Oberflächenantigen der Influenza A Viren. Um in die Wirtszelle zu gelangen muss das HA Protein durch eine Protease aktiviert werden. Dazu wird das HA₀ Protein durch Proteasen in die zwei Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten, die aber weiterhin durch eine Disulfid-Brücke verbunden bleiben. Das HA1 formt eine globuläre Domäne und bindet an Sialinsäuren der Zell-Oberflächenproteine/-lipide. Es folgt eine Rezeptorvermittelte Endozytose in das Zellinnere (Matlin u. a. 1981). Durch Ansäuerung des Endosoms im Zytoplasma wird eine Konformationsänderung des HA1/HA2 Proteins ausgelöst (Abb. 1.5). Bei dieser wird das Fusionspeptid exponiert und initiiert die Fusion der Virus- und Endosomenmembran (Bullough u. a. 1994). Neben der Funktion der Rezeptorbindung und

Fusion ist das HA Protein eines der Haupt-Antigene und wird durch das adaptive Immunsystem des Wirts erkannt. Durch einen Selektionsdruck, hervorgerufen durch neutralisierende Antikörper, können Mutationen entstehen, die meist in der HA1 Domäne zu finden sind. Die Anhäufung dieser Mutationen und die damit einhergehende Veränderung der antigenen Struktur des HA1 wird als „Antigene Drift“ bezeichnet. HA Proteine verschiedener Subtypen weisen auf Aminosäureebene zum Teil eine Sequenzidentität von unter 50% auf, Struktur und Funktion der Proteine hingegen sind hochkonserviert (Palese und Shaw 2007). Durch diese Unterschiede der antigenen Strukturen können Influenza A Viren nahverwandter Subtypen, beispielsweise H1N1 und H3N2, dieselbe Person erneut reinfizieren. Aus diesem Grund müssen jährlich angepasste Vakzine hergestellt werden, die Schutz vor den zirkulierenden Stämmen bieten.

Neuraminidase (NA)

Neben dem Hämagglutinin ist die Neuraminidase das zweite prominente Membranprotein der Influenza A Viren. In der Virionmembran bildet es Homotetramere. Die Bezeichnung beruht auf der Eigenschaft des Proteins Sialinsäuren von Rezeptoren auf der Virus- oder Zelloberfläche zu entfernen. Somit sorgt es dafür, dass sich neu gebildete Viren von der Zelloberfläche lösen können und verhindert eine Aggregation von Viruspartikeln (Palese u. a. 1974). Diese Funktion des NA ist bedeutend für die Vermehrung und Ausbreitung des Virus, daher ist das NA eine gut geeignete Zielstruktur für Inhibitoren. Neben dem HA kann auch das NA Protein eine Immunantwort des Wirts auslösen, die zu der Bildung von nicht-neutralisierenden Antikörpern führt. Auch wenn durch diese die Rezeptorbindung der Viren nicht beeinträchtigt wird, so kann die Ausbreitung der Viren bis zu einem gewissen Grad eingeschränkt werden, was dem Wirt erlaubt die virale Infektion zu kontrollieren.

M-Proteine M1 und M2

Das M-Segment kodiert für zwei virale Proteine, das M1 und das M2 Protein. Die ersten acht Aminosäuren des N-Terminus der M1 und M2 Proteine sind identisch. Das M1 Protein wird von einer unprozessierten mRNA gebildet, während das M2 Protein von einer gespleißten Variante dieser mRNA translatiert wird.

M1 – Matrixprotein

Das M1 Protein ist die Hauptstrukturkomponente des Virions und macht etwa 40% der gesamten Proteine eines Virions aus. Es interagiert sowohl mit den zytosolischen Domänen mit den in der Membran verankerten HA, NA und M2 Proteinen, als auch mit den NP Proteinen von verpackten vRNPs (Martin und Helenius 1991; J. Zhang und Lamb 1996; R. W. Ruigrok u. a. 2000; X. Huang u. a. 2001). Auf diese Weise fungiert es als Brücke zwischen der Lipidhülle und den vRNPs im Inneren des Virions. Zusätzlich ist das M1 Protein in infizierten Zellen notwendig

für den Export von vRNPs aus dem Nucleus. Während des Exports interagiert das M1 Protein mit dem NP Protein und der vRNA. Dieser M1/vRNP-Komplex bindet über M1 an das NS2/NEP und vermutlich über NS2/NEP an Crm1 (Abb. 1.6). Crm1 ist ein zellulärer Exportrezeptor und somit Teil der Exportmaschinerie, durch die der M1/vRNP/NS2-NEP Komplex in das Cytoplasma transportiert wird (D Elton u. a. 2001; K. Ma, Roy, und Whittaker 2001; K. Watanabe u. a. 2001).

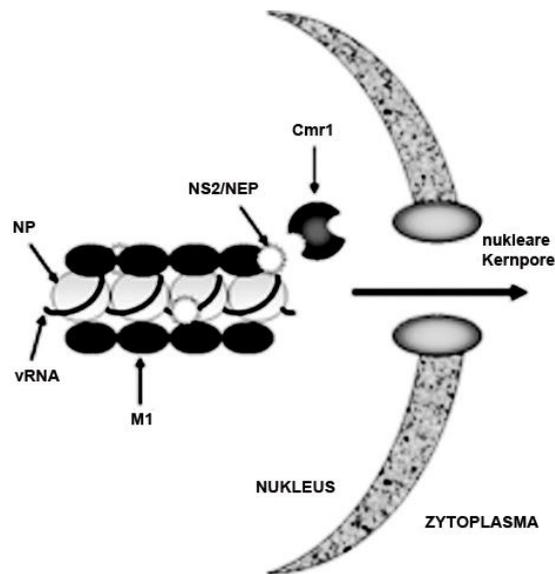


Abb. 1.6: Illustration des Export von viralen RNPs aus dem Nucleus. Der nukleare Export neu-synthetisierter vRNP Komplexe wird durch das virale NS2/NEP Protein vermittelt. Es interagiert mit dem zellulären Exportrezeptor Crm1 und mit den vRNPs über das virale M1 Protein. Die Interaktion mit der zellulären Exportmaschinerie ermöglicht den Transport des viralen Genoms durch die nukleare Kernpore in das Cytoplasma (basierend auf Fields Virology, 5th Edition, Chapter of *Orthomyxoviridae*, Palese und Shaw).

M2 – Ionenkanal-Protein

Das M2-Protein formt einen tetrameren Ionenkanal durch die Membran des Virions (Sugrue und Hay 1991). Seine Funktion als Ionenkanal wird bei niedrigem pH Wert aktiviert (Pinto, Holsinger, und Lamb 1992). Das M2 Protein besitzt zu einem frühen und einem spätem Zeitpunkt des viralen Replikationszyklus eine Funktion (Hay u. a. 1985; Helenius 1992a). In der frühen Phase der Infektion pumpt das M2 Protein Protonen aus dem angesäuerten Endosom in das Virion. Der dadurch bedingte niedrige pH-Wert im Virion schwächt die Bindung des M1 Proteins an die vRNPs und ermöglicht die Freilassung des viralen Genoms in das Cytoplasma der Wirtszelle nach der Fusion der Endosomenmembran mit der Membran des Virions (Martin und Helenius 1991). Im späteren Verlauf des viralen Replikationszyklus hat das M2 Protein eine Rolle bezüglich der Regulation des pH-Werts im trans-Golgi Netzwerk. Durch die Ausschleusung von Protonen aus dem Golgi Netzwerk verändert es den pH Wert innerhalb der Vesikel und verhindert somit die vorzeitige Konformationsänderung des HA1/HA2 Proteins, welches zu Knospungsorten in der

Membran transportiert wird. Das M2 Protein ist – neben dem NA Protein – Ziel von antiviralen Substanzen. In den 1960er Jahren fand man heraus, dass Derivate der Adamantane die Replikation der Influenza A Viren inhibieren (DAVIES u. a. 1964). Durch Bindung der Substanz wird die geschlossene Formation des Ionenkanals stabilisiert, wodurch die Leitfähigkeit der Pore stark eingeschränkt wird (Schnell und Chou 2008). Mutationen im M2 Protein führten zu einer weit verbreiteten Resistenz gegenüber Adamantanen.

Der Polymerasekomplex: PB1, PB2, PA

Der virale RNA-abhängige RNA Polymerasekomplex besteht aus drei Untereinheiten, dem PB1, PB2 und PA Protein. Die Transkription und Replikation erfolgen im Zellkern, daher tragen alle drei Proteine nukleare Lokalisationssequenzen (Nath und Nayak 1990; Nieto u. a. 1992; Mukaigawa und Nayak 1991). Die Proteine PB1 und PA gelangen als Dimer in den Nukleus (Ervin Fodor und Smith 2004) und bilden dort einen Komplex mit dem PB2 Protein, das unabhängig in den Kern importiert wird. Nachdem die virale RNA in den Zellkern transportiert wurde, wird sie dort in mRNAs transkribiert, welche gecappt und polyadenyliert sind. Die Kappe stammt von zellulären mRNAs durch einen Prozess, der als „cap-snatching“ bezeichnet wird. Der poly(A)-Schwanz wird durch die virale Polymerase angefügt. Die Replikation des viralen Genoms erfolgt in zwei Schritten: zuerst wird die negativ-orientierte virale RNA in positiv orientierte komplementäre cRNA (*copy* oder *complementary* RNA) umgeschrieben. Die cRNA wiederum fungiert als Template für die Herstellung neuer viraler RNA im zweiten Schritt der Replikation. Die Influenza A Virus Polymerase katalysiert somit drei Reaktionen: vRNA-gerichtete mRNA Synthese; vRNA-gerichtete cRNA Synthese und cRNA-gerichtete vRNA Synthese (Abb. 1.7). Von großer Bedeutung ist, dass die virale Polymerase keine *proofreading* Eigenschaft besitzt. Sie ist fehleranfällig und etwa alle 10.000 Nukleotide wird ein Mismatch eingefügt (J. Holland u. a. 1982; Steinhauer und Holland 1987). Das bedeutet, dass jedes neu gebildete virale Genom mindestens eine Mutation trägt. Diese hohe Mutationsrate führt zu der Entstehung einer Viruspopulation, die aus unterschiedlichen Varianten besteht. Neben defekten Varianten können einige dieser Varianten potentiell vorteilhafte Mutationen tragen, die unter den richtigen selektiven Konditionen dominant werden. Somit gelingt es den Influenza Viren dem Immunsystem des Wirts relativ leicht zu entkommen. Auf diese Weise tragen Punktmutationen (antigene drift) neben der Reassortierung von ganzen Gensegmenten (antigene shift) zur Evolution der Viren bei.

PB1

Das PB1 Protein ist das größere der beiden basischen Polymeraseproteine – PB1 und PB2 - und besitzt das aktive Zentrum der Polymerasefunktion mit vier entsprechend konservierten Sequenzmotiven (Biswas und Nayak 1994). Im Replikationskomplex katalysiert es die sequentielle Addition von Nukleotiden an das RNA Transkript. Bei der Synthese der viralen

mRNA kommt es etwa 16 Nukleotide vor dem Ende des Transkripts zu sterischen Hinderungen an einem Polyuridin-Bereich. An diesem Bereich der vRNA kommt die Polymerase ins „Stottern“ und durch mehrfaches Kopieren dieses Bereichs kommt es somit zur Polyadenylierung der viralen mRNA (G. X. Luo u. a. 1991). PB1 initiiert die Replikation und Transkription durch die Bindung an vRNA oder cRNA (Biswas und Nayak 1994).

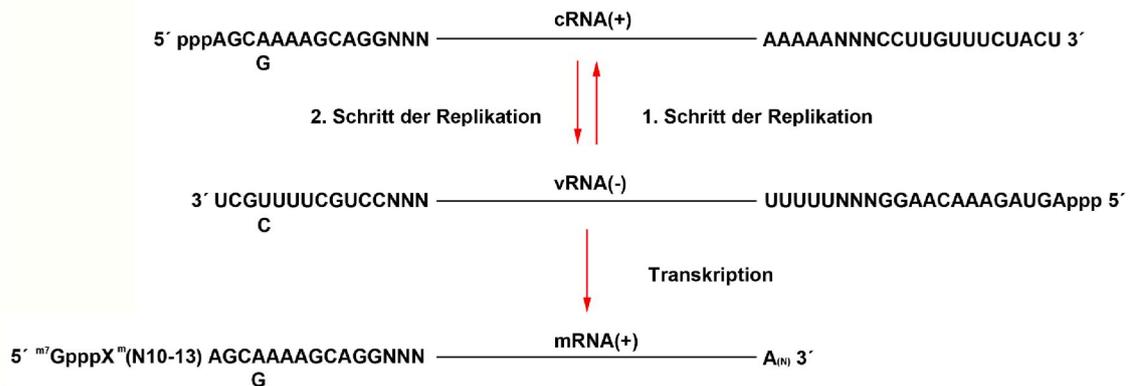


Abb. 1.7: Influenza A Virus RNA Synthese. Die virale Polymerase generiert die drei im Lauf einer Infektion auftretenden viralen RNA-Spezies: vRNA, cRNA, mRNA. Mit Hilfe eines zellulären Primers wird virale mRNA synthetisiert. Für die Replikation der vRNA wird zuerst die cRNA gebildet, eine vollständige, komplementäre Kopie der vRNA. Die cRNA wird daraufhin benutzt um neue vRNAs herzustellen.

PB2

Das PB2 Protein ist das kleinere basische Polymeraseprotein und interagiert direkt mit PB1 und NP. Zudem bindet es die methylierte 5'-Kappen-Strukturen der Wirtszell prä-mRNA (Fechter u. a. 2003) und übergibt diese RNAs an die PA Untereinheit der Polymerase. Das PB2 Protein ist desweiteren eine wichtige Determinante der Wirtsspezifität (Subbarao, London, und Murphy 1993). Aviäre Influenza Viren besitzen an der Position 627 ein Glutamin, bei humanen Isolaten findet man hingegen ein Lysin. H5N1 Viren, die das Glutamin an Position 627 tragen, zeigen nur eine geringe Pathogenität, im Gegensatz dazu sind Isolate mit einem Lysin hoch-pathogen (Hatta u. a. 2001). Zusätzlich zu der E627K Mutation wurde beobachtet, dass die PB2 Mutation T271A die virale Polymerase Aktivität in menschlichen Zellen verstärkt (Bussey u. a. 2010). Ebenso ist die Aminosäureposition 701 des PB2 Proteins eine Position, die wichtig für die Pathogenese und Übertragbarkeit von saisonalen und hoch pathogenen Influenza A Viren ist (Steel u. a. 2009; Y. Gao u. a. 2009).

PA

Das PA Protein wird aufgrund seiner Ladung als saures Polymeraseprotein bezeichnet. Es bindet an PB1 aber nicht PB2 (P Digard, Blok, und Inglis 1989). Das PA Protein ist wichtig für die Assemblierung einer funktionstüchtigen Polymerase (Kawaguchi, Naito, und Nagata 2005).

Zudem konnte gezeigt werden, dass PB1, PA und NP in Abwesenheit von PB2 sowohl cRNA als auch mRNA (ohne Kappen-Struktur) transkribieren können, PA aber für die Synthese von vRNA unabkömmlich war (Nakagawa u. a. 1995). Eine weitere Eigenschaft des PA Proteins ist die Endonukleaseaktivität (Fechter u. a. 2003; Ervin Fodor und Smith 2004; Huarte u. a. 2003; Jung und Brownlee 2006). Es schneidet und entfernt die Kappen-Struktur 9 bis 17 Nukleotide abwärts von der prä-mRNA. Dieser Prozess wird als „cap-snatching“ bezeichnet, da die Kappen-Strukturen den zellulären mRNAs gestohlen werden um an virale mRNAs angeheftet werden zu können. Diese Kappen-abhängige Endonuklease ist im N-Terminus des Proteins lokalisiert und besitzt ein hoch-konserviertes aktives Zentrum (Alexandre Dias u. a. 2009; Yuan u. a. 2009). Der virale Polymerasekomplex assoziiert mit der RNA Polymerase II der Wirtszelle (Rodriguez, Pérez-González, und Nieto 2007). Durch diese Interaktion wird spezifisch die hypophosphorylierte Form der großen Untereinheit der RNA Polymerase II durch die proteolytische Eigenschaft der PA Untereinheit degradiert (Rodriguez, Pérez-González, und Nieto 2007). Diese Degradierung korreliert mit der Inhibition der Wirtszell Transkription und dem Einsetzen der viralen Transkription und Replikation.

Nukleoprotein (NP)

Das NP Protein ist die Hauptkomponente der Ribonukleoprotein Komplexe (RNP). Es bindet genomische RNA Segmente und formt helikale RNP Strukturen (Klumpp, Ruigrok, und Baudin 1997; Noda u. a. 2006). Eine Bindung an RNA wird durch die sichelförmige Struktur des Proteins begünstigt (Q. Ye, Krug, und Tao 2006; W. W. H. Wu, Sun, und Panté 2007). Die Bindung an die RNA erfolgt mit hoher Affinität, aber sequenzunspezifisch über positiv geladene Aminosäuren des NP Proteins und die negativen Ladungen des Phosphatrückgrats der vRNA (F Baudin u. a. 1994; Agustín Portela und Digard 2002). Das NP Protein ist die Hauptkomponente der vRNPs und für die strukturelle Organisation dieser wichtig. Es findet sich in periodischen Abständen auf der RNA, was zu einem festen Verhältnis von einem NP Molekül pro 24-25 Nukleotiden führt (Ortega u. a. 2000). Da die RNA auch als Bestandteil eines vollständigen vRNPs durch RNasen hydrolisierbar ist, weist dies auf eine Exposition der RNA auf der Außenseite der vRNPs hin. Auf diese Weise kann die Polymerase leicht auf die genetische Information zugreifen, auch während diese an NP Proteine gebunden sind. Das NP Protein ist für die vollständige Replikation und Transkription des viralen Genoms notwendig (Honda u. a. 1988). Für die Kernlokalisierung besitzt es zwei Kern-Lokalisations-Sequenzen (nuclear localisation sequences, NLS).

Nicht-Struktur Proteine

PB1-F2

Das PB1-F2 wird von einem alternativen +1 Leseraster (*open reading frame; ORF*) des PB1 Segments der meisten Influenza A Virus Stämme gebildet (W. Chen u. a. 2001). Es ist nicht

essentiell und wird daher auch als akzessorisches Protein bezeichnet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es ein wichtiger Pathogenitätsfaktor des pandemischen Influenza Stammes von 1918 war und konnte ebenfalls in dem hoch virulenten H5N1 Isolat A/HongKong/97 nachgewiesen werden (Conenello u. a. 2007; McAuley u. a. 2007; Zamarin, Ortigoza, und Palese 2006). PB1-F2 fungiert als Virulenzfaktor, indem es die Immunantwort des Wirts moduliert (Conenello und Palese 2007). Auf diese Weise werden bakterielle Sekundärinfektionen in Patienten begünstigt und erhöhen die Morbidität (McAuley u. a. 2007). *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass PB1-F2 in Mitochondrien lokalisiert ist und, dass es durch die Zerstörung des mitochondrialen Membran-Potentials in lymphozytären Zellen Apoptose auslösen kann (W. Chen u. a. 2001; J. S. Gibbs u. a. 2003; Zamarin u. a. 2005). Dazu formt das PB1-F2 Protein Oligomere und formt Poren in der mitochondrialen Membran um Cytochrome C zu entlassen (Zamarin u. a. 2005).

NS Proteine

Das kürzeste Segment des Influenza A Virusgenoms kodiert für zwei Proteine, NS1 und NS2/NEP. Bei der Entdeckung der Proteine konnten diese nicht im Virion nachgewiesen werden, und wurden daher als Nicht-Strukturproteine bezeichnet. Erst später wurde nachgewiesen, dass das NS2/NEP Protein im Virion enthalten ist (J. C. Richardson und Akkina 1991). Das NS1 Protein wird von einer kolinearen mRNA translatiert, wohingegen das NS2/NEP Protein durch eine gespleißte mRNA kodiert wird (Abb. 1.8). Die mRNA Moleküle der beiden Proteine besitzen am 5'-Ende eine identische 56 Nukleotid lange Sequenz, und nach Prozessierung und Translation tragen beide Proteine neun identische Aminosäuren an ihren N-Termini (P. Palese und Shaw 2007). 70 Basenpaare der Leserahmen von NS1 und NS2/NEP überlappen, im zweiten Exon nutzt das NS2/NEP jedoch ein +1 Leseraster wodurch es zu unterschiedlichen Aminosäure-Kodes kommt (Lamb und Lai 1980). Die ungespleißte NS1 mRNA wird mit großer Effizienz in das Zytoplasma exportiert (Alonso-Caplen und Krug 1991). Die Wahrscheinlichkeit gespleißt zu werden ist daher sehr gering. Aus diesem Grund entstehen nur 10% gespleißte Transkripte im Vergleich zu ungespleißten Transkripten (Lamb u. a. 1980). Die Regulation dieses alternativen Spleißvorgangs ist jedoch noch nicht vollständig verstanden (Garaigorta und Ortín 2007; Robb u. a. 2010). Durch den effizienten Export der ungespleißten NS1 mRNA wird in infizierten Zellen die Anwesenheit des NS1 Proteins bereits zu frühen Zeitpunkten der Infektion sichergestellt, um der antiviralen Immunantwort des Wirts entgegenzuwirken. Dieser Mechanismus verhindert zudem eine vorzeitige Expression des NS2/NEP Proteins, was zu einem verfrühten Export unreifer vRNPs führen könnte.

NS1

Das NS1 Protein der Influenza A Viren ist ein wichtiger multifunktionseller Virulenzfaktor und essentiell für eine effiziente Replikation. Das Protein kann in zwei funktionelle Domänen

unterteilt werden: eine N-terminale RNA-Bindungsdomäne (AS 1-73) und eine C-terminale Effektor-Domäne (AS 74-230). Die Effektor-Domäne vermittelt überwiegend verschiedene Interaktionen mit Wirtszellproteinen und stabilisiert die Bildung des Homodimers (X. Wang u. a. 2002). Genetisch hergestellte Viren, denen das NS1 Gen fehlt, sind stark attenuiert (A García-Sastre u. a. 1998). In *in vitro* Assays konnte gezeigt werden, dass das NS1 Protein sowohl einzel- als auch doppelsträngige RNA Moleküle bindet, darunter vRNA, virale mRNA, zelluläre U6 snRNA, poly(A)-Sequenzen zellulärer mRNA und synthetische doppelsträngige RNA (dsRNA) (Wei Wang u. a. 2008; Qiu, Nemeroff, und Krug 1995; Qiu und Krug 1994; Hatada, Takizawa, und Fukuda 1992; Hatada und Fukuda 1992). Die Homodimerisierung und die basischen Aminosäuren Arginin (R) 38 und Lysin (K) 41 des Proteins sind dabei für die RNA-Bindfähigkeit essentiell (W Wang u. a. 1999).

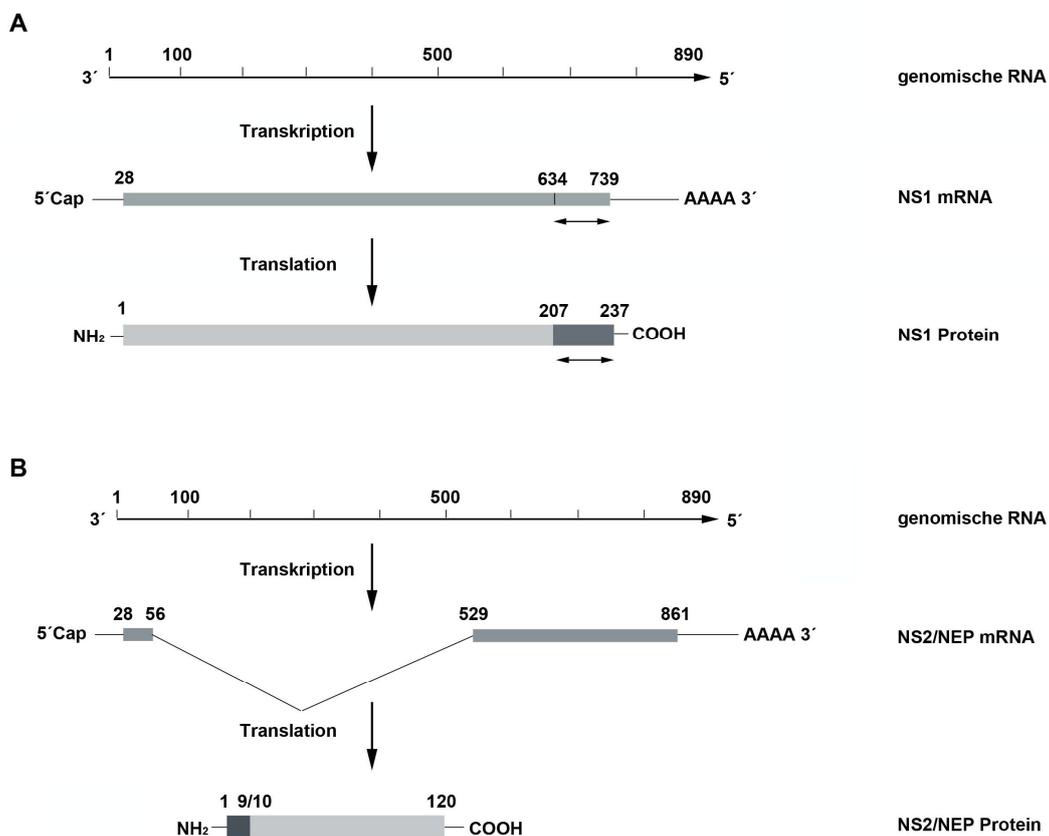


Abb. 1.8: Genomorganisation des 8. Segments der Influenza A Viren. Nach transkription wird das NS1 Protein von der ungespleißten mRNA translatiert. Durch Spleißen des mRNA entsteht eine weitere mRNA Form. Sie dient der Translation des NS2/NEP Proteins, dessen aminoterminalen Aminosäurereste mit dem NS1 Protein identisch. Am Spleißpunkt ändert sich das Leseraster und damit die Proteinsequenz (basierend auf Molekulare Virologie, 2. Auflage, Susanne Modrow).

NS1 als Interferon-Antagonist

Durch das NS1 Protein kann das Virus die Immunantwort des Wirts antagonisieren (Egorov u. a. 1998; A García-Sastre u. a. 1998; Kochs, García-Sastre, und Martínez-Sobrido 2007;

Stephan Ludwig u. a. 2002). In diesem Zusammenhang antagonisiert das NS1 Protein vor allem die Typ I IFN-Produktion sowie die Wirkung IFN-induzierter Gene (Lin, Lan, und Zhang 2007; Hale, Batty, u. a. 2008; Wolff u. a. 2008). Das zelluläre retinoic acid-inducible gene I (RIG I) erkennt die 5'-Triphosphate viraler Segmente (Pichlmair u. a. 2006) und aktiviert in Folge dessen eine Signalkaskade zur Aktivierung des interferon regulatory factor 3 (IRF3) und des nuclear factor-kappa B (NF-κB) und induziert auf diese Weise die Transkription von Typ1 Interferonen (IFN). Um diese Aktivierung zu verhindern inhibiert das NS1 Protein RIG I durch eine Interaktion mit TRIM25 (*tripartite motif protein 25*) (Gack u. a. 2009), und es kommt zur Inhibition der IRF3 Aktivierung. Somit wird die Transkription und Sekretion von IFN-β verhindert (Mibayashi u. a. 2007; Opitz u. a. 2007). Eine Sekretion von IFN-β stimuliert den IFN α/β Rezeptor, auf autokrine und parakrine Weise, und es kommt zur Expression Interferon stimulierter Gene (ISG; *interferon stimulated genes*), wie beispielsweise die Protein Kinase K (PKR). Bindet die PKR an virale doppelsträngige RNA, so führt dies zur Dimerisierung und *trans*-Autophosphorylierung der PKR und der anschließenden Phosphorylierung verschiedener Effektorproteine, u.a. den Translationsinitiationsfaktor eIF2α. Dies hat zu Folge, dass die Proteintranslation inhibiert wird und somit die virale Replikation unterdrückt wird. Um diesem Effekt entgegenzuwirken interagiert das NS1 Protein direkt mit der Kinase und inhibiert auf diese Weise ihre Funktion (Min u. a. 2007).

NS2/NEP

Das NS2/NEP Protein fungiert als Adaptor Protein für den nuklearen Exportrezeptor Crm1 und das virale M1 Protein. Im N-Terminus des Proteins befindet sich ein hochkonserviertes Kernexportsignal (*NES, nuclear export signal*) (R. E. O'Neill, Talon, und Palese 1998), im C-terminalen Bereich ist die Interaktionsdomäne mit dem M1 Protein lokalisiert (Ward u. a. 1995; Yasuda u. a. 1993). Durch die Bindung von NS2/NEP wird ein Kernlokalisierungssignal (*NLS, nuclear localisation signal*) im M1 Protein maskiert, wodurch vermutlich der Wiederaufnahme von reifen vRNPS in den Nukleus verhindert wird. Durch diese Funktion ist das NS2/NEP Protein für die Replikation essentiell (Neumann, Hughes, und Kawaoka 2000). Erst kürzlich wurden Daten publiziert, die vermuten lassen, dass das NS2/NEP Protein zudem einen Einfluss auf die Regulation der Influenza Virus Transkription und Replikation hat, indem es die Akkumulation von Replikations-Produkten erhöht (Robb u. a. 2009).

1.1.5 Replikation

Für die erfolgreiche Replikation ist das Influenza A Virus von der Wirtszelle abhängig. Influenza Viren gehören zu den wenigen RNA Viren deren Transkription und Replikation im Zellkern stattfindet (Whittaker, Kann, und Helenius 2000) (Abb. 1.9). Aus diesem Grund ist das Virus auf Import- und Export-Mechanismen der Zelle angewiesen. Zusätzlich benötigt es für einige mRNAs den Spleißapparat, und letztlich die zelluläre Proteintranslations-Maschinerie.

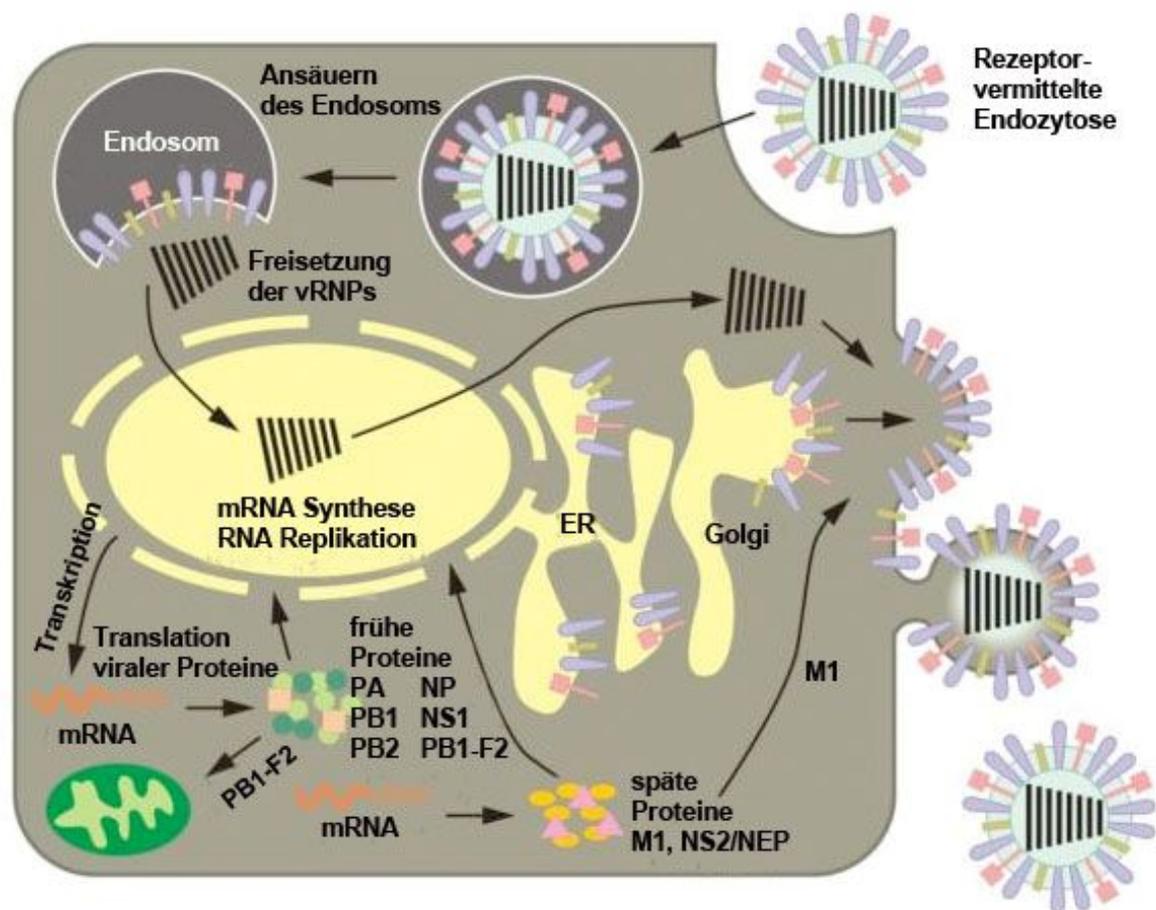


Abb. 1.9: Der Replikationszyklus von Influenzaviren. Modifiziert nach Neumann et al., 2009. Die Abbildung wird im Text näher erläutert.

Die Replikation der Viren kann in fünf Schritte gegliedert werden:

- Adsorption der Viren an spezifische Wirtszellrezeptoren
- Penetration in die Wirtszelle und Freisetzung des viralen Genoms
- Replikation und Transkription
- Zusammenbau der Nukleokapside
- Freisetzung der Virionen

Zu Beginn bindet das Virus anhand des HA Proteins an endständige N-Acetyl-Neuraminsäuren zellulärer Rezeptoren an die Zelloberfläche (Skehel und Wiley 2000). Durch Rezeptor-vermittelte Endocytose werden die Virione internalisiert (Matlin u. a. 1981). Bedingt durch die Ansäuerung der Endosomen kommt es zur Konformationsänderung des HA Proteins was zur Fusion der Endosomen-Membran mit der viralen Membran führt (Skehel und Wiley 2000). Infolge dessen werden die vRNPs aus dem Virion entlassen (Helenius 1992b) und durch Kernlokalisationssequenzen der NP und Polymerase Proteine von Importinen in den Zellkern

transportiert. Replikation und Transkription erfolgt durch die virale RNA-abhängige RNA Polymerase. Um die Synthese viraler mRNAs zu initiieren werden Primer benötigt. Durch den bereits geschilderten Vorgang des „cap-snatching“ (siehe Erläuterungen zum Polymerasekomplex; Abschnitt 1.1.4) wird eine 5'-Kappe und ein freies OH-Ende zur Verfügung gestellt, welches zur Initiation der Transkription viraler mRNAs dient (Neumann u. a. 2004). mRNAs der viralen M2 und NS2/NEP Proteine werden durch das zelluläre Spleißosom erzeugt. Über einen nicht vollständig geklärten Mechanismus gelangen die mRNA Transkripte durch die Kernpore in das Cytoplasma. Während die Membranproteine am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert werden, findet die Translation der übrigen viralen Proteine an freien Ribosomen statt. Die Proteine PB1, PB2, PA, NP und NS1 tragen karyophile Signale und werden in den Zellkern transportiert. Das Umschalten von Transkription zur Replikation wird wahrscheinlich durch das NP Protein reguliert. Sobald genug NP Protein im Zellkern vorhanden ist, verhindert es entweder das „Stottern“ der viralen Polymerase und somit auch die Polyadenylierung der Transkripte und/oder es schützt neusynthetisierte RNA durch Einkapsidierung vor der Degradation (Skorko, Summers, und Galarza 1991). Es kommt zur Synthese eines vollständigen Gegenstrangs (cRNA) zur vRNA, welcher als Matrize für die Synthese neuer vRNAs genutzt wird. Für die Synthese von cRNA und vRNA werden keine Primer benötigt. Bereits während der Synthese werden cRNA und neue vRNA Moleküle vollständig mit NP Proteinen verpackt (Neumann u. a. 2004). Zusammen mit dem Polymerasekomplex bilden sich so reife vRNPs, die in der späteren Infektionsphase durch Interaktion mit dem M1 und NS2/NEP Protein aus dem Zellkern exportiert werden. Die Membranproteine werden vom rER über den Golgi-Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zur Zellmembran transportiert. Auf diesem Weg erhalten sie unterschiedliche Modifikationen, beispielsweise N-Glykosylierungen mit komplexen und mannosereichen Zuckerketten oder Palmitoylierungen (Palese und Shaw, 2007). Endständige Neuraminsäuren der komplexen Zucker werden durch das NA Protein entfernt um eine Aggregation der Virionen miteinander zu vermeiden (P Palese u. a. 1974). Am Knospungsprozeß replikationskompetenter Viren sind HA, NA, M1 und M2 Proteine maßgeblich beteiligt, wobei der genaue Prozess noch nicht vollständig geklärt ist (Gómez-Puertas u. a. 2000; B. J. Chen u. a. 2007; B. J. Chen u. a. 2008; Bruce u. a. 2009). Auf der Zellmembran befindliche endständige Neuraminsäuren werden durch die Neuraminidaseaktivität des NA Proteins abgespalten. Dieser Vorgang verhindert eine Readsorption der neu gebildeten Viren an die Zellmembran (P Palese u. a. 1974). Das HA-Protein wird als inaktives Vorläuferprotein synthetisiert und durch Wirtszellproteasen in seine aktive Form gespalten. Neue Arbeiten deuten auf eine Rolle von Typ II Transmembran Serin Proteasen hin und vermuten im genaueren eine Rolle der Proteasen TMPRSS2, TMPRSS4 und HAT bei der Aktivierung des HA-Proteins (Choi u. a. 2009; Bertram, Glowacka, Steffen, u. a. 2010; Bertram, Glowacka, Blazejewska, u. a. 2010). Die Funktion der Nichtstrukturproteine NS1 und PB1-F2 ist überwiegend immunmodulatorischer Art, erläutert in Abschnitt 1.1.4.

1.2 Der Nukleus

Influenza Viren replizieren und transkribieren ihr virales Genom im Nukleus der Wirtszelle und sind daher abhängig von nuklearen Funktionen des Wirts. Der Nukleus ist ein hoch organisiertes Organell eukaryotischer Zellen, seine Funktion ist die Erhaltung, Replikation und Expression der genetischen Information der Zelle. Durch eine Doppelmembran ist der Nukleus vom Cytoplasma getrennt. Eingelagert in diese Membranen sind große Multiproteinkomplexe, die sogenannten Kernporen. Diese kontrollieren den Import und Export von Molekülen in und aus dem Nukleus. Einen effizienten Ablauf und die Aufrechterhaltung der vielfältigen Komplexen Prozesse im Nukleus werden durch die räumliche Aufteilung und zeitliche Koordinierung verschiedener Reaktionen gewährleistet. Zu diesem Zweck ist der Nukleus in spezifische, membranlose Strukturen unterteilt, in denen jeweils definierte Prozesse stattfinden.

1.2.1 Organisation des Zellkerns

Der Nukleus besteht aus unterschiedlichen membranlosen Subkompartimenten, in denen jeweils Proteine akkumulieren, die an verschiedenen Aktivitäten der Genexpression beteiligt sind (Handwerger und Gall 2006; Zhao, Bodnar, und Spector 2009) (Abb. 1.10). Diese Konzentration von Proteinen in nukleare Kompartimente ermöglicht das räumliche und zeitliche Zusammenspiel eng verknüpfter Funktionen, beispielsweise der Transkription, des Spleißens und dem nuklearen Export von mRNA. Die bekannteste und größte Domäne ist der Nukleolus, der sich um aktiv transkribierte ribosomale DNA formt. Dort findet die Modifikation ribosomaler RNA, die Assemblierung von prä-Ribosomen und die Assemblierung von nicht ribosomalen Ribonukleopartikeln (RNP) statt. Bisher konnten um die 700 nukleolare Proteine identifiziert werden, wobei nur 30% der Proteine an bisher bekannten nukleolaren Funktionen beteiligt sind (Handwerger und Gall 2006). Weitere nukleare Subkompartimente sind z.B. die PML Bodies, Paraspeckles, Cajal Bodies und Speckle Domänen. Die beiden letztgenannten besitzen jeweils eine Rolle bei der Biogenese von zellulärer RNA und werden im Folgenden etwas genauer betrachtet.

Cajal Bodies

Die sogenannten Cajal Bodies formen sich bei aktiver RNA Synthese und Genexpression in der Nähe der Nukleoli (Ogg und Lamond 2002). Sie enthalten Proteine, die an verschiedenen RNA-Prozessierungswegen beteiligt sind, dem prä-mRNA Spleißen, der prä-tRNA Prozessierung und der Bildung der 3'-Enden der Histon mRNA (Matera und Shpargel 2006). Da keine mRNA in den Cajal Bodies nachgewiesen werden konnte, wird vermutet, dass sie an der Assemblierung und Modifikation der RNP Komplexe beteiligt sind, welche die besagten Funktionen vermitteln. In diesem Zusammenhang geht man davon aus, dass die Cajal Bodies eine wichtige Station im Reifungsprozess verschiedener RNPs einnehmen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass neu

formierte snRNPs zunächst in Cajal Bodies auftreten, bevor sie dann in nuklearen Speckles nachzuweisen sind (Sleeman u. a. 1998).

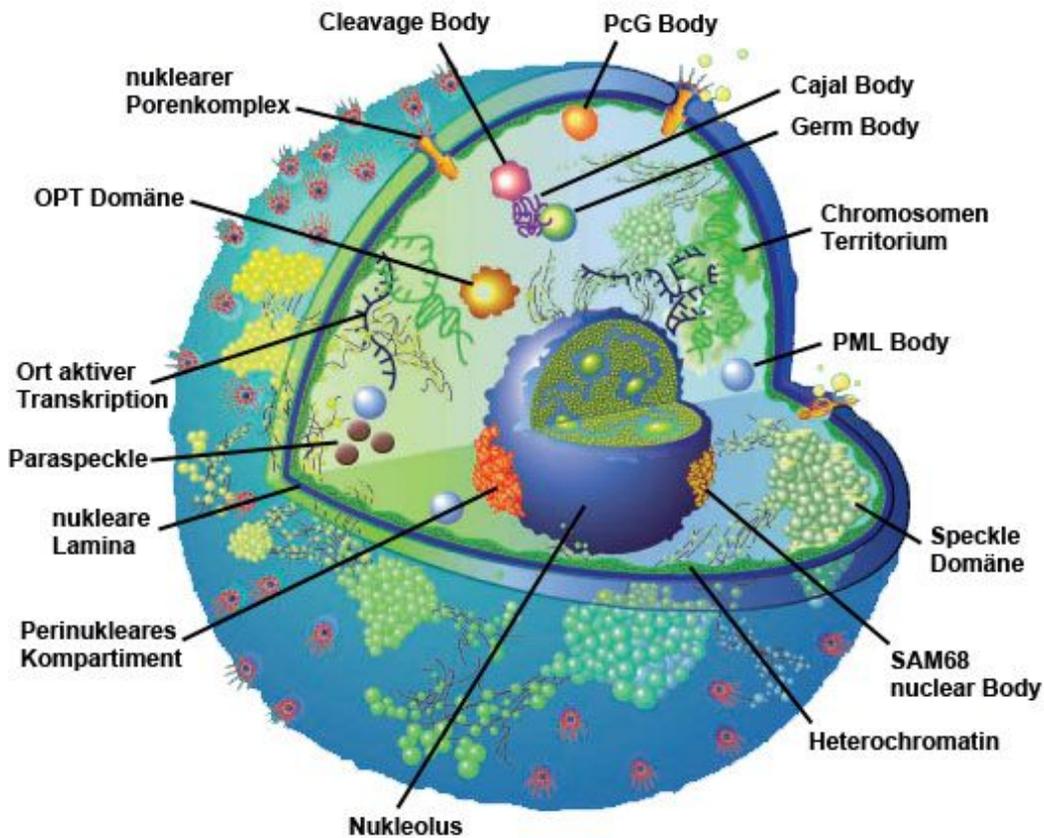


Abb. 1.10: Modell des Nukleus einer tierischen Zelle (nach Spector, 2001).

Speckle Domänen

Speckle Domänen werden auch interchromatin granule clusters (IGC) oder SC35 Domäne genannt, nach dem Spleißfaktor SC35, der strukturellen Hauptkomponente und somit Markerantigen dieser Domäne ist (D L Spector, Fu, und Maniatis 1991). 30 bis 50 Speckle Domänen können in einem Nukleus vorkommen. Es handelt sich um dynamische Strukturen, aber keine transkriptionell aktive Regionen. Neue Forschungsergebnisse zeigen jedoch, dass einige transkriptionell aktive Gene bevorzugt mit nuklearen Speckle Domänen assoziieren (Brown u. a. 2008; Takumi Takizawa, Meaburn, und Misteli 2008). Die Basis hierfür ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Diese Ergebnisse unterstützen allerdings ein mögliches Modell, nach dem bestimmte Gene, die zum Beispiel durch externe Stimuli aktiviert werden, effizienten Zugang zu ko-transkriptioneller RNA Prozessierung durch die Nähe zu Speckle Domänen erhalten. Speckle Domänen enthalten hohe Konzentrationen von spleißosomalen „small nuclear“ Ribonukleoproteinen (snRNP) (Carmo-Fonseca u. a. 1991; D L Spector, Fu, und

Maniatis 1991) und SR Protein, die über ein speckle targeting Signal verfügen (Angus I Lamond und Spector 2003; David L Spector und Lamond 2011). Die Proteine in den Speckle Domänen übernehmen Funktionen im prä-mRNA Spleißen, der 3'-End-Prozessierung und Polyadenylierung, sowie der Transkription und dem mRNA Export (Masuda u. a. 2005; Saitoh u. a. 2004; Mintz und Spector 2000). Zusätzlich sind auch Kinasen und Phosphatasen in Speckle Domänen enthalten, die die Funktion der SR Proteine regulieren (Brede, Solheim, und Prydz 2002; Colwill u. a. 1996; Ko, Kelly, und Pines 2001; Trinkle-Mulcahy u. a. 1999; Trinkle-Mulcahy, Sleeman, und Lamond 2001). Die strukturelle Organisation und Morphologie ist stark vom metabolischen Zustand der Zelle abhängig und wird durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von SR Proteinen reguliert (Sacco-Bubulya und Spector 2002; Yeakley u. a. 1999; Colwill u. a. 1996). Dementsprechend hat die Inhibition der RNA Polymerase II abhängigen Transkription oder eine Hitzeschockbehandlung von Zellen zur Folge, dass sich die Speckle Domänen vergrößern und statt der irregulären Form eine abgerundete Erscheinung annehmen (Angus I Lamond und Spector 2003). Zuerst wurde vermutet, dass Speckle Domänen Speicherorte der genannten Faktoren seien, die dann bei aktiver Genexpression zu den Orten der Transkription und Prozessierung rekrutiert werden (C. Zeng u. a. 1997; S. Huang u. a. 1994; O'Keefe u. a. 1994). Neuere Erkenntnisse jedoch stützen eine Hypothese, nach der Speckle Domänen eine aktive Beteiligung in der RNA Biogenese zugesprochen wird. Zwar findet in den Domänen kein Spleißing statt, es wird aber eine Rolle beim Reifungsprozess einiger mRNAs angenommen, da nukleare Speckle Domänen eine räumliche Verbindung zwischen mRNA Prozessierung und schneller Wiederbereitstellung entsprechender RNA Prozessierungsfaktoren herstellen (Hall u. a. 2006; Shopland u. a. 2003). Zusätzlich gibt es Hinweise, dass poly(A) mRNA vor dem Export aus dem Nukleus erst Speckle Domänen passieren und defekte Transkripte dort zurückgehalten oder auch degradiert werden (Holt u. a. 2007; K. P. Smith u. a. 2007; Schmidt u. a. 2006; Degot u. a. 2004; C Johnson u. a. 2000). Auch die Beobachtung, dass mRNA Exportfaktoren wie UAP56, Aly und verschiedene SR Proteine, wie SF2/ASF in Speckle Domänen lokalisieren, unterstützt eine mögliche regulatorische Funktion der Domänen im mRNA Export (Masuda u. a. 2005; Mintz und Spector 2000).

1.2.2 Nuklearer mRNA Export

Durch die Kompartimentalisierung eukaryotischer Zellen finden Prozesse wie die Transkription und Translation an unterschiedlichen Orten in der Zelle statt – im Nukleus und im Cytoplasma. Neu gebildete mRNAs können nicht durch die Kernporen der nuklearen Membran diffundieren, daher wird ihr Export von Rezeptorproteinen vermittelt und reguliert. Derzeit sind vier Rezeptorproteine bekannt, die selektiv den Transport jeweils einer Gruppe von RNAs vermitteln (Abb. 1.11). Zum einen gehört Crm1 zu der Gruppe der Rezeptorproteine. Abhängig vom Adapterprotein PHAX oder Nmd3 exportiert es kleine nukleare RNAs („small nuclear RNA“, snRNA) oder ribosomale RNA (rRNA). Die Adapterproteine binden dabei die jeweilige RNA

Spezies und interagieren dann mit Crm1, welches den Transport über die Kernpore vermittelt. Zusätzlich exportiert Crm1 einige mRNAs, beispielsweise die INF- α 1 mRNA (M. Watanabe u. a. 1999; T. Kimura u. a. 2009; T. Kimura u. a. 2010). Das Exportin-t vermittelt den Export von tRNA und das Exportin-5 ist verantwortlich für den Export nicht kodierender microRNAs (miRNAs). Für den größten Teil der mRNA sorgt das TAP/NXF1 („Tip associated protein“) Protein für einen effizienten Export. TAP/NXF1 gehört nicht, wie die meisten Proteintransportrezeptoren zur Familie der β -Karyopherine und exportiert daher unabhängig von RanGTP (Grüter u. a. 1998; J. Katahira u. a. 1999).

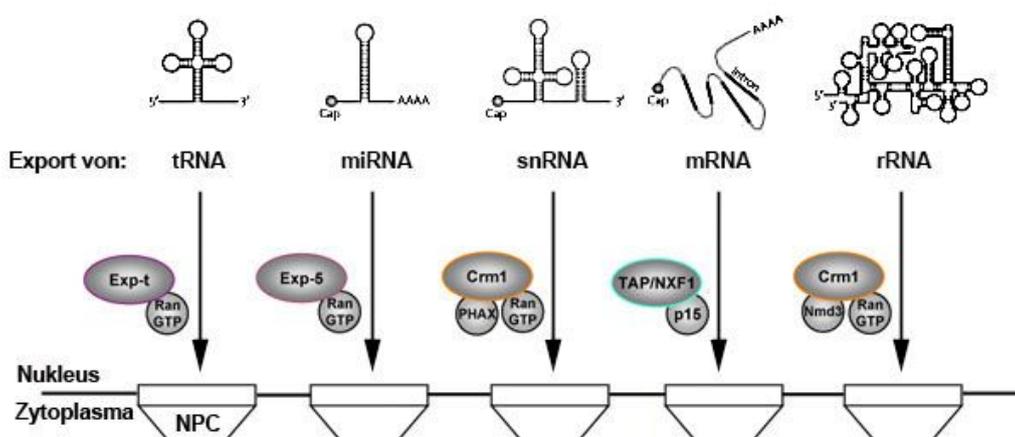


Abb. 1.11: Schematische Darstellung des nuklearen Exports von tRNA, miRNA, snRNA, mRNA und rRNA. Die vier bekannten RNA Exportrezeptoren Exportin-t (Exp-t), Exportin-5 (Exp-5), Crm1 und TAP/NXF1 sind mit ihren spezifischen primären RNA-Kargotranskripten dargestellt. Die drei Exportrezeptoren Exp-t, Exp-5 und Crm1 gehören zur Familie der β -Karyopherine und benötigen RanGTP als Ko-Faktor. Exp-t transportiert tRNAs ins Cytoplasma. Exp-5 ist der Exportrezeptor für mikroRNAs (miRNA). Crm1 exportiert kleine nukleare (sn)RNA und ribosomale (r)RNAs. TAP/NXF1 gehört nicht zur Familie der β -Karyopherine und benötigt daher kein RanGTP als Export-Ko-Faktor (nach Köhler und Hurt, 2007).

TAP/NXF1 gehört zu der Familie der nuklearen Export-Familie (NXF). Es kann sich zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma hin- und herbewegen und interagiert direkt mit den FG-Repeats der Nukleopore des Kernkomplexes und bindet direkt oder indirekt über Adapterproteine an die zu transportierende mRNA (Köhler und Hurt 2007). TAP/NXF1 agiert mit dem Kofaktor p15 als Heterodimer. Durch diese Interaktion wird die Affinität von TAP/NXF1 zu den Nukleoporinen gesteigert was zu einem effizienten Exportprozess beiträgt (J. Katahira u. a. 1999). Der Export zellulärer mRNA ist eine Komponente der komplexen Genexpressionsprozesse, die miteinander gekoppelt sind und von der Transkription über das Spleißen, 3'-End Bildung, „nonsense mediated decay“ (NMD) bis zum Export reichen. Die Verknüpfung der einzelnen Prozesse sichert die Qualität der im Zytoplasma translatierten mRNAs und ermöglicht außerdem eine schnelle und effiziente Regulation der Genexpressionsrate (Tom Maniatis und Reed 2002; Moore und Proudfoot 2009; Rondón,

Jimeno, und Aguilera 2010; Stewart 2010). Bereits während der Transkription werden Faktoren an die sich bildende mRNA rekrutiert, die am Spleißen, Export und NMD beteiligt sind (R. Luna u. a. 2008; Tom Maniatis und Reed 2002) (Abb. 1.12). Die kotranskriptionelle Rekrutierung wird hauptsächlich durch die C-terminale Domäne (CTD) der größten Untereinheit der RNA Polymerase II vermittelt (H. Cheng u. a. 2006; Rougemaille u. a. 2008; Reed und Hurt 2002; Meinhart u. a. 2005). Die CTD besteht aus Heptapeptid-Wiederholungen YSPTSPS, welche unter anderem an den Serinen 2 und 5 phosphoryliert werden können (R. Luna u. a. 2008; Palancade und Bensaude 2003; H. Kim u. a. 2010). Die CTD bildet eine wichtige Bindungsplattform für transient assoziierte Proteine, wobei die Interaktion durch den Phosphorylierungsstatus reguliert wird. So geht mit der Phosphorylierung von Ser5 die Initiation und frühe Elongationsschnitte der RNA Polymerase II einher, während die Phosphorylierung von Ser2 für die Loslösung vom Promoter wichtig ist. Die Phosphorylierungen der CTD werden unter anderem durch Cyclin-abhängige Kinasen vermittelt (R. Luna u. a. 2008; Bartkowiak und Greenleaf 2011; Buratowski 2009; Palancade und Bensaude 2003; Meinhart u. a. 2005). Die Prozessierung intronhaltiger mRNA erfolgt kotranskriptional (R. Luna u. a. 2008; Moore und Proudfoot 2009; Stewart 2010; Reed und Hurt 2002). Nach dem Spleißprozess wird ein Multiproteinkomplex etwa 20 Nukleotide aufwärts der Exon-Exon-Verbindungsstelle („exon junction complex“, EJC) platziert. Teile dieses Komplexes bleiben selbst während des Exports mit der mRNA assoziiert und werden erst kotranslational entfernt (Le Hir und Andersen 2008). Der EJC dient der Markierung entsprechend prozessierter Transkripte. Das Gerüst besteht aus dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor eIF4AIII und den Proteinen MLN51, Magoh und Y14. Zudem sind weitere Prozessierungsfaktoren mit dem EJC assoziiert, dazu zählen die spleißosomalen Proteine SRm160, RNPS1, SAP18, die Exportfaktoren UAP56, Aly, TAP/NXF1, p15 und die NMD Proteine Upf3 und Upf2 (Le Hir und Andersen 2008). Neben dem EJC wird auch der THO Komplex kotranskriptional an mRNA rekrutiert. Bei dem THO Komplex handelt es sich um einen Multiproteinkomplex der mehrere Funktionen in der mRNP Bildung hat (Aguilera 2005). Ein Fehlen des THO Komplex in *Drosophila melanogaster* hat zur Folge, dass vermehrt RNA-DNA-Hybride von Transkript und DNA Matrize gebildet werden, was einen Transkriptionsstopp zur Folge hat (Aguilera 2005). Zusammen mit dem RNA-bindenden Protein Aly und der RNA-Helikase UAP56 bildet der THO Komplex den Transkription/Export Komplex (TREX) (Masuda u. a. 2005) (Abb.1.12). Aly, das weiter unten noch gesondert besprochen wird, ist ein Adapterprotein und vermittelt die Bindung des Exportrezeptors TAP/NXF1 an exportreife mRNAs (M. L. Luo u. a. 2001; Z. Zhou u. a. 2000). Experimentell konnte bereits nachgewiesen werden, dass der TREX Komplex in Abhängigkeit vom RNA-Spleißen an die Transkripte rekrutiert wird, da er mit großer Effizienz an prozessierter mRNA nachgewiesen werden konnte, jedoch nicht oder kaum an ungespleißten cDNA Transkripten (Z. Zhou u. a. 2000; M. L. Luo u. a. 2001; Masuda u. a. 2005; H. Cheng u. a. 2006). Diese verstärkte Rekrutierung korreliert mit einer erhöhten Exporteffizienz gespleißter mRNA im Vergleich zu cDNA Transkripten (Valencia, Dias, und Reed 2008; A. P. Dias u. a. 2010). Die Bindung des TREX Komplex wird dabei durch die 5'-Kapfenstruktur vermittelt (H. Cheng u. a. 2006; Masuda u. a. 2005). Über Aly wird dann der

Exportrezeptor TAP/NXF1 rekrutiert, dieser Prozess hat die Abdissoziation von UAP56 aus dem mRNP Komplex zur Folge (Köhler und Hurt 2007). Der Exportrezeptor TAP/NXF1 agiert als Heterodimer mit dem Faktor p15 und vermittelt so die Translokation des mRNP Komplexes durch die Kernpore (Köhler und Hurt 2007).

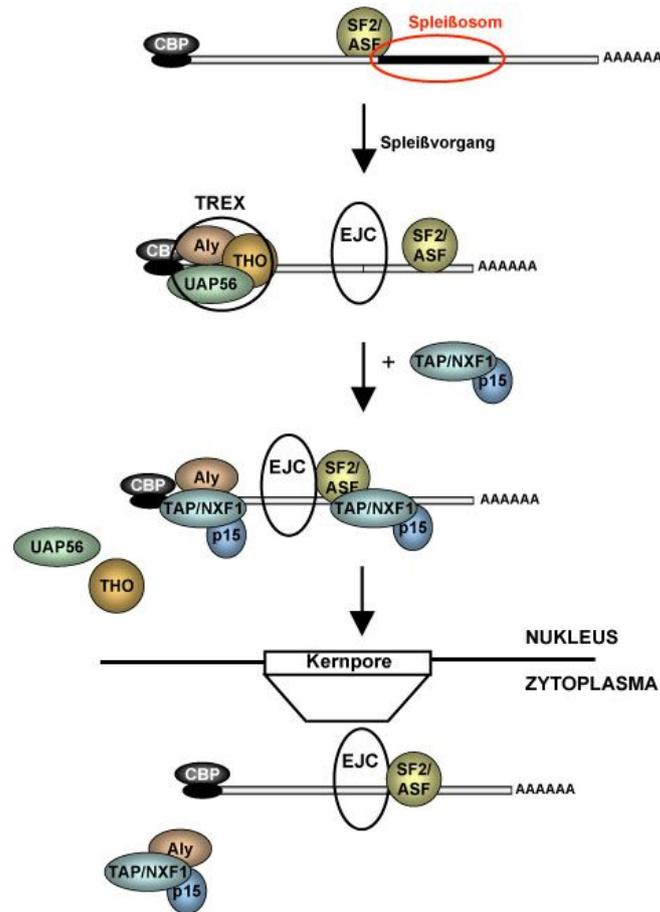


Abb. 1.12: Schematische Darstellung des nuklearen Exports intronhaltiger mRNA. Nach der Formation des Spleißosoms und dem Spleißvorgang bildet sich der Exon-Exon Junction Komplex (EJC) Multiproteinkomplex aufwärts der Verknüpfungsstelle zweier aufeinander folgender Exons auf der mRNA. Der EJC fungiert als Plattform zur Rekrutierung von Prozessierungs- und Exportfaktoren und dient auch der Qualitätskontrolle der entstehenden mRNA. Beispielsweise sind die Exportfaktoren Aly und UAP56 transient mit dem EJC assoziiert und werden somit an den Spleißvorgang gekoppelt zu den mRNAs rekrutiert. Zusammen mit dem THO Komplex bilden Aly und UAP56 den Transkriptions/Export (TREX) Komplex, welche in Abhängigkeit von der Transkription und der 5'-Kappenstruktur zu den mRNAs rekrutiert wird. Im nächsten Schritt können Aly und auch das SR Protein SF2/ASF – das seit dem Spleißvorgang an der mRNA gebunden ist - als Adaptorproteine für TAP/NXF1 dienen. Durch die Interaktion des Adapterprotein mit dem Exportrezeptor wird die RNA-Bindungsaffinität von TAP/NXF1 stark erhöht und die Bindung an die mRNA dadurch gefestigt. 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 Export des mRNP Komplexes durch die Kernpore. Auf der cytoplasmatischen Seite erfährt der mRNP Komplex eine Umgestaltung. Der exportierte mRNP Komplex steht dann für die Translation zur Verfügung.

Auf zytoplasmatischer Seite erfolgt die Freisetzung von den Kernkomplexen unter anderem durch konservierte Exportfaktoren wie die RNA-Helikase Dpn5 und dem Gle1 Protein (Kutay und Panse 2008; R. Luna u. a. 2008). Bis heute sind viele einzelne Bestandteile der Exportmaschinerie bekannt, genaue Funktionen und die zeitliche und räumliche Abfolge und Kopplung der Rekrutierungsprozesse und Regulationsmechanismen sind aber noch nicht vollständig verstanden. Erste Ergebnisse zeigen, dass der Export von neu gebildeten mRNAs durch Proteinmodifikationen wie Phosphorylierung und Methylierung vor allem von SR Proteinen reguliert werden kann (Yingqun Huang u. a. 2003; Yingqun Huang, Yario, und Steitz 2004; Hung u. a. 2010). Auch die Ubiquitinierung von Proteinen können die Rekrutierung von TAP/NXF1 unterstützen, welches über eine Ubiquitin-assoziierte (UBA) Domäne verfügt (Iglesias und Stutz 2008). Die meisten Protein in tierischen Zellen werden von gespleißten mRNA translatiert, nur selten gibt es mRNA Transkripte, die nicht gespleißt werden. An intronlose mRNAs wird nicht automatisch durch den Spleißvorgang beispielsweise der EJC rekrutiert, wodurch Exportfaktoren an die mRNA rekrutiert würden. Stattdessen werden vermittelt von Kappen-bindenden Proteinen Exportfaktoren wie Aly an die mRNA rekrutiert um ihren Export zu gewährleisten (Nojima u. a. 2007). In Hefen weisen die meisten Gene keine Introns auf, und die Rekrutierung des TREX Komplex erfolgt dort gekoppelt an den Transkriptionsprozess. Auch für tierische Zellen konnte mittlerweile gezeigt werden, dass unterschiedliche Faktoren, wie die SR Proteine SRp20 und 9G8 oder die Exportfaktoren Aly und UAP56 an dem Export intronloser mRNAs beteiligt sind, wobei die Grundlagen für diesen Prozess jedoch noch nicht vollständig verstanden sind (Y Huang und Steitz 2001; Taniguchi und Ohno 2008; Cullen 2003).

1.2.3 SF2/ASF

Der alternative splicing factor/ splicing factor 2 (SF2/ASF) oder auch SFRS1 genannt ist ein essentieller Spleiß-Faktor und involviert im prä-mRNA Spleißen (D.-J. Kim, Oh, und Kim 2009; Zuo und Manley 1993; Xialu Li und Manley 2005). Das Protein besteht aus zwei funktionellen Modulen, einer Arginin-Serin-reichen-Domäne (RS-Domäne) und zwei RNA Erkennungssequenzen (RRM Domänen). Die RS Domäne dient der Protein-Protein Interaktion und kann phosphoryliert werden, um so die Aktivität und Lokalisation des Proteins zu regulieren (Ngo u. a. 2008; Koizumi u. a. 1999). Die beiden RRM Domänen vermitteln die Interaktion mit RNA und weiteren Proteinen (Hagopian u. a. 2008). SF2/ASF ist ein wichtiger Part vieler Komponenten des Spleiß-Prozesses, indem es die Rekrutierung des U1 snRNP zu der 5'-Spleiß-Seite vermittelt und assoziiert zudem mit dem U2 snRNP (Xialu Li und Manley 2005; Masuyama u. a. 2007). Während der Spleiß-Reaktion beeinflusst SF2/ASF das alternative Spleißen, indem es die Nutzung der proximalen Intron Seite steigert und die Nutzung der distalen Seite unterdrückt (Z. Wang u. a. 2006; X. Zhang, Merkler, und McLean 2008). Zusätzlich beeinträchtigt die Konzentration des Proteins den alternativen Spleißvorgang sowie

die Möglichkeit zur Bindung an exonic splicing enhancer (ESE) Sequenzen (D.-J. Kim, Oh, und Kim 2009; X. Zhang, Merkler, und McLean 2008). Die Regulation von alternativen Spleißvorgängen konnte für SF2/ASF auch in Bezug auf Influenza A Viren gezeigt werden. Shih und Krug berichteten, dass SF2/ASF das Spleißen der M1 mRNA in die M2 mRNA kontrollieren kann (Shih und Krug 1996). Die M2 mRNA wird durch alternatives Spleißen der M1 mRNA hergestellt. Dieser Spleißvorgang wird auf zwei Wege kontrolliert: zum einen können virale Polymeraseproteine die distale (stärkere) 5´-Spleiß Seite der M1 mRNA blockieren, wodurch die zelluläre Spleißmaschinerie die proximale (schwächere) M2 5´-Spleiß Seite nutzt. Zum anderen kann die M2 5´-Spleiß Seite durch Bindung von SF2/ASF an eine purin-reiche Sequenz (splicing enhanced sequence) im Exon der M1 mRNA aktiviert werden. Übereinstimmend damit zeigten Untersuchungen mit verschiedenen Zelllinien, die sich in der Expressionsstärke des SF2/ASF Proteins unterschieden, dass sowohl die M2 mRNA, als auch die M2 Proteine in Mengen produziert wurden, die proportional zu den Expressionsleveln des SF2/ASF Proteins waren (Shih und Krug 1996). Die Funktion im Spleißvorgang wird über die RS-Domäne reguliert, die an unterschiedlichen Serinen phosphoryliert werden kann (Bourgeois, Lejeune, und Stévenin 2004; Zuo und Manley 1993; Hagopian u. a. 2008). Die Phosphorylierung erfolgt dabei durch die Serin-Threonin Proteinkinase SRPK1, welche zusammen mit SF2/ASF einen stabilen Komplex bildet (C.-T. Ma u. a. 2008; Ngo u. a. 2008). Multiphosphorylierung an bis zu 12 Serinen der RS Domäne beeinflusst viele Protein-Protein Interaktionen die mit dem Spleißen assoziiert sind (Hagopian u. a. 2008; Sanford u. a. 2005). Die sequentielle Phosphorylierung und Dephosphorylierung ist wichtig und notwendig für den Spleißvorgang, da diese Schritte die Transition zwischen einzelnen Schritten des Spleißens markieren (Cao, Jamison, und Garcia-Blanco 1997). Eine hypo- oder hyper-Phosphorylierung durch Clk/Sty kann hingegen zu einer Inhibition des Spleißvorgangs führen (Hagopian u. a. 2008; Bullock u. a. 2009). Neben der Funktion im Spleißvorgang übernimmt SF2/ASF auch weitere Prozessierungsfunktionen, und dies wird ebenfalls durch Phosphorylierung und Methylierung reguliert (Koizumi u. a. 1999; Sinha u. a. 2010; Zhong u. a. 2009). SF2/ASF agiert als Adapterprotein und rekrutiert den Exportrezeptor TAP/NXF1 an neu gebildete mRNA (Yingqun Huang u. a. 2003), wobei gezeigt werden konnte, dass TAP/NXF1 bevorzugt an hypophosphoryliertes SF2/ASF bindet, wohingegen phosphoryliertes SF2/ASF Protein an Speckle Domänen rekrutiert wird (Yingqun Huang, Yario, und Steitz 2004; M.-C. Lai und Tarn 2004; J F Cáceres u. a. 1997). Über die Interaktion mit TAP/NXF1 kontrolliert SF2/ASF den Export reifer mRNA aus dem Nukleus (Yingqun Huang u. a. 2003; Tintaru u. a. 2007). Parallel sorgt ein Anstieg des zellulären SF2/ASF Gehalts für eine erhöhte Effizienz der NMD und unterstützt somit die NMD im Nukleus (Sato, Hosoda, und Maquat 2008). Im Zytoplasma vermittelt SF2/ASF die Initiation der Translation indem es die Aktivität des Inhibitors 4E-BP unterdrückt und so die cap-abhängige Translation reguliert (Michlewski, Sanford, und Cáceres 2008). Erst kürzlich wurde eine Funktion von SF2/ASF in der Protein Sumoylierung beschrieben (Pelisch u. a. 2010). SF2/ASF übernimmt somit viele regulatorische Funktionen vom Spleißen der mRNA über NMD, den Export bishin zur Translation und Proteinmodifikation.

1.2.4 Aly

Aly, oder auch Aly/REF, bzw. THO complex subunit 4 genannt, ist ein RNA-Bindungsprotein und agiert bei der RNA Prozessierung und als Adapterprotein im nuklearen RNA Export (Jun Katahira u. a. 2009; Z. Zhou u. a. 2000). Das Protein kann Homomultimere bilden und ist eine Komponente des THO Komplex, einem Multiproteinkomplex mit mehreren Funktionen in der mRNP Bildung (Aguilera 2005). Aly assoziiert spezifisch mit gespleißter mRNA und ist in dem EJC enthalten (Kataoka u. a. 2001; Schmidt, Im, Benzing, Janjetovic, Rippe, Lichter, und Wachsmuth 2009a). Aly wird von UAP56 an mRNA rekrutiert und zusammen mit dem THO Komplex bilden diese beiden Proteine den TREX Komplex (Katja Strässer u. a. 2002; Masuda u. a. 2005). Die Interaktion mit UAP56 wird dabei über den C-Terminus von Aly vermittelt (M. L. Luo u. a. 2001). Als Komponente des TREX Komplexes rekrutiert Aly den Exportrezeptor TAP/NXF1 über eine direkte Interaktion (I.-H. B. Chen, Sciabica, und Sandri-Goldin 2002; M. L. Luo u. a. 2001; Hautbergue u. a. 2008). Die Übergabe der mRNA an TAP/NXF wird durch unterschiedliche Methylierungsstadien von Aly koordiniert (Hung u. a. 2010).

1.2.5 Viren und mRNA Export

Viren, die im Nukleus der Wirtszelle replizieren sind auf zelluläre Exportmechanismen angewiesen. Virale mRNAs müssen, ebenso wie zelluläre mRNAs die Kernmembran durch die Kernpore verlassen. Molekulare und zellbiologische Untersuchungen haben in den letzten Jahren zu einem immer tiefergehenden Verständnis des zellulären mRNA Exports geführt. Dieser erfolgt gekoppelt an mehrere Prozesse, wie der Transkription, dem Spleißen und auch der Qualitätskontrolle, und wird durch die C-terminale Domäne (CTD) der RNA Polymerase II kontrolliert. Aufgrund der Transkription viraler mRNAs durch die virale Polymerase haben virale Transkripte keinen Zugang zu einer Vielzahl zellulärer Proteine, die ko-transkriptionell durch die CTD an zelluläre mRNAs rekrutiert werden. Diese Faktoren sind jedoch notwendig, um durch eine Interaktion mit Exportrezeptoren den Export der mRNA zu gewährleisten. Erschwerend kommt hinzu, dass virale Proteine oft von intronlosen, ungespleißten oder intronhaltigen, unvollständig gespleißten Transkripten exprimiert werden. Der größte Anteil der zellulären mRNAs wird gespleißt, und Exportfaktoren werden infolge des Spleißvorgangs an die prozessierten mRNA Moleküle rekrutiert. Die meisten viralen mRNAs hingegen werden nicht gespleißt, somit werden virale Transkripte nicht von der zellulären Exportmaschinerie erkannt. Aus diesem Grund müssen nuklear replizierende Viren Strategien entwickeln, um ihre Transkripte in den zellulären nuklearen Exportweg einzuschleusen. Das zu den komplexen Retroviren zählende Humane Immundefizienz-Virus (HIV) kodiert beispielsweise für das regulatorische Rev Protein. Dieses erkennt ein RNA-Erkennungsmotiv („Rev recognition motif“, RRE) im viralen Transkript und vermittelt über ein Leucin-reiches NES den Export nicht oder nur unvollständig prozessierter viraler mRNA über den Crm1-Exportweg (Bryan R Cullen 2003;

Fischer u. a. 1995; Malim u. a. 1989) (Abb. 1.13). Das Mason-Pfizer Monkey Virus (MPMV), ein einfaches Retrovirus, ist ebenfalls auf den Export intronhaltiger mRNA angewiesen, nutzt dafür aber kein Protein, sondern ein strukturelles konstitutives Transport Element („constitutive transport element“, CTE) in der MPMV RNA. Der Exportrezeptor TAP/NXF1 bindet an das CTE und vermittelt so den Export durch die Kernpore (Bray u. a. 1994; Grüter u. a. 1998) (Abb. 1.13). Auch Adenoviren benutzen für ihre viralen mRNAs den TAP/NXF1-vermittelten Exportweg (Yatherajam, Huang, und Flint 2011).

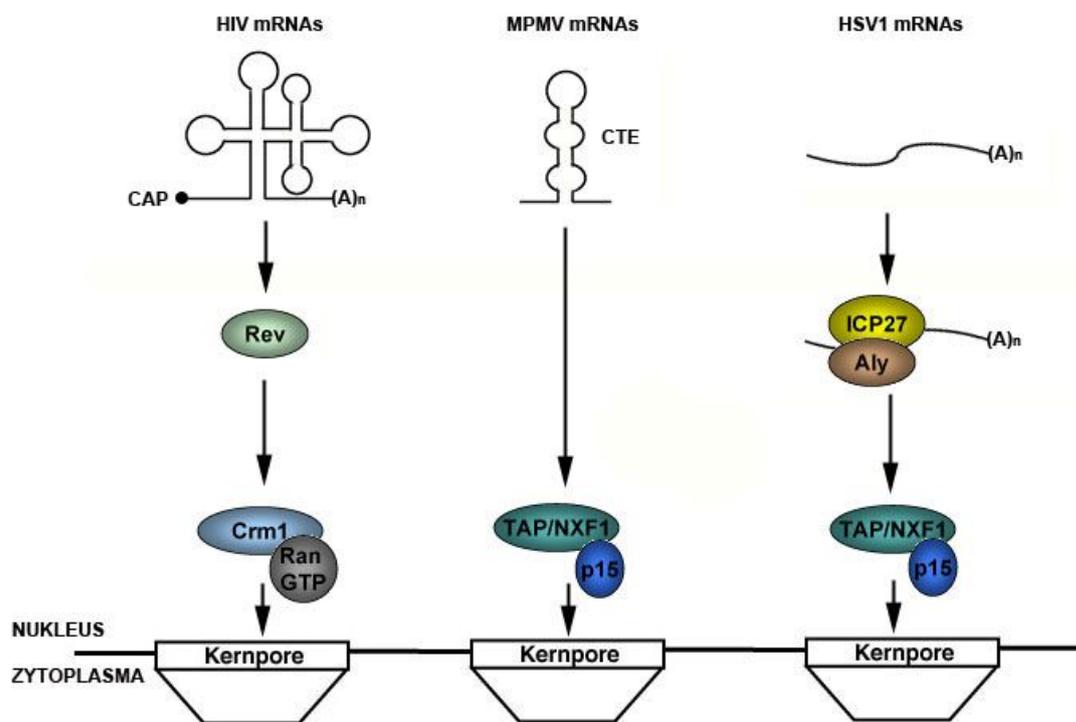


Abb. 1.13: Schematische Darstellung des mRNA Exports von HIV, MPMV und HSV1 mRNAs. Das virale Rev Protein des HIV bindet an ein „Rev recognition motif“ (RRE) in den viralen Transkripten und vermittelt durch Interaktion mit Crm1 den Export viraler mRNAs. Sowohl MPMV, als auch HSV1 exportieren hingegen ihre mRNAs über den Exportrezeptor TAP/NXF1. Ein strukturelles Transportelement in der MPMV mRNA, das „constitutive transport element“ (CTE) bindet direkt den Exportrezeptor um die mRNA in das Zytoplasma zu transportieren. HSV1 kodiert das Adapterprotein ICP27, welches durch Rekrutierung von Aly einen TAP/NXF1 vermittelten Export ermöglicht.

Mehrere Herpesviren sind ebenfalls abhängig von diesem nuklearen Exportmechanismus. Das Herpes Simplex Virus (HSV1) kodiert ein Adapterprotein ICP27, welches spezifisch an intronlose virale mRNA bindet (Sandri-Goldin 2008). ICP27 ist fähig direkt oder vermittelt durch das Adapterprotein Aly an das Exportprotein TAP/NXF1 zu binden und rekrutiert diesen Faktor so an virale mRNA Transkripte (I.-H. B. Chen u. a. 2005; Tunncliffe, Hautbergue, Kalra, Jackson, Whitehouse, Wilson, und Golovanov 2011a; Hernandez und Sandri-Goldin 2010) (Abb. 1.13). Erst kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass die Replikationskompartimente der HSV1 mit nuklearen Speckle Domänen koaleszieren, um den Export viraler mRNAs zu verstärken (Chang u. a. 2011). Ebenfalls das Humane Cytomegalovirus (HCMV), ein β -

Herpesvirus, kodiert für ein Adapterprotein. Lange Zeit galt die Hypothese, dass das regulatorische Protein UL69 den Export ungespleißter viraler Transkripte durch eine Rekrutierung von UAP56 fördert (Toth und Stamminger 2008; Lischka u. a. 2006). Neuere Untersuchungen von Kronemann und Kollegen zeigten jedoch, dass Mutationen im UL69 Protein, welche eine Interaktion mit UAP56 nicht mehr ermöglichen, keine Defekte in der Replikation zur Folge haben (Kronemann u. a. 2010). Andere Studien hingegen halten an einer unterstützenden Funktion von UAP56 auf den Export viraler Transkripte und der Replikation fest (Zielke u. a. 2011). Genauere Untersuchungen sind in diesem Bereich notwendig um die Rolle von UAP56 im Replikationszyklus von HCMV aufzuklären. Ebenfalls Influenza Viren sind durch ihre nukleare Replikationsstrategie auf den Export intronloser und damit ungespleißter viraler mRNAs angewiesen. Ein virales Protein, das die Aufgabe als Adapterprotein übernehmen könnte ist das NS1 Protein, welches im Fokus dieser Arbeit steht.

1.3 Fragestellung

Zelluläre mRNA wird über einen höchst regulierten Prozess aus dem Nukleus exportiert. Dabei werden bereits ko-transkriptionell neu gebildete Transkripte gecappt, gespleißt, polyadenyliert und anschließend über die Kernpore transportiert, wobei die einzelnen Schritte miteinander durch sequentielle Rekrutierung einzelner Faktoren miteinander gekoppelt sind. Influenza A Viren replizieren im Nukleus der Wirtszelle und sind auf den zellulären Exportmechanismus ihrer viralen mRNAs angewiesen. Alle viralen Transkripte werden von der Virus-eigenen Polymerase transkribiert. Aus diesem Grund haben virale mRNAs keinen Zugang zu zellulären Exportfaktoren. Zudem werden acht der zehn viralen Transkripte nicht gespleißt. Ziel dieser Arbeit war es, zu verstehen, auf welche Weise Influenza A Viren mit der zellulären Exportmaschinerie interagieren, um einen effizienten Export viraler mRNA zu gewährleisten.

Das multifunktionale NS1 Protein wurde bereits mit dem viralen mRNA Export in Verbindung gebracht. In einer Arbeit von Wang und Kollegen wurde gezeigt, dass das NS1 Protein an virale mRNA binden kann (Wei Wang u. a. 2008). Eine Interaktion von NS1 mit Exportfaktoren wurde jedoch immer im Hinblick auf die Inhibition des zellulären mRNA Exports betrachtet (Satterly u. a. 2007). Eine stimulierende Wirkung als Adapterprotein für virale mRNAs wurde bisher weder ausgeschlossen noch weiter untersucht. Wie in Abschnitt 1.2.5 beschrieben benutzten mehrere Viren Adapterproteine um einen effizienten Export der eigenen mRNA zu gewährleisten. Ob auch dem NS1 Protein eine Funktion als Adapter Protein zugesprochen werden kann sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Neuere Studien deuten auf eine Beteiligung zellulärer Proteine am Export viraler Transkripte. Es wurde gezeigt, dass das NS1 Protein an virale mRNA bindet, weswegen es als virales Adapterprotein im viralen mRNA Export fungieren könnte. Im Rahmen dieser Arbeit sollten folglich potentielle Interaktionen zwischen dem viralen NS1 Protein und Faktoren des zellulären mRNA Exportweges untersucht werden. Mögliche Interaktionen galt es daraufhin auf ihren Einfluss im viralen Replikationszyklus zu charakterisieren.



2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
15 ml Röhrchen	Roth, Karlsruhe
50 ml Röhrchen	TPP, Schweiz
Acrylamid (Rotiphorese)	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roche, Mannheim
Avicel RC-581	FMC BioPolymer, Belgien
Bacto-Agar	Becton-Dickenson, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bruteier (VALO SPF-Eier)	Lohmann, Cuxhaven
BioMax MR Film	Kodak
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Bovines Serum Albumin 30% (BSA)	PAA Laboratories, Linz (A)
Bovines Albumin (BA) Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
CL-XPosure™ Film	Thermo Scientific, USA
Coomassie Brilliant Blue R250	Roth, Karlsruhe
1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-oktan (DABCO)	Sigma, Steinheim
4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Roth, Karlsruhe
DEAE-Dextran	Sigma, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
DNA-Längenstandard Fast Ruler™	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-6 x loading buffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	MP, Biomedicals, LLC
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sima-Aldrich, Steinheim

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol- <i>bis</i> (b-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Merck, Darmstadt
Einwegspritzen	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 10% (Methanol-frei)	Polysciences, Inc., USA
Formaldehyd 37%	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Cambridge, GB
Glukose	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd	TAAB, UK
Glutathion-Sepharose	Amersham, Freiburg
Glyzerol	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Becton-Dickinson, Heidelberg
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
IGEPAL CA-830 Fluka	Sigma, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -Thiogalactopyranidose (IPTG)	Biomol, Hamburg
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kristallviolett Fluka	Sigma, Steinheim
LipofectAMINE TM 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
L-[³⁵ S]-Methionin/Cystein	Hartmann, Berlin
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Minimal Essential Medium (MEM)	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Natriumacetat (NaAc)	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumvanadat (NaVO ₄)	Sigma, Steinheim
Nitrocellulose Transfer-Membran (Protran)	Schleicher & Schuell, Dassel
Nonident P-40	Fluka, Heidelberg
Opti PRO SFM ohne Glutamin	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Parafilm	American National Can (USA)
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Invitrogen, Karlsruhe
Pipetten für die Zellkultur	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein-Assay zur Protein-Konzentrationsbestimmung	BioRad, München
Protein G Agarose	Roche, Mannheim
Protein-Molekulargewichtsstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
Roti®Phenol-Chloroform	Roth, Karlsruhe
SuperSignal WestDura Extended Duration Substrat	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (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	Nunc, Dänemark
Zellkulturschalen	TPP, Schweiz
Zellkulturschalen	Greiner, Solingen
Zellschaber	TPP, Schweiz

2.1.2 Bakterienstämme

Escherichia coli, Stamm XL1-Blue

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44
reLA1 lac [F'proAB lac^fZΔM15 Tn10
(Tet^r)]*

Bioline, Luckenwalde

Escherichia coli, Stamm BL26

[F' ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻)gal dcm]

Bioline, Luckenwalde

2.1.3 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

Human Nierenzelllinie

2.1.4 Virusstämme

Influenza A/PR/8/34

Stammsammlung FG17; RKI; Berlin

Influenza A/WSN/33

Stammsammlung FG17; RKI; Berlin

Influenza A/PR/8/YN-NS1

B. Manicassamy;
Mount Sinai School of Medicine, NY

Influenza A/PR/8/YC-NS1

B. Manicassamy;
Mount Sinai School of Medicine, NY

Vesikular Stomatitis Virus

Stammsammlung FG17; RKI; Berlin

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
<hr/>		
pH 7,2		
Antibiotika-Zugabe nach dem Autoklavieren		
2 x YT-Medium	Trypton	16 g/l
	Hefeextrakt	10 g/l
	NaCl	10 g/l
<hr/>		
pH 7,2		
SOC-Medium	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
<hr/>		
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 Antibiotika	LB-Medium	
	Bacto-Agar	1,5 % (w/v)

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

2.1.6 Medien für Zellkultur

MEM (Minimal Essential Medium)

DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium)

Ansatz für die Zellkultur	FKS	10 %
	Glutamin	2 mM
	Penicillin/Streptomycin	50 µg/ml
Ansatz für die Transfektion	FKS	10 %
	Glutamin	2 mM
Ansatz für die Infektion	BSA	0,2 %
	Glutamin	2 mM
	Penicillin/Streptomycin	50 µg/ml
PBS⁺⁺/0,2 % BSA	PBS	
	BSA	0,2 %
	MgCl ₂	0,1 g/l
	CaCl ₂	0,13 g/l

Avicel Overlay Medium

2,5 % Avicel RC-581 Pulver in bidestilliertem Wasser lösen und anschließend autoklavieren

2 x konzentriertes MEM Medium	1:1
30 % BSA	1:75
5% NaHCO ₃	1:100
1 % Dextran	1:100
frisch dazu: TPCK-Trypsin;	1:1000

2.1.7 Restriktionsendonukleasen

<i>Bam</i> HI	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Dpn</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Eco</i> RI	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Xba</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Xho</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.8 Enzyme

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K	Invitek, Berlin
Revert Aid™ Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
RnaseA	Sigma, Steinheim
RNasin (40 U/μl)	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitek, Berlin
T4 DNA – Ligase (1μg/μl)	Roche, Mannheim
RQ1 RNase-Free DNase (1μg/μl)	Promega, Mannheim

2.1.9 Kits

BigDye® Terminator 3.1 Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche, Mannheim
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
Invisorb Spin DNA Extraction Kit	Invitek, Berlin
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Invitek, Berlin
OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN, Hilden
PARIS™ Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Proteinassay	Biorad, München
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquik PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QIAamp® MinElute™ Virus Spin Kit	QIAGEN, Hilden
TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Mannheim

2.1.10 Oligonukleotide

Klonierprimer	5´- 3´
14-BiFC-A-NS1(5´)F	gct cga att cta tgg atc caa aca ctg tg
15-BiFC-A-NS1(3´)R	gga tcg tct aga tca aac ttc tga cct
18-BiFC-UAP56(5´)F	gct caa gct tcg aat tct atg gca gag aacgat gtg
19-BiFC-UAP56(3´)R	gga tcg tct aga cta ccg tgt ctg ttc aat

20-BiFC-REF1(5')F(Aly)	gct caa gct tcg aat tct atg gcc gac aaa atg gac
21-BiFC-REF1(3')R(Aly)	gga tcg tct aga tta gct ggt gtc cat cct
22-BiFC-SF2(5')F	gct caa gct tcg aat tct atg tcg gga ggt ggt gtg
23-BiFC-SF2(3')R	gga tcg tct aga tta tgt ac gaga gcg ag
226-GST SF2(for)E	atc ccc gaa ttc atg tcg gga ggt ggt gtg
227-GST SF2(rev)X	aga tcg ctc gag tta tgt acg aga gcg aga tct
281-GST-NS1(for)	atc ccc gaa ttc atg gat cca aac act gtg
282-GST-NS1(rev)	aga tcg ctc gag tca aac ttc tga cct
360_AlyΔRGG1-for-HindIII	gct caa gct tcg aat tct gca gtg cag gcc gcc gcg
361_AlyΔRGG2-rev-XbaI	gga tcg tct aga tca gct ctg tgc agg tct tcg
362_SF2ΔRS-rev-XbaI	gga tcg tct aga tca tgg act tct ggg ccc atc
368_BiFC-NS1 1-73REV	gga tcg tct aga tca gga ttc ttc ttt c
369_BiFC-NS1 74ffFOR	gct cga att ctg atg agg cac tta aa
370_GST NS1 1-73REV	gct cga att ctg atg agg cac tta aa
371_GST NS1 74ffFOR	atc ccc gaa ttc gat gag gca ctt aaa

Mutageneseprimer

5'-3'

161-Aly-QCStop-AS240-F	gca gca gct ttc tgc aga gta gta gta ctc aca gct gga tgc tta c
162-Aly-QCStop-AS240-R	gta agc atc cag ctg tga gta cta cta ctc tgc aga aag ctg ctg c
163-UAP-QCStop-AS248-F	ccg caa gtt cat gca aga tcc aat gta gta gtt cgt gga tga tga gac g
164-UAP-QCStop-AS248-R	cgt ctc atc atc cac gaa cta cta cat tgg atc ttg cat gaa ctt gcg g
165-SF2-QC-R90/93A-F	ggt gga gtt tcc tgc tag cgg cgc tgg aac agg ccg agg
166-SF2-QC-R90/93A-R	cct cgg cct gtt cca gcg ccg cta gca gga aac tcc acc
167-SF2-QC-R117/118A-F	cta tgg ccc ccc atc cgc ggc gtc tga aaa cag agt gg
168-SF2-QC-R117/118A-R	cca ctc tgt ttt cag acg ccg cgg atg ggg ggc cat ag

Primer für RT-PCR und RIP

5'-3'

72_GAPDH107F	cct tca ttg acc tca act
73_GAPDH456R	gca gga ggc att gct gat
74_18SrRNA74F	ggt aca gtg aaa ctg cga
75_18SrRNA430R	gga atc gaa ccc tga ttc
175-b-actin 5'	gaa gca ttt gcg gtg gac cat
176-b-actin 3'	tcc tgt ggc atc cac caa act

246-Oligo(dT)	ttt ttt ttt ttt ttt
255-NA-for-RIP	tac agc aaa gac aat agc ata
256-NA-rev-RIP	cca aac acc att acc ata cct
257-M1-for-RIP	acc gtg ccc agt gag cga gga
258-M1-rev-RIP	atg tct gat tag tgg gtt ggt
259-PB1-for-RIP	acc gaa act gga gca ccg ca
260-PB1-rev-RIP	tgt tca ggg tca atg ctc ta
564-PR8 HA For	gtg act tca aat tat aac agg ag
565-PR8 HA Rev	cgc tgc ata gcc tga tcc ctg ttc

Sequenzier-Primer

5´-3´

24-pEYN-Seq-F	tcg agc tga agg gca tcg
25-pEYFP-YC-Seq-F	cga gaa gcg cga tca cat gg
26-pEYFP-YN-YC-Seq-R	gct gca ata aac aag tta ac
243-GST-5´Seq	ggg ctg gca agc cac gtt tgg tg
244-T7-5´universal	taa tac gac tca cta tag gg
245-Sp6-3´universal	att tag gtg aca cta tag
289-YN/NS1R100	ctt gct cac cat gct agc tc
290-YN/NS1F650	gtc cgc aaa cga gtt gca gac
291-YN/NS1-1090	ctc ttc cag gac ata ctg ctg
292-YN/NS1F1627	gat aac aga gaa tag ttt tga gc
293-YC/NS1rev100bp	ctg ctt gtc cat gct agc tc
294-YC/NS1F650	gta cct gcg tcg cgt tac cta ac
295-YC/NS1F1090	gaa gtt ggt acc ggg aga tc
296-YC/NS1F1424	ggt tga ttg aag aag tga gac
301-YN/NS1R757-PR8	gtc cag acc aag agt gct g
302-YC/NS1R766-PR8	cgc ctg gtc cat tct gat ac

2.1.11 Plasmide

pEGFP-SF2/ASF	P. Bubulya; Janicki und Spector, 2003
pcDNA-myc/HIS-Ref (Aly)	Williams et al, 2005
pLP-EGFP-C1-UAP56	Lie et al, 2005
pEYC/YN/YFP-SF2/ASF	M. Franz; FG17, RKI
pEYC/YN/YFP-Aly	M. Franz; FG17, RKI

pEYC/YN/YFP-UAP56	M. Franz; FG17, RKI
pEYC/YN/YFP-NS1	M. Franz; FG17, RKI
pEYN-TAP/NXF1	U. Schmidt; DKFZ, Heidelberg
pEYC-Y14	U. Schmidt; DKFZ, Heidelberg
pEYC-SF2mut	M. Franz; FG17, RKI
pEYN/YFP-SF2/ASF Δ RS	M. Franz; FG17, RKI
pEYC/YN/YFP-Aly Δ RGG1	M. Franz; FG17, RKI
pEYC/YN/YFP-Aly Δ RGG2	M. Franz; FG17, RKI
pEYC/YN/YFP-Aly Δ C	M. Franz; FG17, RKI
pEYN/YFP-NS1 RNA mut	M. Franz; FG17, RKI
pGex-5x.1	Stratagene
pGex-SF2/ASF	M. Franz; FG17, RKI
pGex-Aly	M. Franz; FG17, RKI
pGex-Y14	M. Franz; FG17, RKI
pGex-TAP/NXF1	M. Franz; FG17, RKI
pGex-NS1	M. Franz; FG17, RKI
pGex-NS1 1-73	M. Franz; FG17, RKI
pGex-NS1 74-230	M. Franz; FG17, RKI
pcDNA3	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA-NS1	T. Wolff; FG17, RKI
pcDNA-NS1 RNA mut	T. Wolff; FG17, RKI
pcDNA-NS1 Δ 204-230	T. Wolff; FG17, RKI
pDZ-EYN-NS1	B. Manicassamy; Mount Sinai School of Medicine, NY
pDZ-EYC-NS1	B. Manicassamy; Mount Sinai School of Medicine, NY
p125-Luc (Firefly)	T. Fujita; Yoneyama et al, 1996
pRL-TR-Luc (Renilla)	Promega
pcDNA-PR/8/PB1	FG17; RKI
pcDNA-PR/8/PB2	FG17; RKI
pcDNA-PR/8/PA	FG17; RKI
pcDNA-PR/8/NP	FG17; RKI
pPolSapl-A/PR/8/1934-PB1	FG17; RKI
pPolSapl-A/PR/8/1934-PB2	FG17; RKI
pPolSapl-A/PR/8/1934-PA	FG17; RKI
pPolSapl-A/PR/8/1934-NP	FG17; RKI
pHW2000-A/WSN/33-PB1	FG17; RKI

pHW2000-A/WSN/33-PB2	FG17; RKI
pHW2000-A/WSN/33-PA	FG17; RKI
pHW2000-A/WSN/33-NP	FG17; RKI

2.1.12 siRNA

5'-3'		
SF2/ASF	Sense	GAC CUA UGC AGU UCG AAA Att
	antisense	UUU UCG AAC UGC AUA GGU Cat
Aly	Sense	CAU UCA GCU UGU CAC GUC Att
	Antisense	UGA CGU GAC AAG CUG AAU Gtt
UAP56	Sense	CAG UAC UAC GUG AAA CUG Att
	Antisense	UCA GUU UCA CGU AGU ACU Gct
URH49	Sense	GAG UUU AAC CAG GUG AUA Att
	antisense	UUA UCA CCU GGU UAA ACU Cca

alle: Applied Biosystems - Ambion

2.1.13 Antikörper

Bezeichnung	Spezies/Eigenschaft	Verdünnung/Endkonz.		Hersteller
		IF	IB	
α-Influenza A/NS1	Kaninchenserum	1:1000	1:1000	BioGenes*
α-Influenza A/NS1	Maus, monoklonal	-	1:1000	Münster
α-Influenza A/NP	Mause, polyklonal	1:1000	1:1000	Serotec
α-GFP	Maus, monoklonal	1:800	1:1000	SantaCruz
α-GST	Maus, monoklonal	-	1:3000	SantaCruz
α-Aly	Maus, monoklonal	-	1:3000	SantaCruz
α-Aly	Kaninchen, polyklonal	-	1:1000	Epitomics
α-SF2/ASF	Maus, monoklonal	-	1:1000	Invitrogen
α-UAP56	Kaninchen, polyklonal	-	1:500	Epitomics
α-Tubulin	Maus, monoklonal	-	1:5000	Sigma
α-Aktin	Maus, monoklonal	-	1:3000	Sigma

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

Zielspezies	Modifizierung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Maus	Alexafluor 594 (rot)	Ziege	1:1000 (IF)	Molecular Probes
Maus	Alexafluor 488 (grün)	Ziege	1:1000 (IF)	Molecular Probes
Kaninchen	Alexafluor 594	Ziege	1:1000 (IF)	Molecular Probes
Kaninchen	Alexafluor 488	Ziege	1:1000 (IF)	Molecular Probes
Maus	Meerrettich Peroxidase (HRP)	Schwein	1:20.000 (IB)	DAKO
Kaninchen	HRP	Schwein	1:20.000 (IB)	DAKO

2.1.14 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
	B-Mercaptoethanol	5%

Fixierlösung	Methanol	30%
	Essigsäure	10%
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blau R250	0,25% (w/v)
	Essigsäure	10%
	Ethanol	45%
Entfärbelösung	Methanol	10%
Semidry Blotting Puffer	TRIS	48 mM
	Glycin	39 mM
	SDS	1,3 mM
	Methanol	20 %
10 x TBST	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	
	NP-40	0,5%	
	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	
	NP-40	0,05%	
	frisch dazugeben	DTT	1 mM
		Pefabloc	1 mM
		Na ₃ VO ₄	1 mM
	RNasin	100 U/ml	
SR Wash-Puffer	TRIS-HCL, pH 7,5	50 mM	
	KCL	100 mM	
	NP-40	0,1%	
	frisch dazugeben	Pefablock	1 mM
		Na ₃ VO ₄	1 mM
		RNasin	100 U/ml
SR IP-Puffer	TRIS-HCL, pH 7,5	50 mM	
	KCl	100 mM	
	MgCl ₂	5 mM	
	Glycerol	10%	
	NP-40	0,1%	
	frisch dazugeben	Pefablock	1 mM
		Na ₃ VO ₄	1 mM
		RNasin	100 U/ml

Co-IP Puffer	TRIS-HCl, pH 7,5	20 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	NP-40	1%
	frisch dazugeben	Pefablock
	Na ₃ VO ₄	1 mM

RIPA Puffer	TRIS-HCL, pH 7,5	10 mM
	NaCl	150 mM
	SDS	0,1%
	Na-Deoxychelate	1%
	NP-40	1%

Mowiol	Mowiol 4-88	2,4 g
	Glycerol	6 ml
	dH ₂ O	6 ml
	über Nacht quellen lassen	
	TRIS (0,2 M), pH 8,5	12 ml
unter Rühren auf 50-60 °C erhitzen		
15 min bei 4.000 rpm zentrifugieren und den Überstand mit 10 % (w/v) DABCO versetzen		
Aufbewahren der Aliquots bei -20 °C		

2.1.15 Radiochemikalien

Redivue L-[35S] Methionin Amersham, Freiburg

2.1.16 Geräte

LSM 510	Zeiss, Jena
Binder APT line® CB (Zellschrank)	Binder, Tuttlingen
Elektrophoresezubehör	BioRad, München
Eppendorf Centrifuge 5417 R/ 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
FLA-2000 Fluorescent Image Analyzer & Imaging Platte BAS-MP	Fujifilm
Immunfluoreszenz-Mikroskop Diaphot 300	Fujifilm
	Nikon, Düsseldorf

Laminar Airflow HERAsafe	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Luminex 100	BioRad, München
MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Nikon Eclipse TS100	Nikon, Düsseldorf
Phero-Temp 40 (Geltrockner)	BioTec Fischer
Power Pac 200 und 300	BioRad, München
Pro Scan	Scheuring
SONOPULS HD 70	Bandelin, Berlin
SPOT RT Digitalkamera	Diagnostic Instruments
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Transilluminator	INTAS, Göttingen
Zellkulturschrank	Sanyo/EWALD Innovationstechnik
Zellkulturschrank NuAIRE	Varolab, Gießen
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Multifuge 1SR	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Zentrifuge Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Zentrifuge RC5C mit den Rotoren SS-34 und GSA	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

2.1.17 Software

Adobe Photoshop CS3 extended	Bildbearbeitung
Adobe Acrobat Professional 9	Textverarbeitung
Adobe Illustrator	Bildbearbeitung
GraphPad Prism 5	Tabellenkalkulation, Statistik
Image Reader V1.5E FLA-2000/2000G	Fujifilm
Image Gauge V3.01	Fujifilm
Lasergene 8	Sequenzauswertung
LSM Image Browser 3.5	cLSM Messung und Auswertung
Mac OS w 10	Betriebssystem
Microsoft Office 2003	Tabellenkalkulation, Textverarbeitung
SPOT 3.5.5 für Windows	Kamerasteuerung
Windows XP	Betriebssystem
Zotero	Referenzverwaltung
ImageJ	Bildbearbeitung, -kalkulation

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden, wenn nicht anderes beschrieben, unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen zu verhindern. Alle 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.

Verwendete Zellkulturgefäße:

• T75 Flasche	1 x 10 ⁷ Zellen	10 ml Medium
• 10 cm Schale	1 x 10 ⁷ Zellen	10 ml Medium
• 35 mm Schale	1 x 10 ⁶ Zellen	1,5 ml Medium
• 6 Kalotten Platte	1 x 10 ⁶ Zellen/ Kalotte	1,5 ml Medium
• 12 Kalotten Platte	5 x 10 ⁵ Zellen/ Kalotte	1,0 ml Medium
• 24 Kalotten Platte	2,5 x 10 ⁵ Zellen/ Kalotte	0,5 ml Medium

2.2.1.1 Passagieren von Zellen

MDCK II Zellen wurden in MEM Medium, 293T-, A549- und HeLa-Zellen wurden in DMEM Medium kultiviert. Alle Zelllinien wurden in T75 Flaschen mit mindestens 10 ml Medium kultiviert. Konfluente Zellen wurden je nach Bedarf umgesetzt. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml EDTA-Trypsin bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche lösten. Die Zellsuspension wurde in Kulturmedium aufgenommen und der gewünschte Teil in eine neue Kulturflasche mit entsprechend vorgelegtem Kulturmedium überführt.

2.2.1.2 Einfrieren von Zellen

Um Zelllinien über lange Zeiträume aufzubewahren werden sie in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen einer konfluenten Flasche mit 1 ml EDTA-Trypsin abgelöst, in PBS aufgenommen und 3 min bei 800 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 2 ml FCS mit 10% DMSO aufgenommen und resuspendiert. Je 1 ml wurde in ein Kryo-Röhrchen überführt und in einer Nalgene-Einfriebox bei minus 80°C langsam eingefroren.

2.2.1.3 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Arbeit wurde als Transfektionsagens LipofectAMINETM2000 verwendet, eine Mischung kationischer Lipide. Werden Plasmide mit LipofectAMINETM2000 in Medium inkubiert, bilden

sich Mizellen, welche die Plasmide einschließen. Diese Mizellen können die Zellmembran überwinden wodurch die Plasmide in die Zelle transportiert werden.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die zu transfizierenden Zellen im Verhältnis 1:2 umgesetzt, damit sie sich in einer aktiven Wachstumsphase befanden. 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 wurden in 200 µl OptiMEM aufgenommen und mit dem LipofectAMINE™2000-Mix nach Ablauf der Inkubationszeit vereinigt, gemischt und 20 min bei RT inkubiert, wodurch sich Aggregate der kationischen Lipide mit den Plasmiden ausbilden. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Im Anschluss wurden die Zellen in Transfektionsmedium aufgenommen und bei 800 rpm für 3 min pelletiert. Die Zellen wurden in 10 ml Transfektionsmedium resuspendiert und in gewünschter Dichte (50-70%) ausgesät. Der LipofectAMINE™2000-DNA-Mix wurde tropfenweise dazu pipettiert und leicht geschwenkt. Die gebildeten Aggregate aus kationischen Lipiden und Plasmiden im LipofectAMINE™2000-DNA-Mix werden nun endozytotisch von den Zellen aufgenommen (Midoux u. a. 2009). Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank 6 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor das Transfektionsmedium gegen Infektionsmedium oder Kulturmedium ausgetauscht wurde.

2.2.1.4 Infektion von eukaryotischen Zellen

Einen Tag vor der Infektion wurden die Zellen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag zu ca. 80% konfluent waren. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit der gewünschten Virusverdünnung bzw. Virus-MOI (*multiplicity of infection*) infiziert. Virusverdünnungen wurden in PBS++/0,2% BSA angesetzt, 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. Dazu wurde die Zellzahl/ ml durch den Virusstocktiter PFU/ ml (*plaque forming units*) dividiert und mit der gewünschten MOI multipliziert.

$$\text{Bsp.: MOI } 2 \quad \frac{\text{Zellzahl/ ml im Kulturgefäß} \times 2 = \text{Volumen Virusstamm}}{\text{PFU/ ml}}$$

Die Zellen wurden 45 min bei RT inkubiert und alle 10 min geschwenkt, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit der entsprechenden Menge Infektions-MEM oder –DMEM überschichtet. Für die multizyklische Infektion von Zellen mit Influenza Viren wurde dem Medium, je nach Zelllinie, 0,2 – 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 inkubierten entsprechend der Versuchsanordnung bei 37°C im Brutschrank.

2.2.2 Arbeiten mit Influenza A Viren

2.2.2.1 Virusanzucht im Hühnerei

Influenza A Viren lassen sich im Allgemeinen sehr gut in der Allantoishöhle/-flüssigkeit (embryonale Harnblase) von 11-Tage-alten Hühnerembryonen vermehren. Influenza Viren, die in ihren Interferon-antagonistischen Eigenschaften eingeschränkt sind, replizieren dagegen besser in 6-Tage-alten Bruteiern, da deren Typ I IFN-System noch nicht vollständig ausgereift ist und somit die Virusreplikation begünstigt wird.

Um eine Befruchtung der Eier sicherzustellen wurden diese vor der Virusinokulation durchleuchtet. Daraufhin wurden die Eier mit 70% Ethanol desinfiziert und am stumpfen Ende im Bereich der Luftblase eine kleine Öffnung gebohrt. Durch diese Öffnung wurden daraufhin mit einer Kanüle (0,55 x 25 mm) 1000 pfu der Viren in 100 µl PBS⁺⁺ injiziert. Die Öffnung wurde mit Ponal-Klebstoff verschlossen und die Eier für 48 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Eier mindestens 6 h bei 4°C gekühlt, damit sich die Blutgefäße des Embryos zusammenzogen, um das blutfreie Abnehmen der Allantoisflüssigkeit zu erleichtern. Dazu wurde im Bereich der Luftblase vorsichtig aufgeschnitten und die Eihaut mit einer Pinzette abgezogen. Bei 11-Tage-alten Eiern wurde die Allantoisflüssigkeit mit einer Pipette abgenommen, wobei der Dottersack mit einem Spatel vor Verletzungen geschützt wurde. Bei 6-Tage-alten Eiern wurde die Allantoisflüssigkeit mit einer Kanüle abgenommen, da hier viel weniger Flüssigkeit geerntet werden konnte. Die Allantoisflüssigkeit wurde bei 1000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert, um grobe Partikel und mögliche Blutreste zu entfernen. Das Stockvirus wurde daraufhin 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 virale Oberflächenprotein Hämagglutinin (HA) bindet endständige Neuraminsäuren von Hühnererythrozyten, wodurch diese quervernetzt werden (Hirst 1941). Im HA-Test kann somit über den Vernetzungsgrad der Hühnererythrozyten eine erste Aussage über die Viruskonzentration gemacht werden. Mit diesem Test kann aber nicht zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Partikeln unterschieden werden, da auch Membrantrümmer und di-Partikel (*defective interfering particles*, nicht replikationsfähige Virionen) zur Agglutination beitragen können.

In eine 96-Kalotten-Platte mit V-förmigem Boden wurde in die erste Vertiefung der Reihe 100 µl Viruslösung vorgelegt und ab der zweiten Vertiefung 50 µl PBS. Ausgehend von den 100 µl Viruslösung 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. Daraufhin wurde in jede Vertiefung 50 µl 1% Hühnerblut pipettiert und gut vermischt. Der Ansatz inkubierte mindestens 30 min bei 4°C, um die Neuraminidaseaktivität zu hemmen. 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 Verdünnungsstufen angegeben, bei der gerade noch eine Hämagglutination beobachtet wird. Jedoch müssen mindestens 1×10^6 PFU/ml vorhanden sein, damit ein HA von 1 sichtbar ist.

2.2.2.3 *Plaqueassay zur Titerbestimmung von Influenza A Viren*

Mit Hilfe von Plaque-tests kann die Anzahl infektiöser replikationskompetenter Viruspartikel in einer Viruslösung bestimmt werden. In dieser Arbeit wurden zur Titer-Bestimmung Avicel Plaque-Tests durchgeführt. Der hierbei bestimmte Titer ist mit der Einheit „Plaque bildende Einheit“ („*plaque forming unit*“ (PFU)) angegeben, weil der Nachweis infektiöser Partikel über Löcher (Plaques) im Zellrasen erfolgt, die durch Lyse der infizierten Zellen entsteht. Für den Test wurden MDCKII Zellen in eine 12 Kalotten-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurden die zu 80% konfluenten Zellen mit der zu untersuchenden Viruslösung infiziert. Dafür wurden Virusverdünnungen von z.B. 10^{-1} bis 10^{-6} in PBS⁺⁺ hergestellt und je 150 µl der Verdünnung pro Kalotte als Inokulum verwendet. Während der Inkubationszeit von 45 min wurde die Platte alle 10 min geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Viruspartikel über die Kalotte zu erreichen. Danach wurde die Viruslösung abgenommen und die Zellen wurden pro Kalotte mit 1 ml Avicel Overlay Medium überschichtet. Dieses Medium verhindert die Virusdiffusion in Lösung. Die Platten wurden 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und durften nicht bewegt werden. Nach der Inkubationszeit wurde das Overlay Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um das Medium vollständig zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 500 µl 3% Formaldehyd/ 0,1% Kristallviolett bei RT für 30 min fixiert und gefärbt. Nach dem Abwaschen der Lösung mit H₂O konnten die Plaques gezählt und der Virustiter über Berechnung der entsprechenden Verdünnung in PFU/ ml bestimmt werden.

2.2.2.4 *Isolierung viraler RNA*

Um die Identität rekombinanter Viren zu bestimmen wurde die virale RNA aus dem Virusstock mit dem QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit von QUIAGEN nach Herstellerangaben isoliert. 100 µl der Allantiosflüssigkeit wurde mit 100 µl PBS verdünnt. Abschließend wurde die RNA mit 20 µl RNase-freiem ddH₂O aus der QIAamp MinElute-Säule eluiert.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 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. Diese Reaktion kann in einem Ansatz (OneStep RT-PCR) oder in zwei Ansätzen (TwoStep 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. Für den Nachweis der viralen NS-Segmente rekombinanter Influenza A/PR/8/YN-NS1 oder Influenza A/PR/8/YC-NS1 Viren wurde die vRNA in einer RT-PCR zunächst mit den Influenza A spezifischen Primern Uni12a und Uni12g in cDNA umgeschrieben und anschließend mit den NS-Segment-spezifischen Primern amplifiziert. Für den Nachweis zellulärer und viraler mRNA in RNA-Immunopräzipitationsversuchen wurde die mRNA in einer TwoStep RT-PCR zunächst mit einem Oligo(dT)-Primer in cDNA umgeschrieben und anschließend mit Sequenz-spezifischen Primern die cDNA der zellulären mRNA von GAPDH sowie der viralen mRNA von NP, NA und M in einer PCR amplifiziert.

OneStep RT-PCR

Ansatz:

	5 µl isolierte vRNA
+	10 µl 5 x Puffer
+	2 µl dNTPs (je 10 mM)
+	1 µl Primer Forward
+	1 µl Primer Reverse
+	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	
<hr/>			
Denaturierung	95°C	30 s	
Annealing	52°C	30s	35 Zyklen
Elongation	72°C	1 min pro 1000 bp	
<hr/>			
Nachsynthese	72°C	5 min	
Pause	4°C	∞	

TwoStep RT-PCR

Ansatz:

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

5 min bei 70°C, dann auf Eis

- + 4 µl 5 x Puffer
 - + 2 µl dNTPs (je 10 mM)
 - + 0,5 µl Rnasin
 - + ad 19 µl ddH₂O
-

5 min bei 37°C, dann auf Eis

- + 1 µl Reverse Transkriptase
-

weiter mit Cycler-Programm

Cycler-Programm

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

Für die anschließende PCR wurden je 2,5 µl der RT-Proben eingesetzt. Die PCR erfolgte in 25 µl Ansätzen wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben.

2.2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht es spezifisch DNA Abschnitte zu amplifizieren. Dazu werden zwei DNA-Oligonukleotide (Primer) und eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet. Die Primer hybridisieren aufgrund ihrer Sequenz an jeweils einen Strang des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. Durch aufeinander folgende Zyklen von Denaturierung, Anlagerung von Forward- bzw. Reverse-Primern (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. Desweiteren wurde die PCR für den Nachweis einer erfolgreichen Klonierung (Kolonie-PCR), das Amplifizieren von cDNA im RIP-Assay benutzt.

Ansatz:

10 µl 5 x Puffer (15 mM MgCl₂)
+ 0,5 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
+ 1,5 µl Primer Forward
+ 1,5 µl Primer Reverse
+ 30-100 ng Template

ad 50 µl ddH₂O

Cycler-Programm

Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	30 s	
Annealing	50-60°C	30 s	25-35 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 Klonierungserfolgs wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurde eine zu untersuchende Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in ein PCR-Reaktionsgefäß mit einer entsprechenden 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.

2.2.3.3 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die DNA an definierten Nukleotidsequenzen schneiden und abhängig vom Restriktionsmuster unterschiedliche Enden generieren. Zur Subklonierung von DNA-Fragmenten in die jeweiligen Zielvektoren wurden beide so geschnitten, dass an deren Termini komplementäre Nukleotidüberhänge erzeugt wurden, welche die Ligation ermöglichten. Desweiteren wurde der Restriktionsverdau mit DpnI durchgeführt um parentale DNA Stränge bei der zielgerichteten Mutagenese von Plasmid-DNA zu verdauen. Für die Reaktionen wurden im Allgemeinen 1-2 U Enzym sowie entsprechende Mengen eines 10 x Restriktionspuffer nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden 2-16 h bei 37°C inkubiert.

2.2.3.4 Reinigung und Aufkonzentrierung 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 gereinigt. Die DNA wurde in 20 µl ddH₂O eluiert.

2.2.3.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Die Agarosegel-Elektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe. In dieser Arbeit wurden 1 – 1,5 %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 Auftragen 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 90-100 V. Die DNA wurde anschließend auf einem Transilluminator über UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.3.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Um DNA-Fragmente distinkter Größe aus einem Gemisch von DNA-Fragmenten zu isolieren wurden die Fragmente zuerst 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 in 20 µl ddH₂O eluiert.

2.2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Besitzen das verdaut DNA-Fragment und der geschnittene 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 2h 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
<hr/>	
	ad 20 µl ddH ₂ O

2.2.3.8 Transformation kompetenter *E.coli*

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 45 s bei 42°C und 2 min Inkubation auf Eis wurden die Ansätze mit 450 µl vorgewärmten SOC-Medium versetzt und bei 37°C für 45 – 90 min auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden unterschiedliche Mengen der Bakteriensuspension auf Antibiotika-enthaltende LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.3.9 Plasmidpräparation

Zu der Präparation von Plasmiden aus Bakterien wurde das Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit von Invitex für kleine Kulturvolumen und das QIAfilter Plasmid Maxi Kit von QIAGEN für größere Kulturvolumen benutzt.

Miniprep

Zunächst wurden Kolonien von der Platte in 3 ml 2xYT-Medium mit Ampicillin bzw. Kanamycin überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von den Übernachtskulturen wurden je 2 ml für 10 min 13.000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Bakterienpellet entsprechend den Anweisungen des Herstellers weiterbearbeitet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien, anschließender Neutralisation und Einstellung auf Hochsalz-Bindungsbedingungen. Die Plasmid-DNA wird dann spezifisch an die Silicagelmembran einer Säule gebunden und mit ethanolhaltigem Puffer

gewaschen. Da bei Niedrigsalzbedingungen und pH 7,0 bis 8,5 die Membran DNA nicht mehr bindet, kann mit Wasser eluiert werden. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgt mit 50 µl ddH₂O.

Maxiprep

Mit dieser Methode können größere Mengen Plasmid-DNA aufgereinigt werden. Dazu wurden 100 µl der Miniprep, oder eine Kolonie einer LB-Platte, in 200 ml 2xYT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotika-Zusatz überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterienkulturen wurden mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit entsprechend den Herstellerangaben weiter bearbeitet. Die Bakterien werden durch alkalischen Puffer lysiert und dann neutralisiert. Nachdem das Präzipitat aus Bakterienhülle und Proteinen über eine QIAfilter-Patrone herausgefiltert worden ist, bindet die Plasmid-DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen an die Anionentauschersäule. Verunreinigungen werden durch Waschen mit einem Puffer mittleren Salzgehalts entfernt. Mit einem Hochsalzpuffer wird die DNA eluiert und mit Isopropanol gefällt um die DNA zu entsalzen. Nach einem weiteren Waschschrift mit 70%-igem Ethanol kann die DNA in Wasser aufgenommen werden. Die DNA-Konzentration wurde durch Spektralphotometrie (Abschnitt 2.2.3.10) ermittelt und auf 1 µg/µl eingestellt.

2.2.3.10 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

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

$$\text{Optische Dichte (OD)} = \text{Absorption (A}_{260}) = \frac{\text{Transmission}_{\text{Probe}}}{\text{Transmission}_{\text{Lösungsmittel}}}$$

Die zu messende DNA-Probe wurde mit sterilem ddH₂O verdünnt. Über den Absorptionswert (A₂₆₀) wurde die Konzentration mit folgender Formel berechnet.

$$1\text{OD} = 50 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{DNA-Konzentration}[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{260} \times 50\mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}/1000$$

2.2.3.11 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, Nicklen, und Coulson 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'-Hydroxylgruppe am ddNTP zum Kettenabbruch. Der Einbau der Didesoxyribonukleotide ist zufällig. Daher liegen nach entsprechender Zyklanzahl Abbruchfragmente jeder möglichen Nukleotidzahl vor, welche über ein denaturierendes Polyacrylamidgel ihre 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 richtet 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:

	x µl DNA-Template
+	0,5 µl Primer (20 µM)
+	1,0 µl BigDye 3.1
<hr/>	
	ad 10 µl ddH ₂ O

Cycler-Programm:

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

2.2.3.12 Herstellung der pEYN, pEYC und pEYFP Plasmide zur Durchführung des BiFC Assays

Ziel war die Herstellung von pEYN, pEYC und pEYFP Expressionsplasmiden, die entweder die kodierenden Sequenzen von SF2/ASF, Aly, UAP56 und NS1 oder Varianten davon beinhalten. Dazu wurden die kodierenden Sequenzen aus den jeweiligen Vektoren pEGFP-ASF/SF2, pcDNA-myc/HIS-Ref (Aly), pLP-EGFP-C1-UAP56 und pcDNA-NS1 anhand spezifischer Primer durch PCR amplifiziert. Die in der PCR erzeugten Fragmente trugen terminal die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XbaI* (Abb. 3.2) und wurden über diese Schnittstellen in die Vektoren pEYN, pEYC und pEYFP eingefügt. Nach Transformation in *E.coli* XL1-blue Zellen und Isolation von Plasmid-DNA in der Miniprep wurden positive Klone durch Restriktionsverdau identifiziert und anschließend durch Sequenzierung bestätigt.

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

Für die Konstruktion der Plasmide pGex-SF2/ASF, pGex-Aly, pGex-NS1, pGEX-NS1 1-73, pGex-NS1 74-230 wurden die kodierenden Sequenzen von SF2/ASF, Aly, NS1, NS1 1-73 bzw. NS1 74-230 aus den entsprechenden Vektoren pEGFP-SF2/ASF, pcDNA3MycHisA-REF bzw. pcDNA-NS1 durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pGex5X.1 inseriert.

2.2.3.14 Isolierung von RNA durch Phenol-Chloroform Extraktion und Ethanolfällung

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-Immunopräzipitationsversuchen 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 13.000 rpm zentrifugiert und anschließend die obere RNA-haltige wässrige Phase in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Bei sehr hohem Proteingehalt der Proben wurde der Vorgang wiederholt. Für die Fällung der RNA wurden die Proben mit 1/10 Vol. Natriumacetat (3 M), 1 µl Glycogen und 2,5 Vol. 100% Ethanol (4°C) versetzt, durchmischt und anschließend mindestens 1 h bei -20 °C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend luftgetrocknet. Die RNA wurde in 10 µl RNase-freiem ddH₂O aufgenommen.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Analyse der Virusreplikation auf Zellkultur

Um Viren hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit auf mit verschiedenen siRNA behandelten Zellen charakterisieren zu können, wurden diese wie in Abschnitt 2.2.1.5 beschrieben mit einer MOI von 0,01 infiziert. 6, 12, 24, 36 und 48 h nach Infektion wurden 100 µl des Zellüberstandes entnommen und durch frisches Infektionsmedium ersetzt. Die so erhaltenen Proben wurden nach einmaligem Einfrieren bei -80°C für den in Abschnitt 2.2.2.3 beschriebene Avicel-Plaquetest verwendet, um den Virustiter in PFU/ml zu bestimmen.

2.2.4.2 Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation (BiFC)

Zuerst beschrieben wurde diese Assay von Gosh und Kollegen (I. Ghosh, Hamilton, und Regan 2000). In dieser Arbeit wurde ein leicht geändertes Protokoll benutzt, das von Hu und Kollegen publiziert wurde (Hu, Chinenov, und Kerppola 2002; Kerppola 2006). Zellen für das BiFC-Assay wurden einen Tag vor Transfektion in Kulturschalen auf Deckgläschen ausgesät. Die Transfektion erfolgte wie in 2.2.1.4 beschrieben, dabei wurden pro 35 mm Zellkulturschale je 2,5 µg Plasmid-DNA pro Konstrukt transfiziert, 5 µg Plasmid-DNA insgesamt. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen nicht oder mit Influenza A PR/8 je nach Versuchsansatz mit einem MOI von 3 oder 5 infiziert und 5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 2-3 h bei 30°C inkubiert um die Reifung der BiFC-Komplexe zu ermöglichen und dann wie in 2.2.4.3 analysiert.

2.2.4.3 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Zellen für die Immunfluoreszenzanalyse wurden in Kulturschalen auf Deckgläschen ausgesät. Nach entsprechender Behandlung der Zellen (Infektion und/ 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. An den sekundären Antikörper war ein Fluoreszenzfarbstoff (Alexa-Farbstoff) gekoppelt, welcher nach Anregung mit Licht einer spezifischen Wellenlänge (488 oder 594 nm) durch Fluoreszenzmikroskopie detektiert wird. 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 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 1 h mit dem sekundären Antikörper entsprechend der vorherigen Beschreibung im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend kurz in ddH₂O getaucht. Auf einen Objektträger wurden 4 µl Mowiol vorgelegt. Die Präparate wurden im

Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Die so markierten Proteine wurden in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht und charakterisiert.

2.2.4.4 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Für die Charakterisierung der Interaktionsstudien mittels des BiFC-Assays wurde in dieser Arbeit die konfokale Laser Scanning Mikroskopie verwendet. Dafür wurde das konfokale Laser Scanning Mikroskop 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 zellenweise 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. Die Proben wurden entsprechend Abschnitt 2.2.4.3 vorbereitet. Für die in dieser Arbeit gezeigten Bilder wurde das Objektiv C-Apochromat 63/1.2 water objective lens von Zeiss benutzt und über die Software „Zeiss LSM Image Browser 3.5“ eine zusätzliche zweifache Vergrößerung des Bildausschnittes erreicht. Im Anschluss wurden die Daten mit der Software „Adobe Photoshop CS3 extended“ prozessiert.

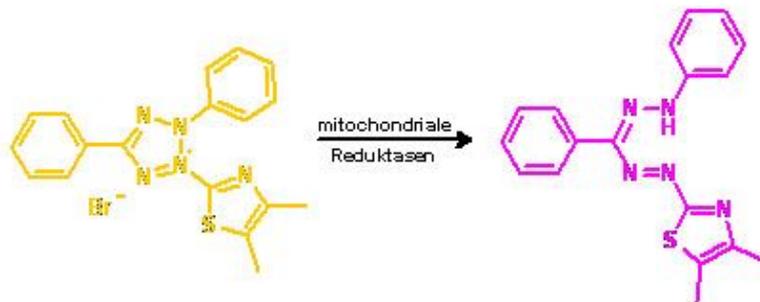
2.2.4.5 Luziferase-Reporter-Gen-Test

Um die Wirkung des zellulären Proteins SF2/ASF auf virale Transkripte zu untersuchen, wurden Versuche mit dem Dualen Luziferase-Kit (Promega) durchgeführt. Dazu wird ein Plasmid mit der genetischen Information für ein virales Segment, wobei dieses das Luziferasegen (hier aus dem Leuchtkäfer (Firefly)) enthielt, sowie ein weiteres Plasmid, von dem konstitutiv eine andere Luziferase-mRNA (hier aus der Gemeinen Seefeder (Renilla)) transkribiert wird, in die zu untersuchenden Zellen kotransfiziert. Anhand der konstitutiv exprimierten Luziferase wird eine mögliche unterschiedliche Transfektionseffizienz über verschiedene Ansätze korrigiert und die Expression der Reporter-Gen-Luziferase ermöglicht Aussagen zu der Aktivität des viralen Reportertranskripts unter den Versuchsbedingungen. Die Luziferaseexpression wird dabei indirekt über deren Aktivität in entsprechenden Zelllysaten bestimmt. Um zu untersuchen, ob die Ko-Expression von NS1 oder SF2/ASF eine Aktivierung der Transkription/ Translation des viralen Reporterkonstrukts auslöst, wurden neben den viralen Polymerasekonstrukten PB1, PB2, PA und NP – die in allen Versuchsansätzen enthalten waren – zusätzlich NS1 und/ oder SF2/ASF Expressionsplasmide je Vertiefung einer 12-Kalottenplatte in 293T Zellen kotransfiziert (NS1 und SF2/ASF wurden dabei in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben: 50, 100, 250 oder 500 ng; wurden beide Expressionsplasmide in einen Ansatz gegeben wurde nur SF2/ASF in steigenden Konzentrationen zugegeben, NS1 hingegen konstant mit 100 ng). 24

Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivitäten entsprechend dem Herstellerprotokoll bestimmt. Da sich 293T Zellen leicht vom Zellkulturgefäß lösen, wurden die Zellkulturplatten vor den Versuchen mit poly-D-Lysin behandelt.

2.2.4.6 Zytotoxizitäts-Test (MTT Test)

Um die Zytotoxizität von siRNA Behandlungen auf die Zellen zu überprüfen wurde ein MTT-basiertes Proliferationsassay durchgeführt, bei dem der Nachweis der Zellvitalität auf der Reduktion eines gelben, wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT) in ein violettes, wasserunlösliches Formazan beruht (Abb. 2.1). Die mitochondriale Dehydrogenase der Zellen ist in der Lage, das gelbe Tetrazoliumsalz in das violette Formazan umzuwandeln. Mit geeigneten Reagenzien konnte das Formazan aus den Zellen gelöst werden und photometrisch bestimmt werden, dabei korrelierte die gemessene Konzentration an Formazan mit dem Proliferationsverhalten der Zellen.



(<http://www.baltic-analytics.de/Index.php?id=39>)

Abb. 2.1: Reduktion von MTT zu Formazan. Die zelluläre mitochondriale Dehydrogenase wandelt das gelbe Tetrazoliumsalz (MTT) in das violette Formazan um. Über photometrische Bestimmung konnte die Konzentration an Formazan bestimmt werden, welche proportional zur zellulären Proliferation war.

293T-Zellen wurden in eine 96-Kalotten Platte ausgesäet, so dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 30% aufwiesen. Es folgte eine Transfektion mit unterschiedlichen Konzentrationen (25, 50 und 100 pMol) der jeweiligen siRNAs, deren Einfluß auf die Zell-Zytotoxizität überprüft werden sollte. Als weitere Kontrollen wurden unbehandelte Zellen sowie DMSO-behandelte Zellen mitgeführt. 24 Stunden nach Transfektion der siRNAs wurden zu jeder Kalotte 10µl des MTT-Reagenz pipettiert. Die Ansätze wurden daraufhin für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Die folgende Zugabe von 100µl MTT-Detergenz löste das gebildete, ausgefallene Formazan und ermöglichte die photometrische Analyse. Die gemessene Absorption bei 570nm war proportional zur Zellzahl und ermöglichte somit einen Rückschluß auf die Zell-Viabilität.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Herstellung von Zelllysaten

Um die Proteinexpression mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunoblot nachzuweisen bzw. analysieren zu können, mussten zunächst Lysate der transfizierten bzw. infizierten Zellen hergestellt werden. Alle Arbeiten wurden dazu auf Eis oder bei 4°C durchgeführt und nur eiskalte Puffer verwendet. Zunächst wurden die Zellen 2 x gründlich mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation für 4 min bei 1.500 rpm und 4°C wurde das Pellet mit dem RIPA-Lysisbuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde daraufhin bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und gleich weiter verarbeitet oder nach Zugabe von SDS-Probenpuffer bei -20°C gelagert.

2.2.5.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Denaturierung und Ladungsausgleich (durch β -Mercaptoethanol und SDS) aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt werden.

Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele:

Bestandteile	Trenngel	Sammelgel
	12,5%	5%
30 % Acrylamid/Bis (29:1)	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
H ₂ O	3,2 ml	2,8 ml
10 % SDS	100 μ l	50 μ l
10 % APS	100 μ l	50 μ l
TEMED	6 μ l	6 μ l

Zunächst wurden die Glasplatten mit Ethanol gereinigt und dann in das BioRAD Mini-Protean-3 System eingesetzt. Die verwendeten Glasplatten hatten einen Abstand von 75 mm bzw 150 mm, was somit auch der Geldicke entsprach. Das Trenngel-Gemisch wurde entsprechend der

Angaben angesetzt und ungefähr zu $\frac{3}{4}$ in die Vorrichtung gegossen. Das noch flüssige Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, damit das Gel gleichmäßig polymerisierte. Sobald das Acrylamid polymerisiert war wurde das Isopropanol abgekippt, das Sammelgel eingefüllt und der Kamm zum Freihalten der Taschen eingesteckt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in eine Miniprotein-Gelkammer eingebaut, der 1x SDS-Elektrophoresepuffer wurde eingefüllt und der Kamm wurde gezogen. Die Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C aufgeköcht, kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Pro Gel wurde eine Stromstärke von 25 mA angelegt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, nachdem die Frontmarkerbande (Bromphenolblau) aus dem Gel herausgelaufen war.

2.2.5.3 Immunoblot

Nach der Auftrennung von Proteinen durch die SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese wurden sie mit Hilfe des Semidry-Blotverfahrens (BioRAD-Kammern) auf eine Nitrozellulose Membran transferiert. Dazu wurde das Gel, die Membran und Whatman-Papiere in Demidry-Blotting Puffer äquilibriert. Danach wurde die Apparatur wie folgt aufgebaut: Anode, 3 x 3 mm Whatman-Papier, Nitrozellulose-Membran, Gel, 3 x 3 mm Whatman-Papier, Kathode. Die Proteine wurden für 55 min bei 75 mA pro Gel auf die Membran transferiert. Die Membran wurde 1 h in 5% Magermilchpulver in 1 x TBST blockiert. Nach einmaligem Waschen mit 1 x TBST wurde die Membran mit dem primären Antikörper in 0,5% Magermilchpulver in 1 x TBST für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C unter ständigem Schwenken inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit 1 x TBST für je 10 min entfernt. Daraufhin wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem sekundären Spezies-spezifischen Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Antikörper in 0,5 & Magermilchpulver in 1 x TBST inkubiert. Die Verdünnungen der jeweiligen Antikörper sind in Abschnitt 2.1.13 angegeben. Überschüssiger Sekundär-Antikörper wurde durch sechsmaliges Waschen für jeweils 5 min mit 1 x TBST entfernt. Die Membran wurde mit dem SuperSignal WestDura Extended Duration Substrat 5 min inkubiert. Dabei wird durch die Oxidation des Substrats eine Chemilumineszenz ausgelöst. Diese Chemilumineszenz konnte durch die Schwärzung eines Röntgenfilms (Autoradiographie) nachgewiesen werden.

2.2.5.4 Fixieren und Trocknen von SDS-PAA Gelen

Für den direkten Nachweis von Proteinen im PAA-Gel durch Autoradiographie nach radioaktiver Markierung oder Coomassie-Färbung wurden die Gele zunächst für 30 min in Fixierlösung geschwenkt. Für eine Coomassie-Färbung wurden die Gele anschließend für mindestens 3 h oder über Nacht in Coomassie Brilliant Blau R250-Färbelösung geschwenkt. Zur Entfärbung des Hintergrunds wurde das Gel dann mehrere Stunden in Entfärberlösung, danach kurz in Wasser geschwenkt, auf zwei Lagen Whatman-Papier gelegt, mit Haushaltsfolie abgedeckt und auf dem Geltrockner Phero-temp 40 nach Anlegen eines Vakuums bei 75°C für 1 h getrocknet.

Radioaktiv markierte Proteine wurden durch das Auflegen von Röntgenfilmen oder einer Phosphorimager-Platte auf die getrockneten Gele detektiert.

2.2.5.5 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden die pGex-Konstrukte pGex5X-1, pGex-SF2/ASF, pGexALY, pGex-UAP56, pGex-Y14, pGex-TAP/NXF1, pGex-NS1 1-73 und pGex-NS1 74-230 in *E.coli* BL26 transformiert. 50 ml Übernachtskultur wurden in 450 ml vorgewärmtes (30°C) LB-Amp-Medium gegeben und nach zweistündiger Inkubation bei 30°C wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) zur Kultur induziert. Die Kultur wurde weitere 4 h bei 30°C geschüttelt und anschließend 15 min bei 6.000 x g und 4°C zentrifugiert. 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 10.000 g und 4°C wurde der geklärte Überstand mit 300 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. Die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen wurde von Fagerlund und Kollegen beschrieben (Fagerlund u. a. 2005).

2.2.5.6 In vitro Translation

Zur radioaktiven 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 pcDNA-NS1, pcDNA-NS1Δ19-38 und pcDNA-NS1 RNA mut. Während der Translation wurde in die entsprechenden Peptidketten radioaktives [35S]-Methionin eingebaut.

Für Versuche mit RNaseA-Behandlung wurden die *in vitro* Translationsansätze ohne RNasin angesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 90 min bei 30°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 12.000 rpm und 4°C geklärt.

Ansatz

	25 µl Reticulozytenlysat
+	2 µl Puffer
+	1 µl Aminosäuremix ohne Methion
+	4 µl [³⁵ S]-Methionin (10 mCi/ml)
+	1 µl Rnasin
+	1 µl T7 Polymerase
+	1 µg Plasmid-DNA

ad 50 µl RNase-freies ddH₂O

2.2.5.7 GST-Kopräzipitationsassay

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 GST-Fusionsprotein gekoppelte 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 1 µg/µl RNaseA für 15 min bei 33°C inkubiert. Anschließend wurde der Bindungsansatz auf 1 ml mit HEPES-Bindungspuffer aufgefüllt und dann mit RNaseA-behandeltem *in vitro* Translationsansatz wie vorher beschrieben inkubiert. Für Versuche mit Lysaten infizierter Zellen wurde pro Bindungsansatz eine 10 cm Schale in 500 µl CoIP-Puffer lysiert. Das geklärte Lysat wurde auf 1 ml mit dem CoIP-Puffer aufgefüllt und wie zuvor beschrieben die GST-Fusionsprotein gekoppelte Glutathion-Sepharose Suspension dazugegeben und inkubiert. Bindungsansätze mit rekombinantem Protein wurden in 1 ml HEPES-Bindungspuffer angesetzt. Für jeden Ansatz wurden 50 µg aufgereinigtes, rekombinantes Protein dazupipettiert und die GST-Fusionsprotein gekoppelte Glutathion-Sepharose Suspension wie vorher beschrieben. Nach Inkubation wurde die Matrix bei 3.000 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 V3.1 ausgewertet. Bindungsreaktionen die mit Lysaten oder rekombinantem

Protein durchgeführt wurden, wurden nach der Auftrennung im PAA-Gel mittels Western Blot-Analyse ausgewertet.

2.2.5.8 Ko-Immunpräzipitation

In dieser Arbeit wurde eine Ko-Immunpräzipitation mit NS1 und SF2/ASF bzw. Aly durchgeführt. Diese Methode dient dem Nachweis einer *in vivo* Interaktion zwischen Proteinen.

Am Vortag in 10 cm Schalen ausgesäte 293T-Zellen wurden wie in 2.2.1.5 beschrieben nicht oder mit Influenza A PR/8 und einer MOI von 10 infiziert. Nach 6 stündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Lyse der Zellen. Dazu wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 1.500 rpm für 3 min und bei 4°C pelletiert, in 500 µl SR IP Puffer resuspendiert und 30 min auf Eis lysiert. Die Lysate wurden bei 4°C und 13.000 rpm für 15 min geklärt. 50 µl des Lysates wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und als Input-Proben im Western Blot analysiert. Parallel zur Zelllyse erfolgte die Kopplung des NS1-spezifischen Kaninchen-Antiserums bzw des Präimmun Kaninchen-Antiserums an Protein G Agarose. Pro Ansatz wurden 30 µl Protein G Agarose zunächst dreimal mit SR-Wash-Puffer gewaschen und in 500 µl SR-Wash-Puffer pipettiert. Je Ansatz wurde 1 µl des jeweiligen Antiserums zugegeben und die Reaktionsansätze wurden mindestens 2 h bei 4°C sanft rotierend inkubiert. 500 µl geklärtes Proteinlysat wurde zu dem Protein G-Agarose Ansatz pipettiert und für 3 h bei 4°C sanft rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Agarose bei 10.000 g und 4°C für 10 s pelletiert und der Überstand abgenommen. Die Agarose wurde dreimal dreimal mit je 1 ml SR-Wash-Puffer gewaschen und die gebundenen Proteine in 30 µl SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend mittels Western Blot-Analyse ausgewertet.

2.2.5.9 RNA-Immunpräzipitation

Dieses Assay wurde benutzt, um eine Interaktion des viralen NS1 Proteins und des zellulären SF2/ASF Proteins mit viraler mRNA zu untersuchen. Dafür wurde das NS1 Protein, bzw. das SF2/ASF Protein mit spezifischen Antikörpern aus infizierten Zelllysaten immunopräzipitiert und anschließend gebundene RNA-Moleküle isoliert und durch RT-PCR nachgewiesen.

6×10^6 A549 Zellen wurden nicht oder mit Influenza A PR/8 mit einer MOI von 3 infiziert (s. 2.2.1.5). 6 h nach der Infektion wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 1 ml PBS mit einem Zellschaber abgekratzt und dann für 3 min bei 1.000 rpm und 4°C pelletiert. Die Zellen wurden in 500 µl RIP-Lysispuffer für 25 min auf Eis lysiert und die Lysate anschließend für 10 min bei 12.000 rpm und 4°C geklärt. 15 µl Lysat wurden mit 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min 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 6×10^6 Zellen, für die Analyse im Western Blot die Lysate von $3 \times$

10⁶ Zellen in die Immunopräzipitation eingesetzt. Die Ansätze wurden auf 1 ml mit RIP-NT2-Puffer aufgefüllt und über Nacht mit 1 µl NS1-spezifischem Kaninchen-Antiserum bzw. Präimmun-Kaninchen Antiserum, oder mit 1 µl SF2/ASF-spezifischem monoklonalem Antikörper bzw. einem Kontroll-Antikörper dreimal bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze mit 30 µl eine Protein G-Agarose Suspension (1:1 in PBS) für 3 h 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 min bei 95°C inkubiert. Die weiteren Analysen erfolgten wie in 2.2.5.2 und 2.2.5.3 beschrieben. Für den Nachweis der immunopräzipitierten RNA wurde die Matrix in 100 µl RIP-NT2-Puffer mit 5 µl RQ1 RNase-Free DNase für 10 min 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 Proteinkinase K bei 55°C für 30 min inkubiert. Die Proben wurden auf 200 µl mit RIP-NT2-Puffer aufgefüllt. Die RNA wurde wie in 2.2.3.1 und 2.2.3.14 beschrieben isoliert und gereinigt und anschließend in der RT-PCR analysiert.

2.2.5.10 Fraktionierung

Um getrennte Detektion von Proteinen und RNA aus dem Cytoplasma und dem Nukleus von Zellen zu ermöglichen wurde eine Fraktionierung durchgeführt. Hierfür wurde das Protein And RNA Isolation System (PARIS™ Kit) von Applied Biosystems benutzt. 1x10⁶ zuvor transfizierte 293T-Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann in 1 ml eiskaltem PBS abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt und pelletiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in 300 µl eiskaltem Fraktionierungspuffer vorsichtig resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nachdem die Proben für 5 Minuten bei 500 x g und 4°C zentrifugiert wurden, konnte der Überstand, der der cytoplasmatischen Fraktion entsprach, in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden. Die Proteinlysate wurden durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 2 Minuten bei 4°C von Zelltrümmern gereinigt. Das nukleare Pellet wurde vorsichtig mit Fraktionierungspuffer gewaschen und erneut pelletiert, der Überstand verworfen. Die Lyse des nuklearen Pellet erfolgte in 300 µl eiskaltem Disruption-Puffer. Die Proben inkubierten 10 Minuten auf Eis und wurden dann bei 4°C für 2 Minuten bei 13.000 rpm geklärt und in ein frisches Eppendorfgefäß pipettiert. Die Proteinlysate wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Zur Isolierung der RNA aus den cytoplasmatischen und der nuklearen Proteinlysaten wurden jeweils 150 µl der Lysate entnommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Während alle Arbeitsschritte mit den Proteinlysaten auf Eis stattfanden und auch die Puffer eiskalt waren, so wurde die RNA Isolierung bei RT durchgeführt. Die Lysate wurden zuerst mit demselben Volumen an 2 X Lysis/Binding Solution vermischt. Waren die Lysate zu viskos wurden sie fünfmal durch eine G26-Nadel pipettiert, um eine Verstopfung des Filters zu vermeiden. Danach wurden 150 µl 100% Ethanol zu den Proben gegeben, gemischt und auf einen Filter pipettiert. Die Filter wurden einmal mit 700 µl Wash Solution 1 und zweimal mit je

500 µl Wash Solution 2/3 gewaschen. Eluiert wurde die RNA in zwei Schritten, bei dem ersten wurden 30 µl und bei dem zweiten Durchgang 10 µl 95°C heißer Elution Solution verwendet. Bevor die RNA für RT-PCR eingesetzt werden konnte wurde diese mit einer Lithium Chlorid Solution präzipitiert, um die RNA zu konzentrieren und um DNA Verunreinigungen zu entfernen. Es wurden 40 µl eluierte RNA mit 20 µl LiCl-Solution vermischt. Die Proben inkubierten eine Stunde bei -20°C bevor sie für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert wurden. Das RNA Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das RNA Pellet wurde luftgetrocknet und in 10 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die RNA wurde bei -80°C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.



3 Ergebnisse

Trotz intensiver Forschung ist bis heute nicht vollständig geklärt, auf welche Weise Influenza Viren ihre virale mRNA aus dem Zellkern exportieren. Im viralen Replikationszyklus ist dieser Schritt von großer Bedeutung, da nur durch effizienten mRNA Export die Proteinsynthese und Virusvermehrung gewährleistet wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Fragestellung vor allem im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung des NS1 Proteins der Influenza A Viren untersucht.

3.1 Etablierung eines bimolekularen Fluoreszenz

Komplementations Assays zur Untersuchung von Interaktionen des viralen NS1 Proteins mit zellulären Faktoren

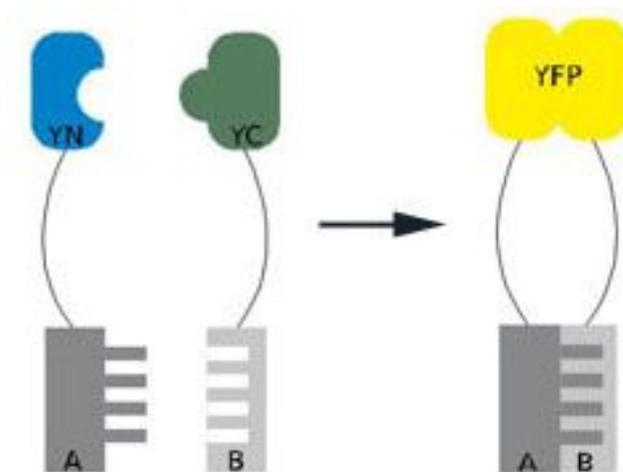


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des BiFC Prinzips. YN: N-terminales Fragment des YFP; YC: C-terminales Fragment des YFP; A, B: potentiell interagierende Proteine. Das YN- und YC-Fragment wurde über Klonierung an die potentiell interagierenden Proteine A und B fusioniert. Kommt es bei einer Ko-Expression zur Interaktion beider Proteine miteinander so gelangen ebenfalls die YN- und YC-Fragmente nah zusammen. Dies bewirkt eine bimolekulare Fluoreszenzkomplementation und somit die Rekonstruktion des YFP durch die beiden Fragmente. Nach Anregung ist ein Fluoreszenzsignal detektierbar.

Um verschiedene zelluläre mRNA Exportfaktoren auf eine Interaktion mit dem viralen NS1 Protein zu untersuchen, wurde die Methode der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) angewendet. Zuerst beschrieben wurde das Assay von Ghosh und Kollegen (I. Ghosh, Hamilton, und Regan 2000). Dabei wurde das autofluoreszierende GFP (green fluorescent protein) in ein N- und ein C-terminales Fragment geteilt und die Fragmente mit Leucin Zippern fusioniert. Die Heterodimerisation der antiparallelen Leucin Zipper in *E.coli* resultierte in einer Reformation des GFP und konnte dementsprechend visualisiert werden. Zwei Jahre später wurde die Methode für das autofluoreszierende YFP (yellow fluorescent protein) beschrieben

(Hu, Chinenov, und Kerppola 2002). . Eine schematische Darstellung des BiFC Prinzips ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Diese plasmid-basierte Methode bot die Möglichkeit mehrere potentielle Interaktionspartner durch ein rekonstituiertes Fluoreszenzprotein in sowohl lebenden, als auch fixierten intakten Zellen schnell zu untersuchen. Eine zusätzliche Anfärbung oder eine Detektion mit Antikörpern war nicht notwendig. Ein großer Vorteil dieser Methode ist die direkte Visualisierung der Protein-Protein Interaktion in der Zelle, was eine direkte Zuordnung zu einem zellulären Kompartiment dieser ermöglicht. Zur Untersuchung möglicher Interaktionen zwischen zellulären mRNA Export Faktoren mit dem viralen NS1 Protein wurden im Rahmen dieser Arbeit die cDNAs der mRNA Exportfaktoren SF2/ASF, Aly und UAP56 sowie des viralen NS1 mittels PCR amplifiziert und in die jeweiligen Vektoren pEYN, pEYC und pEYFP kloniert (Abb. 3.2). Die Vektoren pEYN-TAP/NXF1 und pEYC-Y14 wurden von Ute Schmidt (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

3.1.1 Kontrolle der Fusionskonstrukte und Überprüfung des BiFC

Assays

Nach der Klonierung der benötigten Expressionskonstrukte zur Expression der YN-, YC- und YFP-Fusionsproteine (Abb. 3.2) wurde zuerst die Expression der Fusionsproteine getestet und die notwendigen Kontrollen zur Überprüfung des BiFC Assays durchgeführt. Während die YFP-Fusionsproteine direkt anhand ihrer Autofluoreszenz in der Mikroskopie analysiert werden konnten (Abb. 3.3), musste in den BiFC Assays ein Reifungsschritt durchgeführt werden, um die Reformation des YFP-Proteins aus den YN- und YC-Fragmenten zu ermöglichen. Die Assays wurden HeLa Zellen durchgeführt, die sich gut transfizieren ließen und ebenfalls gut für die Mikroskopie geeignet waren. Die Zellen wurden mit einer Kombination eines YN-/ und YC-Expressionskonstruktes transfiziert. 24 Stunden danach wurde ein Teil der Zellen mit Influenza A/PR/8/34 infiziert und zunächst 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Es folgte der Reifungsschritt zur Reformation des YFP-Proteins durch eine Inkubation für zwei Stunden bei 30°C. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Danach konnte anhand einer Immunfluoreszenz-Färbung mit einem primären antiGFP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten Antikörper die Transfektion des YC-Fusionsproteins kontrolliert werden. Um die Influenza-Infektion der Zellen nachzuweisen wurde mit einem Protein-spezifischen monoklonalem NP Antikörper und ebenfalls mit einem sekundären Alexa-594 gekoppelten Antikörper das virale NP Protein gefärbt. Um sicherzustellen, dass diese Reformation des YFP nur zustande kam, wenn die Fusionsproteine miteinander interagierten, oder sehr nah beieinander platziert waren – beispielsweise als Teil eines größeren Komplexes – wurden Kontrollen zur Sicherstellung der Spezifität des Assays durchgeführt. Dazu gehörte die Überprüfung, dass von einzeln exprimierten YC-/ oder YN-Fusionsproteinen keine Autofluoreszenz ausging (Abb. 3.4).

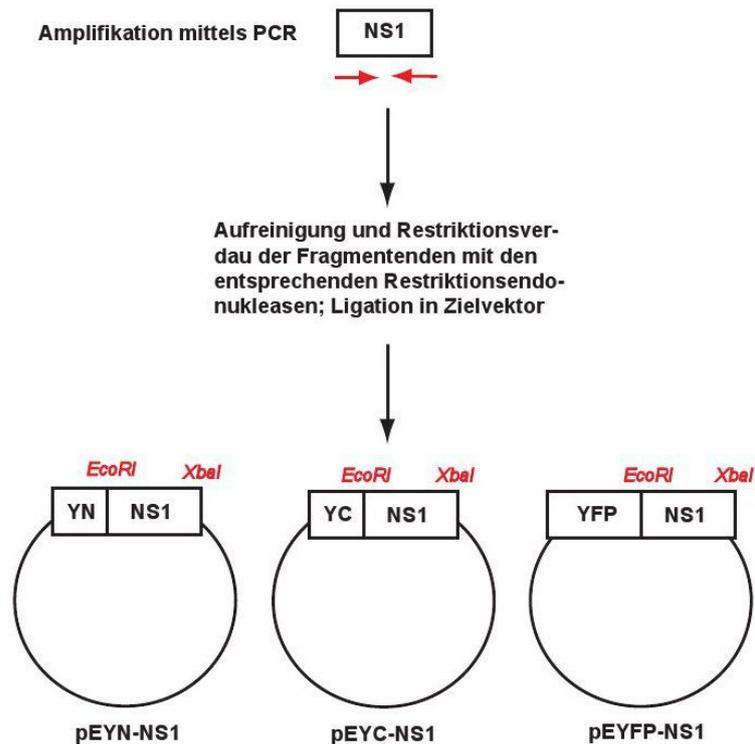


Abb. 3.2: Arbeitsschritte der Klonierung der Konstrukte für das BiFC Assay. Beispielhafte Darstellung der Klonierung der YN-, YC-, und YFP-Expressionskonstrukte anhand der Klonierung von NS1 cDNA. Nach der Amplifikation der cDNA in einer PCR wurden die Fragmentenden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut und aufgereinigt. Parallel wurden ebenfalls die Zielvektoren mit denselben Enzymen verdaut. Es folgte die Ligation von Fragmenten und Zielvektoren. Eine erfolgreiche Klonierung wurde durch Kolonie-PCR und Sequenzierung kontrolliert.

Für die Suche nach potentiellen Interaktionspartnern wurden in den BiFC Assays die zellulären Faktoren Aly, UAP56, SF2/ASF, Y14 und TAP/NXF1 untersucht. Diese Faktoren wurden ausgewählt, weil sie zum einen an unterschiedlichen Schritten im zellulären mRNA Exportweg eingreifen (Yingqun Huang u. a. 2003; Z. Zhou u. a. 2000; F Stutz u. a. 2000; Gatfield u. a. 2001), zum anderen gezeigt werden konnte, dass einige dieser Proteine mit viralen Faktoren interagieren, bzw. viralen mRNA Export vermitteln (Bryan R Cullen 2003; J. Schneider und Wolff 2009). So wurden die Rekrutierung des Exportproteins Aly und des Exportrezeptors TAP/NXF1 durch das virale Adapterprotein ICP27 von HSV1 an virale mRNAs beschrieben und somit der Export viraler Transkripte erklärt (I.-H. B. Chen u. a. 2005; Hernandez und Sandri-Goldin 2010; Tunnicliffe, Hautbergue, Kalra, Jackson, Whitehouse, Wilson, und Golovanov 2011a). Für die Helikase UAP56 wurde eine Interaktion mit dem Influenza A Virus Nukleoprotein (NP) und ein positiver Effekt auf die virale Replikation nachgewiesen (Momose u. a. 2001; Wisskirchen, Ludersdorfer, Müller, Moritz, und Pavlovic 2011a). Zusätzlich wurde für UAP56 eine Rolle im viralen mRNA Export des HCMV vermutet, neueste Untersuchungen beschrieben einen positiven Effekt von UAP56 auf die HCMV Replikation, waren sich aber über eine direkte Rolle

am viralen mRNA Export nicht einig (Kronemann u. a. 2010; Zielke u. a. 2011). Eine genauere Untersuchung bezüglich des mRNA Exports der Influenza Viren wurde noch nicht durchgeführt und kann somit nicht ausgeschlossen werden. Der Spleiß- und Exportfaktor SF2/ASF wurde ausgewählt, weil durch die Beteiligung am Spleißvorgang der M1 mRNA bereits eine Assoziation mit viralen Transkripten nachgewiesen wurde (Shih und Krug 1996). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass SR Proteine eine Rolle im Export von zellulärer, intronloser mRNA übernehmen können und in beiden Fällen als Adapterproteine für TAP/NXF1 fungieren (Y Huang und Steitz 2001; Hargous u. a. 2006). Somit wäre auch eine Rolle im Export der intronlosen viralen mRNA möglich. Der Exportrezeptor TAP/NXF1 wurde in die BiFC Untersuchungen eingeschlossen, weil bereits eine Interaktion mit dem viralen NS1 Protein in GST-Bindungsstudien beschrieben wurde (Satterly u. a. 2007). Satterly und Kollegen vermuteten zwar eine inhibitorische Wirkung dieser Interaktion auf den zellulären mRNA Export, einen positiven Effekt auf den viralen mRNA Export konnte aber nicht ausgeschlossen werden. Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass TAP/NXF1 mit viraler mRNA präzipitierte (Wei Wang u. a. 2008) und es häufen sich Vermutungen, dass Influenza Viren für den Export ihrer mRNAs den TAP/NXF1-vermittelten Exportweg nutzen (Read und Digard 2010; Bier, York, und Fodor 2011).

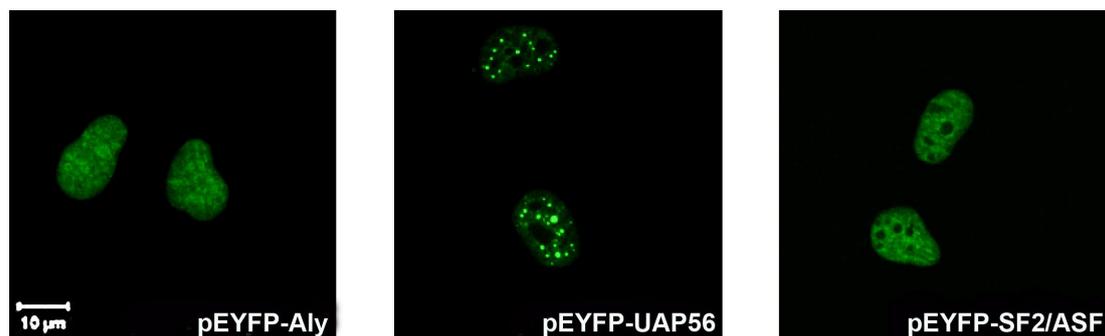


Abb. 3.3: Nukleoplasmatische Lokalisation von Aly, UAP56 und SF2/ASF Fusionskonstrukten. HeLa-Zellen wurden jeweils mit 2,5 µg Plasmid DNA der entsprechenden Konstrukte transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) analysiert.

Faktor Y14 wurde in die Untersuchungen aufgenommen, da dieses Protein als Teil des EJC an der Rekrutierung von Exportfaktoren beteiligt ist und regulatorische Funktionen im zellulären Exportweg übernimmt (V. N. Kim und Dreyfuss 2001; Schmidt, Im, Benzing, Janjetovic, Rippe, Lichter, und Wachsmuth 2009a; Chuang, Peng, und Tarn 2011). Es interagiert über eine RNA-Bindungsdomäne direkt mit der mRNA und konnte im Zellkern und im Zytoplasma detektiert werden, es kann sich demnach zwischen Kern und Zytoplasma hin- und herbewegen. Es wurde vermutet, dass Y14 an gespleißten mRNAs gebunden bleibt und als Markierung der Spleißstelle fungiert und auf diese Weise prä- und post-Spleißvorgänge miteinander verbindet. Zusammenfassend betrachtet verfügten alle ausgewählten Proteine über das Potential einen Export viraler mRNA zu fördern. Um sicherzustellen, dass trotz des Anfügens der YN-, YC- oder YFP-Fragmente die Expression und Verteilung innerhalb der Zelle nicht gestört oder

verändert war, wurden die YFP-Fusionskonstrukte für Aly, UAP56 und SF2/ASF in HeLa Zellen exprimiert (Abb. 3.3).

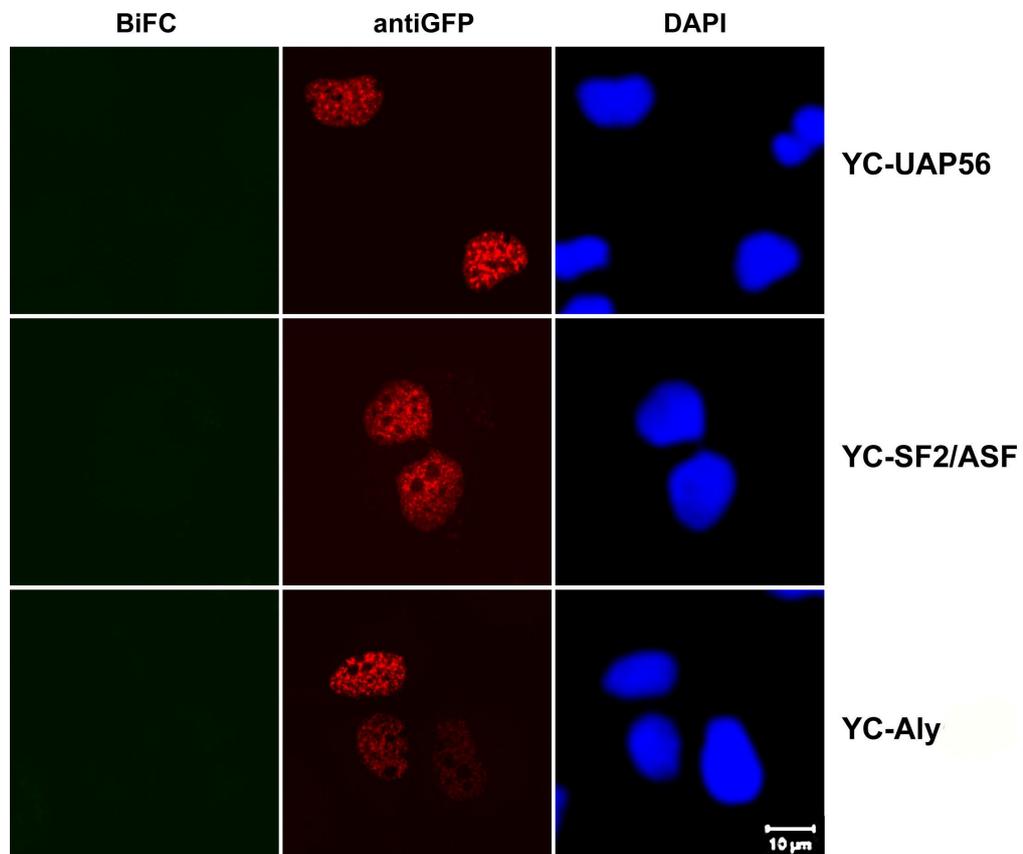


Abb. 3.4: Expression der YC-Fusionsproteine allein führen nicht zu einem Fluoreszenzsignal. HeLa-Zellen wurden jeweils mit 2,5µg der YC-Expressionsplasmide transfiziert. Nach Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Transfektion wurden die YC-Fusionsproteine mit einem primären Protein-spezifischen antiGFP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper gefärbt und für die CLSM vorbereitet.

Es konnte festgestellt werden, dass alle Fusionsproteine eine nukleoplasmatische Verteilung entsprechend ihrer zellulären Funktion zeigten. Ihre Lokalisation innerhalb der Zelle war demnach nicht beeinträchtigt. Während YFP-SF2/ASF im gesamten Nukleus detektiert werden konnte, wurde YFP-Aly im Nukleus und zusätzlich in den Nukleoli nachgewiesen. Bisher wurden nur pflanzliche Aly Proteine in Nukleoli nachgewiesen (Uhrig u. a. 2004). Tierische Aly Proteine konnten bis dato nur in Assoziation mit einer Herpesvirus Saimiri (HVS) Infektion in Nukleoli beobachtet werden (Boyne und Whitehouse 2006). Die in Abb. 3.3 dargestellte zusätzlich nukleoläre Lokalisation des Aly Proteins, zeigte im Verlauf dieser Arbeit keine Beeinträchtigung der Proteinfunktion und wurde im Rahmen einer Überexpression interpretiert. UAP56 zeigte eine punktförmige Verteilung im Nukleoplasma, diese Verteilung in sogenannten Speckle Domänen wurde bereits in der Literatur beschrieben (Kota u. a. 2008). Schlussfolgernd konnte festgestellt werden, dass die YFP-Fusionsproteine ein normales Expressionsmuster zeigten. Es

folgte die Überprüfung, ob die YN- oder YC-Fusionsproteine alleine exprimiert nicht zu einem falsch-positivem Signal aufgrund einer Autofluoreszenz führte. Abbildung 3.4 zeigt die Expression der YC-Fusionsproteine von UAP56, SF2/ASF und Aly.

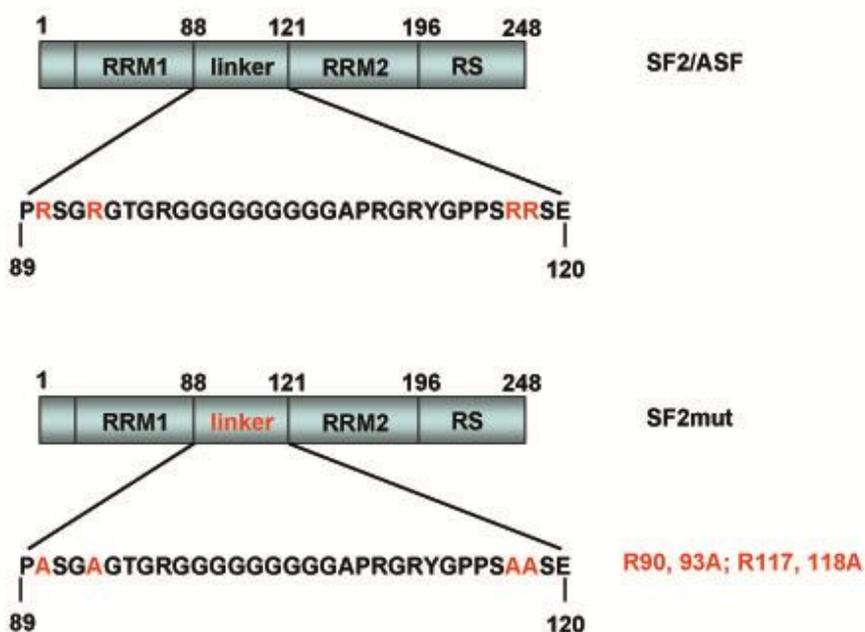


Abb. 3.5: Schematische Darstellung der Linker Mutation der SF2/ASF Mutante SF2mut. Dargestellt ist die Aminosäure-Folge der Linker Region des SF2/ASF bzw. SF2mut Proteins. In der mutierten Variante des Proteins wurden die Arginine (R) an den Positionen 90, 93, 117 und 118 durch Alanine (A) ersetzt. RRM: RNA recognition motif; RS: serine/arginine-rich region.

Desweiteren wurde die Spezifität des BiFC Assays anhand von Positiv- und Negativkontrollen getestet. Als Positivkontrolle fungierte die Homodimerisation des Exportfaktors SF2/ASF und die beschriebene Interaktion von SF2/ASF mit dem Exportrezeptor TAP/NXF1 (Abb. 3.6). Für die Negativkontrolle wurde eine mutierte Version des SF2/ASF Proteins kloniert, welche nicht mehr zu einer Interaktion mit TAP/NXF1 fähig war (Abb. 3.5; Abb. 3.6). Ein unspezifisches BiFC-Signal in den Kontrollen, hervorgerufen z.B. durch die räumliche Nähe der nuklearen Faktoren würde auch in weiteren Untersuchungen zu falsch-positiven Ergebnissen und somit Falschaussagen führen. Da zum Teil keine spezifischen Antikörper für die zellulären Proteine zur Verfügung standen wurde die korrekte Expression der Fusionsproteine mit einem Protein-spezifischen antiGFP Antikörper durchgeführt. Dieser ist in der Lage das YFP- und das YC-Fragment zu detektieren, nicht jedoch das YN-Fragment. Die Expression der einzelnen YC-Fusionsproteine führte in keinem Fall zu einem Fluoreszenzsignal. Somit wurden die in den BiFC Assays dargestellten Fluoreszenzsignale auf Grund einer Interaktion der Fusionsproteine interpretiert. Des Weiteren sollte die Funktionalität und Spezifität des Assays überprüft werden. In den bevorstehenden Untersuchungen sollten Faktoren auf Interaktionen untersucht werden, die alle im Nukleoplasma auf engstem Raum zu finden sind.

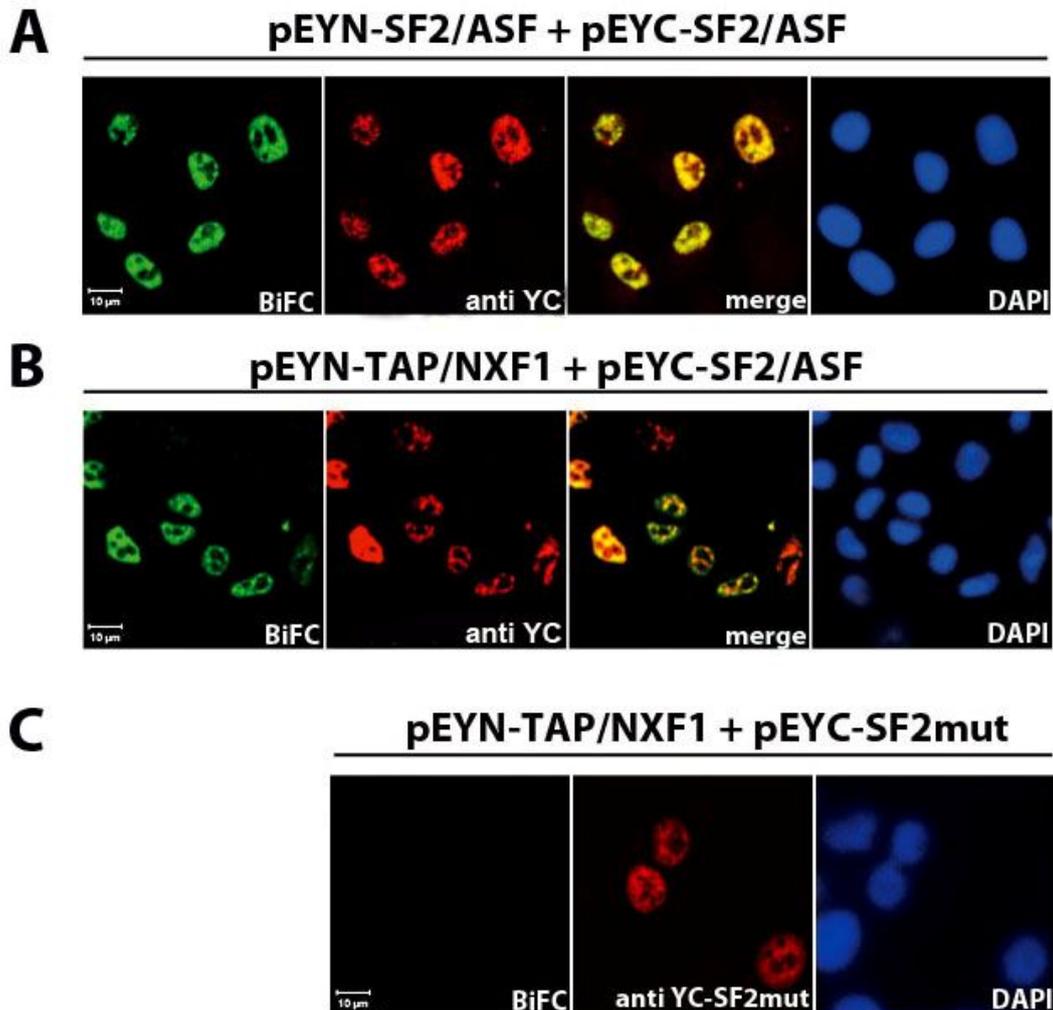


Abb. 3.6: Dimerisierung von SF2/ASF im BiFC Assay, sowie Interaktion mit dem Exportrezeptor TAP/NXF1. HeLa-Zellen wurden transient mit pEYN-SF2/ASF + pEYC-SF2/ASF (A), pEYN-TAP/NXF1 + pEYC-SF2/ASF (B) oder pEYN-TAP/NXF1 + pEYC-SF2mut transfiziert (C). 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und eine Immunfluoreszenz Analyse durchgeführt. YC-SF2/ASF, bzw. YC-SF2mut wurden mit einem primären Maus antiGFP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus spezifischen Antikörper detektiert, der das YC-Fragment erkennt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Um falsch-positive Signale auszuschließen wurde ein Kontrollversuch durchgeführt, in dem das SF2/ASF Protein so verändert wurde, dass eine Interaktion mit dem Exportrezeptor TAP/NXF1 nicht mehr stattfinden konnte. In einer Arbeit von Tintaru und Kollegen wurde gezeigt, dass vier Arginine in der Linker Region zwischen den beiden RNA Erkennungsdomänen des SF2/ASF Proteins notwendig für die Bindung des Exportrezeptors TAP/NXF1 waren (Tintaru u. a. 2007). Eine Mutation der vier Arginine zu Alaninen verhinderte diese Interaktion. In Abbildung 3.5 ist eine schematische Darstellung des SF2/ASF Proteins und der mutierten Variante, hier SF2mut genannt, dargestellt. Für den Versuch wurden HeLa-Zellen transient mit den entsprechenden Expressionsvektoren für YN-SF2/ASF, YC-SF2/ASF, YN-TAP/NXF1 oder YC-SF2mut

transfiziert. Als Positivkontrolle diente die Dimerisierung des SF2/ASF Proteins, da bereits gezeigt wurde, das SF2/ASF zur Multimer-Bildung fähig ist (Zuo und Manley 1993) (Abb. 3.6 A). Zur Kontrolle der Transfektion wurden die YC-Fusionsproteine mit einem GFP Antikörper gefärbt. Sowohl die Dimerisierung, als auch die Interaktion von SF2/ASF und TAP/NXF1 zeigten eindeutige Fluoreszenzsignale im GFP-Kanal (Abb. 3.6 A, B). Nach Koexpression von SF2mut und TAP/NXF1 konnte hingegen keine Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 3.6 C), was bedeutet, dass der BiFC-Test diesen in biochemischen Assays beschriebenen Verlust der Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren aufgrund der Mutation, rekapitulieren kann. Diese Ergebnisse zeigten, dass das BiFC Assay zu spezifischen zur Detektion von Protein-Protein Interaktionen geeignet ist.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung von neuen Interaktionspartnern von NS1

Wang und Kollegen zeigten, dass das NS1 Protein an virale mRNA binden kann (Wei Wang u. a. 2008). Es sollte im Folgenden untersucht werden, ob dem NS1 Protein eine Funktion als Adapterprotein zugesprochen werden konnte. Als potentielle zelluläre Interaktionspartner des NS1 Proteins wurden die mRNA Exportfaktoren Aly, SF2/ASF, UAP56, Y14 und TAP/NXF1 auf untersucht.

3.2.1 BiFC Assays

Die Tabelle 3.1 fasst die Ergebnisse der Experimente zusammen. UAP56, Y14 und TAP/NXF1 zeigten keine Interaktion mit NS1 in dem durchgeführten Screening. Für TAP/NXF1 wurde eine Interaktion mit NS1 bereits beschrieben (Satterly u. a. 2007), es ist jedoch möglich, dass durch unterschiedliche Versuchsprotokolle eine Interaktion, zum Beispiel durch sterische Hinderungen nicht reproduzierbar war. Bei einer Interaktion der C-Termini der Fusionsproteine könnte es sein, dass sich die N-terminal fusionierten YC- und YN-Fragmente nicht optimal zueinander ausrichteten, um ein vollständiges YFP zu reformieren. Es würde dann trotz einer Interaktion nicht zu einem positiven BiFC-Signal kommen. Grundsätzlich könnte ein zusätzlicher Faktor zwischen den Fragmenten binden und auf diese Weise eine Reformation zu YFP blockieren. Mit den beiden Exportfaktoren SF2/ASF und Aly konnten in den BiFC Assay positive Ergebnisse erzielt werden. Diese Interaktionen wurden bisher nicht beschrieben und sollten daher im Folgenden genauer untersucht und charakterisiert werden.

Tab. 3.1: Zusammenfassung der BiFC Assays von unterschiedlichen mRNA Exportfaktoren bezüglich einer Interaktion mit dem viralen NS1 Protein. BiFC: Interaktion; X: keine Interaktion; - : Vektorkombination nicht verfügbar.

Untersuchungen in transfizierten HeLa Zellen					
	YC-SF2/ASF	YC-Aly	YC-UAP56	YC-Y14	YC-TAP/NXF1
YN-NS1	X	BiFC	X	X	-
	YN-SF2/ASF	YN-Aly	YN-UAP56	YN-Y14	YN-TAP/NXF1
YC-NS1	X	BiFC	X	-	X
Untersuchungen in infizierten HeLa Zellen (Influenza A/PR/8/34)					
	YC-SF2/ASF	YC-Aly	YC-UAP56	YC-Y14	YC-TAP/NXF1
YN-NS1	BiFC	BiFC	X	X	-
	YN-SF2/ASF	YN-Aly	YN-UAP56	YN-Y14	YN-TAP/NXF1
YC-NS1	BiFC	BiFC	X	-	X

3.2.2 Die zellulären mRNA Exportfaktoren Aly und SF2/ASF interagieren im BiFC Assay mit NS1

Einer der großen Vorteile des BiFC Assays ist die Möglichkeit der direkten intrazellulären Lokalisation der Interaktion. Im Folgenden dargestellt sind die Ergebnisse der BiFC Untersuchungen von NS1 mit den Exportfaktoren Aly und SF2/ASF. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Konstrukten – pEYC-NS1 + pEYN-Aly (Abb. 3.7) oder pEYC-NS1 + pEYN-SF2/ASF (Abb. 3.8) – transfiziert.

Ein Teil der Zellen wurde 24 Stunden nach Transfektion zusätzlich mit Influenza A/PR/8/34 infiziert, um zu untersuchen, ob dies einen Einfluss auf die Interaktion haben könnte. Die Koexpression von YC-NS1 und YN-Aly, bzw. YC-NS1 und YN-SF2/ASF in HeLa-Zellen führte zu einer Fluoreszenz Komplementation. Die Interaktion von Aly und NS1 wurde sowohl in transfizierten als auch in transfizierten und zusätzlich infizierten Zellen detektiert. Die Interaktion war in beiden Fällen im Nukleoplasma der Zellen lokalisiert.

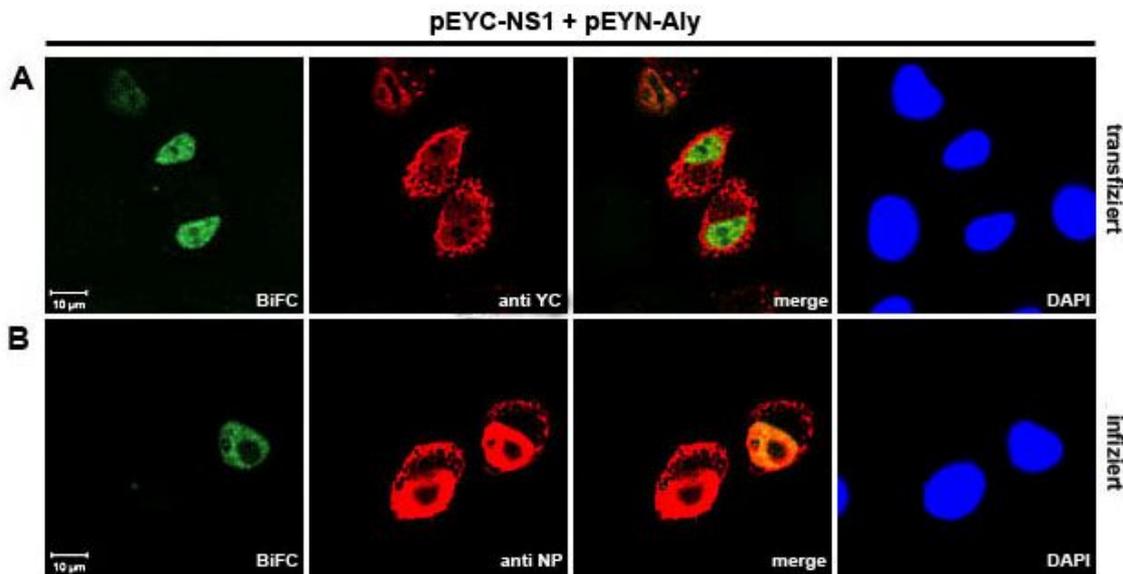


Abb. 3.7: Das NS1 Protein interagiert mit dem Exportprotein Aly. A) HeLa-Zellen wurden transient mit pEYN-Aly und pEYC-NS1 transfiziert. YC-NS1 wurde mit einem primären Protein-spezifischen antiGFP Antikörper und einem sekundärem Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper detektiert und im CLSM analysiert um eine effiziente Transfektion nachzuweisen. B) HeLa-Zellen wurden wie in A beschrieben transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Influenza A/PR/8 infiziert (MOI5). Nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C und 2 Stunden bei 30°C wurden die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen NP durchgeführt, um infizierte Zellen zu identifizieren. Sowohl in transfizierten als auch in infizierten Zellen wurde eine Interaktion anhand einer Fluoreszenzkomplementation detektiert. Die Zellkerne wurden in A und B mit DAPI gefärbt.

Auch für SF2/ASF und NS1 konnte ein Fluoreszenz Signal detektiert werden, jedoch nur in transfizierten und zusätzlich infizierten Zellen. In 2 von 10 durchgeführten Ansätzen konnte auch in nur transfizierten Zellen eine Interaktion detektiert werden. Ein positives Ergebnis war demnach nicht reproduzierbar, und daher konnte anhand der BiFC Untersuchungen keine eindeutigen Interaktionen zwischen NS1 und SF2/ASF in nur transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Virale Faktoren könnten zu einer Stabilisierung der Interaktion der Fusionsproteine führen, so dass instabilere Interaktionen in Ansätzen mit einer alleinigen Transfektion nicht kontinuierlich im BiFC Assay abgebildet werden konnte. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen positive BiFC Signale für die Kombinationen NS1-Aly und NS1-SF2/ASF. Die beobachteten Interaktionen, oder Komplexbildungen, erfolgten im Nukleus der Zellen. Das Assay erlaubte jedoch keinen Rückschluss auf die genaue Art der Interaktion. Ob eine direkte, oder eine in einem Komplex zustande gekommene Interaktion vorlag, konnte durch das durchgeführte Assay nicht beantwortet werden. In den nächsten Schritten sollten dies genauer untersucht werden, so sollten z. B. die Proteindomänen, die eine Interaktion vermittelten identifiziert werden.

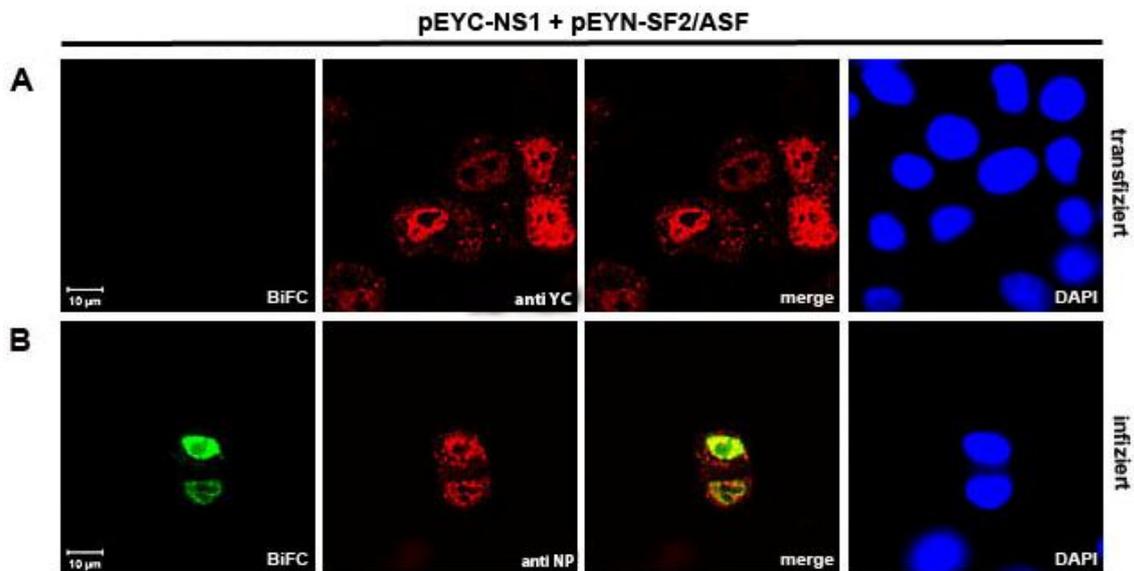


Abb. 3.8: Das NS1 Protein interagiert mit dem Export- und Spleißfaktor SF2/ASF. A) HeLa-Zellen wurden transient mit pEYN-SF2/ASF und pEYC-NS1 transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und YC-NS1 mit einem Protein-spezifischen primären antiGFP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper detektiert. Es konnte keine Fluoreszenzkomplementation beobachtet werden. B) HeLa-Zellen wurden wie in A beschrieben transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Infektion mit Influenza A/PR/8 mit einer MOI5. Nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C und 2 Stunden Inkubation bei 30°C wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und mittels Immunfluoreszenz Analyse das virale NP Protein mit einem spezifischen primären antiNP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus spezifischen Antikörper gefärbt, um infizierte Zellen nachzuweisen. Die Zellkerne wurden in A und B mit DAPI gefärbt.

3.2.3 Die Interaktionen zwischen NS1 und den Exportfaktoren Aly und SF2/ASF sind RNA-abhängig

In einem GST-Kopräzipitationsassay wurden die Bindungen der zellulären Proteine SF2/ASF, Aly, Y14 und TAP/NXF1 an NS1, sowie der Einfluss von RNA auf eine mögliche Bindung untersucht. Dies diente der Bestätigung der zuvor beobachteten Interaktionen von NS1 mit Aly, bzw. SF2/ASF in den BiFC Assays. Zur Generierung der SF2/ASF, Aly, Y14 und TAP/NXF1 GST-Fusionsproteine wurden die jeweiligen kodierenden Sequenzen aus den pEYC-, bzw. pEYN-Vektoren amplifiziert und über die Schnittstellen *BamHI* und *XbaI* in den Vektor pGex5X.1 inseriert. Dieser Vektor kodiert aufwärts der „multiple cloning site“ (MCS) für die Glutathion-S-Transferase. Die GST-Fusionsproteine wurden bakteriell exprimiert, an einer Glutathion-Sepharose-Matrix immobilisiert und anschließend in einem Bindungsansatz mit *in vitro* translatierten und [³⁵S]-Methionin markierten NS1 WT Proteinen bzw. NS1 Mutanten inkubiert. Bei den Mutanten handelte es sich um eine Variante des NS1 Proteins, die eine Mutation in der RNA-Bindungsdomäne (NS1 RNA mut) trug und eine Mutante mit einer Deletion des Carboxyterminus, der ein zweites NLS Motif trägt (NS1Δ204-230). Beide Mutanten sind in Abbildung 3.9 schematisch dargestellt. Die gebildeten Komplexe wurden gereinigt, anschließend auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und kopräzipitierte NS1 Proteine mittels

Autoradiographie detektiert. Die in Abbildung 3.10 A dargestellten Ergebnisse der Bindungsassays zeigten, dass das radioaktiv markierte NS1 WT Protein mit GST-SF2/ASF und GST-Aly präzipitiert werden konnten. Dieses Ergebnis bestätigte die zuvor durchgeführten BiFC Assays (Abschnitt 3.2.2).

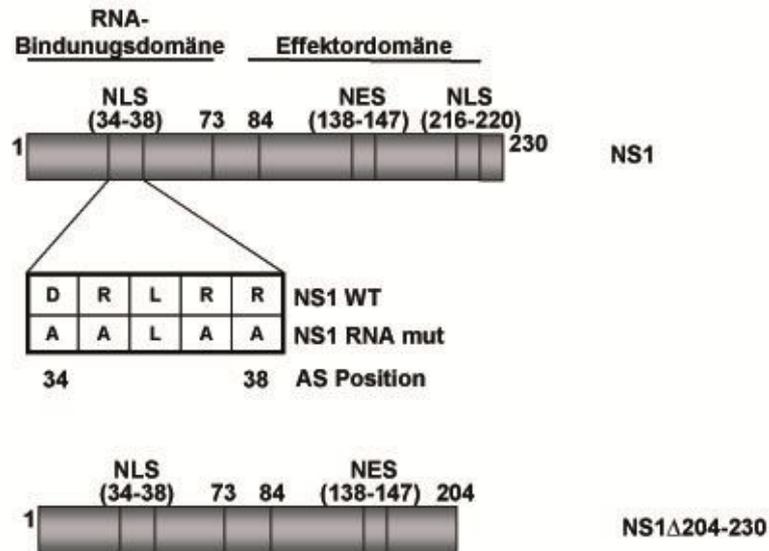


Abb. 3.9: Schematische Darstellung der NS1 Mutanten. Das NS1 Protein besteht aus einer aminoterminalen RNA-Bindungsdomäne (AS 1-73) und einer carboxyterminalen Effektordomäne (AS 74-230). Beide Domänen enthalten eine nukleare Lokalisations-Sequenz (NLS). Die Mutante NS1 RNA mut enthält einen Austausch von vier Aminosäuren zu Alanine (D34A, R35A, R37A, R38A) in der NLS Sequenz. Die Mutante NS1 Δ 204-230 trägt eine Deletion am Carboxyterminus, wodurch das zweite NLS (AS 216-220) deletiert ist.

In diesem *in vitro* Assay präzipitierten GST-Y14 und GST-TAP/NXF1 NS1, die in den vorhergehenden Experimenten keine Interaktion zeigten. Hier wurde eine sterische Hinderung, oder eine instabile Verbindung als Ursache interpretiert. Das NS1 RNA mut Protein wurde mit keinem der GST-Fusionsproteine präzipitiert. Das NS1 Δ 204-230 Protein hingegen wurde von allen mit ähnlicher Effizienz wie das WT NS1 gebunden. Abbildung 3.10 B zeigt ein parallel durchgeführtes Bindungsassay, in dem die Proben mit RNase A behandelt wurden. Dieser Versuch diente dazu, eine mögliche Beteiligung von RNA an der Ausbildung der Interaktion zu untersuchen. Eine Behandlung mit RNase A entfernte einzelsträngige RNA Moleküle in den jeweiligen Versuchsansätzen. Die in diesen Ansätzen detektierten Interaktionen wurden demnach ohne Beteiligung von diesen RNA Molekülen ausgebildet. Im Vergleich konnte festgestellt werden, dass die Präzipitationseffizienz der RNase A behandelten Proben deutlich schwächer war. Zur Quantifizierung dieser Abnahme der Bindungseffizienz wurden die Gele mit einem Phosphorimager ausgewertet (Abb. 3.11). Abgebildet wurde die absolute Bindungseffizienz der einzelnen Fusionsproteine an das NS1 WT Protein, das NS1 RNA mut Protein und das NS1 Δ 203-240 Protein. Als absolute Bindungseffizienz wurde die Bindung der

präzipitierten Proben im Bezug zum eingesetzten Input in Prozent dargestellt. Schwarz ausgefüllte Balken zeigen die Effizienz der Präzipitation ohne RNase A Behandlung, schwarz-weiße Balken stehen für die Präzipitationseffizienz nach RNase A Behandlung. GST-SF2/ASF, GST-Aly und GST-Y14 präzipitierten NS1 mit ähnlicher Effizienz unter 2%. Mit GST-TAP/NXF1 konnte sogar eine Präzipitationseffizienz von über 4% erzielt werden (Abb. 3.11 A).

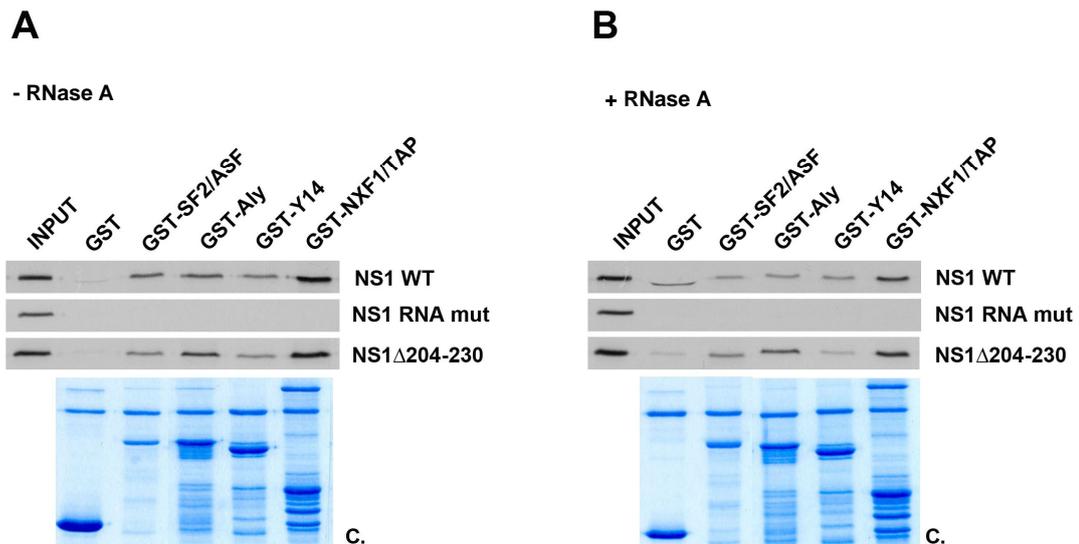


Abb. 3.10: Bindungsassays mit radioaktiv markiertem NS1 bestätigen eine Interaktion von NS1 mit den zellulären Exportfaktoren SF2/ASF und Aly. GST und GST-Fusionsprotein wurden bakteriell exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit den angegebenen, *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten NS1 Proteine, bzw. NS1 Mutanten in einem Bindungsansatz inkubiert. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden gereinigt und auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie (C.) bzw. Autoradiographie detektiert. Der Versuch wurde parallel entweder ohne (A) oder mit Zugabe von RNase A (B) durchgeführt.

Nach Behandlung mit RNase A sank die Präzipitationseffizienz der GST-Fusionsproteine zu NS1 um die Hälfte, zusätzlich zeigte sich eine unspezifische Präzipitation von NS1 durch GST. Dies könnte durch die RNase A Behandlung zustande gekommen sein, hervorgerufen durch Abbauprodukte des RNA Verdau. Das NS1 RNA mut wurde weder mit noch ohne RNase A Behandlung präzipitiert (Abb. 3.11 B). Die Mutante NS1 Δ 204-230 wurde von GST-SF2/ASF und GST-Y14 mit einer Effizienz von 1% präzipitiert. GST-Aly präzipitierte diese Mutante mit einer Effizienz von 2% und GST-TAP/NXF1 mit knapp 5% (Abb. 3.11 C). Die Behandlung mit RNase A verminderte bei allen Proben die Bindungseffizienz, die Abnahme war schwächer als bei NS1 WT beobachtet. Zur deutlicheren Darstellung der Abnahme der Präzipitationseffizienz von GST-SF2/ASF, GST-Aly, GST-Y14 und GST-TAP/NXF1 für NS1 WT wurde eine weitere Berechnung durchgeführt (Abb. 3.11 D). Ausgehend von der Präzipitationseffizienz wurde eine relative Abnahme nach RNase A Behandlung berechnet. Aus dieser Abbildung wurde ersichtlich, dass die Präzipitationseffizienz von GST-SF2/ASF nach einer RNase A Behandlung um mehr als

60% abnahm. Dasselbe galt für GST-Y14. Die Präzipitationseffizienz von GST-Aly nahm um 45%, von GST-TAP/NXF1 um etwa 50% ab. Die Interaktionen von NS1 mit Aly und mit SF2/ASF konnten mit den Bindungsassays bestätigt werden. Ein Verdau der RNA im Versuchsansatz verminderte die Bindungseffizienz des NS1 WT Proteins an die zellulären Proteine. RNA könnte demnach eine vermittelnde Rolle bei der Bildung der Komplexe spielen. Da die Komplexbildungen durch einen RNase A Verdau aber nicht vollständig aufgehoben wurden, scheint eine Interaktion auch ohne RNA möglich. In den weiterführenden Experimenten wurde untersucht, ob diese Interaktion möglicherweise auf direkte Protein-Protein Interaktionen beruhen könnten.

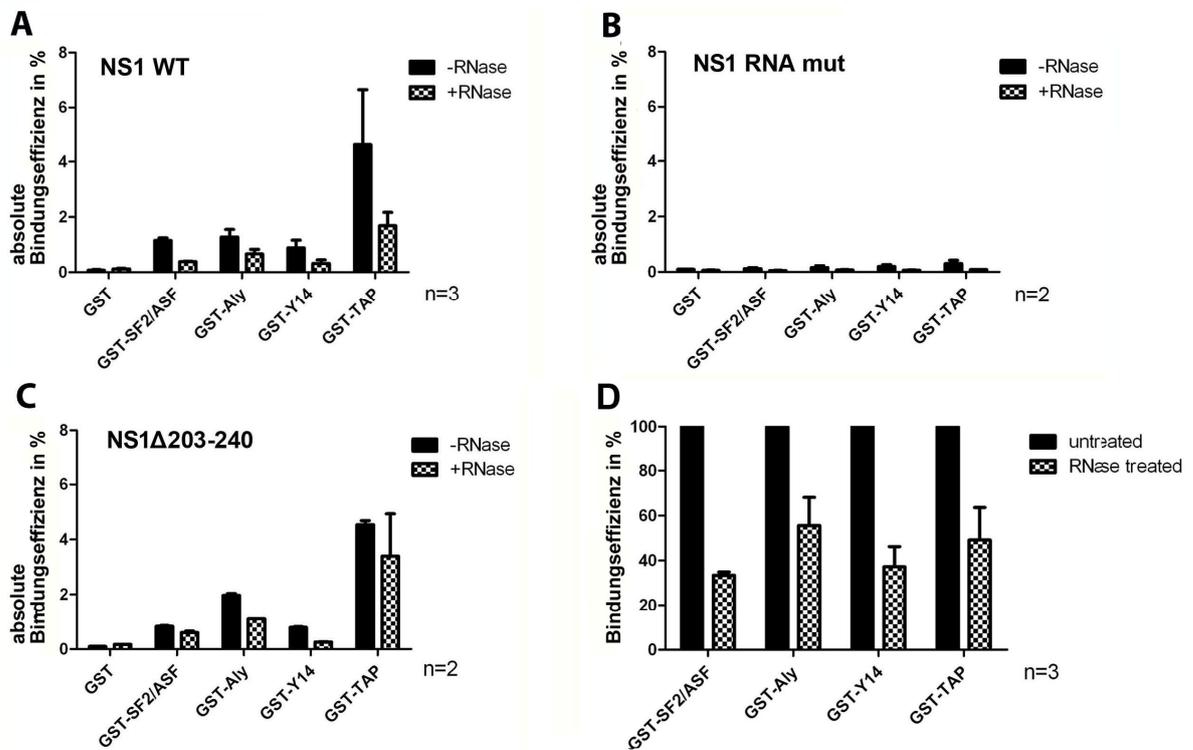


Abb. 3.11: Die Interaktion von NS1 mit SF2/ASF und Aly ist RNA-sensitiv. Die radioaktiven Signale wurden mit einem Phosphoimager ausgewertet. Dabei erfolgte eine Normalisierung der Signale der kopräzipitierten NS1 Proteine mit den Signalen des Inputs. Die dargestellten Diagramme zeigen die Bindungseffizienzen von NS1 WT (A), NS1 RNA mut (B) und NS1 Δ 203-240 (C) an die jeweiligen GST-Fusionsproteine. Schwarzen Balken stehen für die Ansätze, die nicht mit RNase A behandelt wurden. Gemusterte Balken entsprechen den Ansätzen mit einer RNase A Behandlung. Die Bindungseffizienz war in allen Durchführungen nach RNase A Behandlung vermindert. (D) Kalkulation der prozentualen Abnahme der Bindungseffizienz nach RNaseA Behandlung. Für alle Ansätze wurde die Präzipitationseffizienz ohne RNaseA Behandlung gleich 100% gesetzt. Im Verhältnis dazu wurde berechnet, um wie viel Prozent die Bindung nach RNaseA Behandlung abgenommen hatte.

3.2.4 Die Interaktion von NS1 mit Exportfaktoren beruht auf direkter Protein-Protein Interaktion

Proteine können entweder durch direkte Protein-Protein Bindungen miteinander interagieren, oder aber eine Interaktion in Anwesenheit von Ko-Faktoren, wie beispielsweise RNA oder andere Proteine, ausbilden. Viele mRNA Exportfaktoren werden an Proteinkomplexe rekrutiert um funktionelle Einheiten, wie zum Beispiel den TREX Komplex zu bilden. Proteine in diesen Komplexen müssen nicht zwangsläufig miteinander interagieren. Ihre Interaktion kann auch durch andere Proteine des Komplexes vermittelt werden. Um die Biologie der Interaktion von Proteinen und deren Komplexbildung zu verstehen ist es notwendig zu wissen, ob eine Interaktion direkt ist oder durch andere Faktoren vermittelt wird.

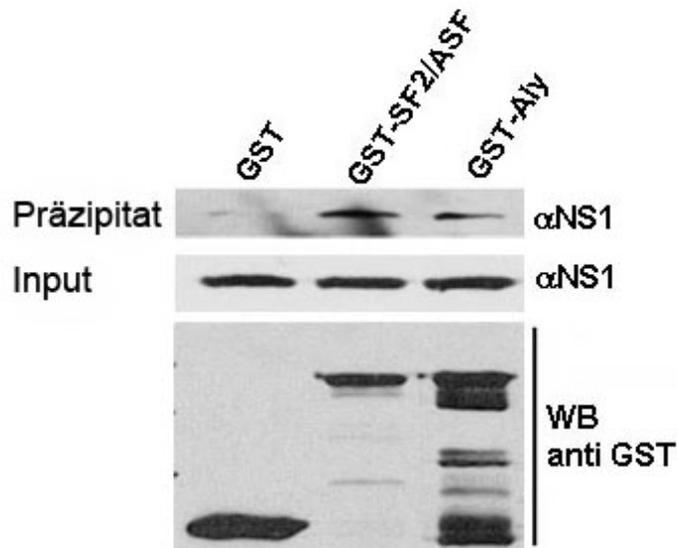


Abb. 3.12: Die Exportfaktoren Aly und SF2/ASF binden virales NS1 Protein in infizierten Zelllysaten. Die Bindungsassays wurden mit bakteriell exprimierten und an Glutathion-Sepharose immobilisiertem GST, bzw. GST-Fusionsproteinen und Lysaten infizierter MDCKII-Zellen (A/PR/8, MOI1) durchgeführt. Die Analyse erfolgte durch Auftrennung der Proben im SDS-PAGE und durch Immunoblot Analyse. NS1 Proteine wurden mit einem Protein-spezifischen antiNS1 Antikörper detektiert. GST und die GST-Fusionsproteine wurden mit einem spezifischen antiGST Antikörper nachgewiesen.

In Abschnitt 3.2.3 wurde gezeigt, dass die Interaktion von NS1 mit Aly, bzw. SF2/ASF durch einen Verdau der RNA abgeschwächt werden konnte. Die durchgeführten Bindungsassays wurden mit *in vitro* translatiertem NS1 Protein durchgeführt. Das bedeutet, dass zelluläre Faktoren zur Transkription und Proteinsynthese in den Ansätzen enthalten waren. Ein Einfluss dieser RNA-Prozessierungsfaktoren auf die Interaktion von NS1 mit Aly, bzw. SF2/ASF konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden. Es ist möglich, dass ein oder mehrere weitere zelluläre Faktoren für die Ausbildung der Interaktionen mit dem viralen NS1 Protein benötigt

werden. In zusätzlichen Assays sollte zunächst überprüft werden, ob auch viral exprimiertes NS1 Protein von GST-SF2/ASF und GST-Aly präzipitiert werden konnte. Hierfür wurden MDCKII-Zellen mit Influenza A/PR/8/34 mit einer MOI 1 für 6 Stunden infiziert. Es wurden Zelllysate hergestellt, die daraufhin mit an Glutathion-Agarose immobilisierten GST, bzw. GST-SF2/ASF oder GST-Aly Fusionsproteinen in einem Reaktionsansatz inkubiert wurden. Gebundene Proteine wurden durch Western Blot Analyse untersucht (Abb. 3.12). NS1 Proteine wurden mit einem Protein-spezifischen antiNS1 Antikörper detektiert. GST-Fusionsproteine wurden mit einem antiGST Antikörper nachgewiesen. Das Bindungsassay mit infizierten Zelllysaten zeigte, dass sowohl GST-SF2/ASF als auch GST-Aly virales NS1 Protein präzipitierten. Dieses Ergebnis bestätigt die zuvor durchgeführten Assays, ermöglichte jedoch noch keine Aussage über die Art der Interaktion. In den Zelllysaten waren sowohl zelluläre als auch virale Faktoren enthalten. Um zu untersuchen, ob es sich bei den Interaktionen möglicherweise um direkte Protein-Protein Interaktionen handelte wurde ein weiteres Bindungsassay mit aufgereinigtem, rekombinantem NS1 Protein durchgeführt (Abb. 3.13).

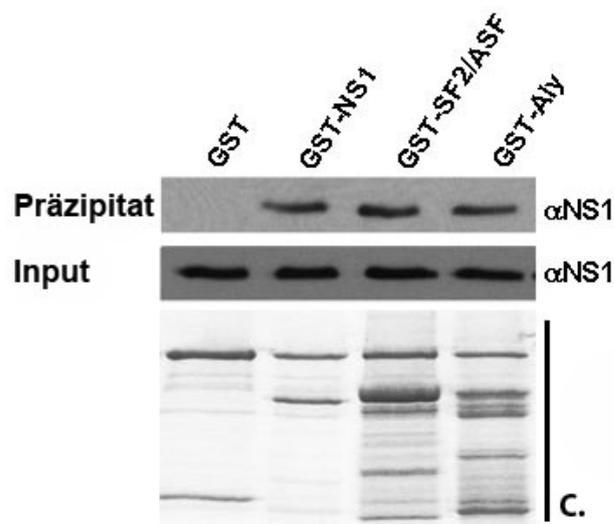


Abb. 3.13: SF2/ASF und Aly interagieren durch eine direkte Protein-Protein Interaktion miteinander. Die *in vitro* Bindungsstudien wurden mit bakteriell exprimierten und an Glutathion-Sepharose immobilisierten GST, bzw. GST-Fusionsproteinen und bakteriell exprimiertem und aufgereinigtem NS1 Protein in einem Bindungsansatz inkubiert. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden gereinigt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Blue (C.) bzw. im Immunoblot mit einem Protein-spezifischen antiNS1 Antikörper nachgewiesen.

Um rekombinantes NS1 Protein herzustellen wurde zuerst die NS1-Gensequenz in den Vektor pET100/D-TOPO eingefügt, der ein 6x-Histidin-tag enthielt. Erfolgreich hergestellte 6xHistidin-NS1 Fusionskonstrukte wurden in *E.coli* BI21 exprimiert. Die Histidin-markierten NS1 Proteine wurden aufgereinigt, die Histidin-Markierung entfernt und die Proben mit 8M Urea dialysiert. Für das Bindungsassay wurden 30µg NS1 Protein mit immobilisiertem GST bzw. GST-Fusionsproteinen in einem Reaktionsansatz inkubiert. Um zu kontrollieren, dass das

rekombinante Protein auch funktionell gefaltet war, wurde ein GST-NS1 mitgeführt, um die Dimerisierung des NS1 Proteins zu überprüfen. In Abbildung 3.13 ist die Analyse der präzipitierten Proteine dargestellt. Das rekombinante NS1 Protein dimerisierte mit GST-NS1, was eine funktionelle Faltung bewies. Sowohl GST-SF2/ASF als auch GST-Aly präzipitierten das rekombinante NS1 Protein. Dieses Ergebnis deutete auf eine direkte Protein-Protein Interaktion von NS1 mit den Exportfaktoren SF2/ASF und Aly hin, weil in den hier durchgeführten Ansätzen keine weiteren Proteine oder RNA Moleküle anwesend waren, um einen Einfluss auf die Interaktion auszuüben. Daraus konnte gefolgert werden, sollte bei einer Komplexbildung von mRNA Faktoren auf viraler mRNA, SF2/ASF und Aly auf direkte Weise mit NS1 interagieren. Durch die Ergebnisse der Bindungsassays mit RNase A Behandlung wird deutlich, dass RNA jedoch eine gewisse Rolle spielt. Die Anwesenheit von RNA könnte die Komplexbildung beispielsweise unterstützen (siehe Diskussion).

3.2.5 Der N-Terminus von NS1 ist essentiell für die Interaktion mit SF2/ASF und Aly

Infolge des Nachweises einer direkten Interaktion von NS1 mit zellulären Exportfaktoren war es nun von Interesse zu untersuchen, welche Domäne des NS1 Proteins für die Bindung notwendig ist. Die bereits durchgeführten Bindungsassays in Abschnitt 3.2.3, die mit einem RNA-bindungsdefizienten NS1 Protein durchgeführt wurden, deuten darauf hin, dass der N-Terminus für die Interaktion wichtig ist.

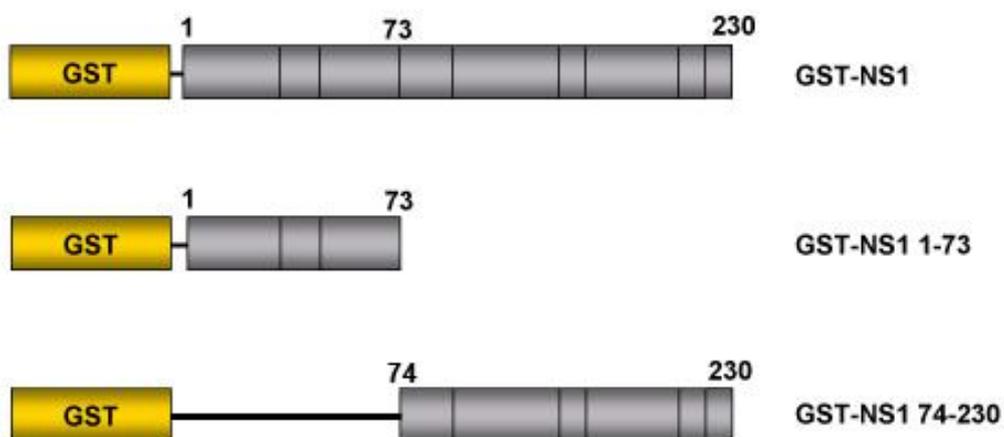


Abb. 3.14: Schematische Darstellung der GST-Fusionsproteine GST-NS1, GST-NS1 1-73 und GST-NS1 74-230. Neben GST-NS1 wurden Deletionsmutanten für Bindungsassays eingesetzt. Diese bestanden entweder aus der aminoterminalen Domäne (N-Terminus, NS1 1-73) oder aus der carboxyterminalen Domäne (C-Terminus, NS1 74-230).

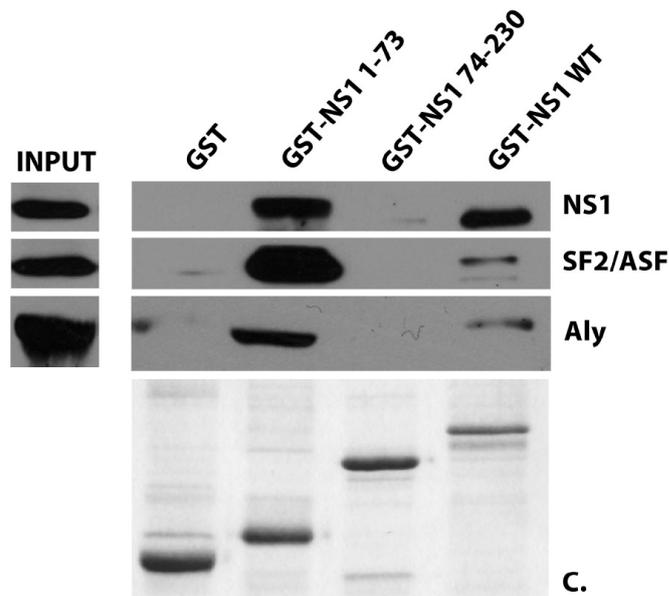


Abb. 3.15: Die Exportfaktoren SF2/ASF und Aly interagieren mit dem N-Terminus des NS1 Proteins. GST-Bindungsassays wurden mit bakteriell exprimierten und an Glutathion-Sepharose immobilisiertem GST bzw. GST-NS1 oder GST-NS1 Mutanten und Zelllysaten von infizierten A549 Zellen (A/PR/8, MOI5) durchgeführt. Gebundene Proteinkomplexe wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot Analyse ausgewertet. NS1, SF2/ASF und Aly Proteine wurden jeweils mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die GST-Fusionsproteine wurden durch Färbung mit Coomassie Blue (C.) detektiert.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden Deletionsmutanten des NS1 Proteins hergestellt, die entweder aus dem N-Terminus (Aminosäuren 1-73) oder dem C-Terminus (Aminosäuren 74-230) bestanden (Abb. 3.14). Die Mutanten wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und in *in vitro* Bindungsassays mit Zelllysaten, die zuvor mit Influenza A/PR/8/34 infiziert wurden, eingesetzt (Abb. 3.15). Zelluläres SF2/ASF und Aly präzipitierte nur mit dem NS1 WT Protein oder dem NS1 N-Terminus. Das C-terminale NS1 Protein, welches die Effektdomäne des Proteins trägt, konnte weder SF2/ASF noch Aly oder NS1 binden. Das deutete darauf hin, dass der N-Terminus des Proteins essentiell für die Interaktion von viralem NS1 mit den zellulären Faktoren SF2/ASF und Aly war.

3.2.6 SF2/ASF und Aly kopräzipitieren mit viralem NS1 Protein aus infizierten Zellen

Um *in situ* und *in vitro* Daten der Interaktion zwischen NS1 und SF2/ASF, bzw NS1 und Aly in einem *in vivo* Ansatz zu verifizieren, wurden Ko-Immunpräzipitationen in 293T-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden dazu mit einer MOI von 10 mit Influenza A/PR/8/34 Virus (PR8) bzw. mock infiziert. Nach sechs Stunden wurden die Zellen lysiert und mit einem an Protein G-Agarose immobilisierten NS1-spezifischen Kaninchen-Antiserum oder einem entsprechenden

Kontroll-Prä-Immunsensum inkubiert. Nach vier Stunden Inkubation, rotierend bei 4°C, wurden die präzipitierten Proteine dreimal gewaschen und im Immunoblot analysiert. Abbildung 3.16 zeigt die Immunoblots der Lysate. Tubulin diente als Expressionskontrolle um sicherzustellen, dass vergleichbare Proteinmengen in der Ko-Immunspräzipitation eingesetzt wurden.

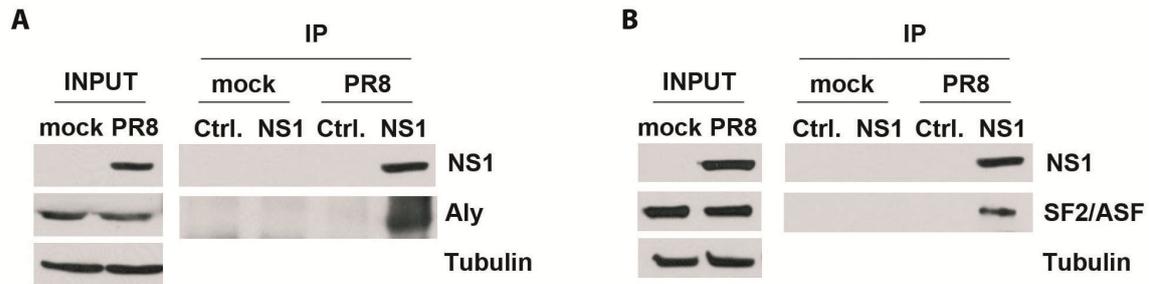


Abb. 3.16: Aly und SF2/ASF kopräzipitieren mit NS1 aus den Lysaten infizierter Zellen. 293T-Zellen wurden nicht oder mit Influenza A/PR/8 mit einer MOI von 10 infiziert. Sechs Stunden nach der Infektion wurden die Zellen lysiert. 5% der Lysate wurden als Inputkontrolle im Immunoblot analysiert. Die Lysate wurden mit an Protein G-Agarose immobilisiertem NS1 Antiserum oder einem entsprechenden Kontroll-Präimmunsensum in einem Reaktionsansatz inkubiert. Die Präzipitate der Proben sowie der Inputproben wurden im Immunoblot mit den Antikörpern gegen NS1, Aly bzw. SF2/ASF und Tubulin, welches als Ladekontrolle diente, analysiert. IP: Immunpräzipitation; mock: mock behandelte Zellen; PR8: mit Influenza A/PR/8/34 infizierte Zellen; Ctrl: Immunpräzipitation durchgeführt mit Kontroll-Präimmunsensum; NS1: Immunpräzipitation durchgeführt mit NS1-spezifischem Kaninchen-Antiserum. Die Experimente wurden dreimal mit demselben Ergebnis durchgeführt.

Es stellte sich deutlich dar, dass Aly (Abb. 3.16 A) bzw. SF2/ASF (Abb. 3.16 B) nur aus Lysaten von infizierten Zellen mit dem spezifischen NS1 Antikörper präzipitiert wurden. Beide Interaktionen konnten hiermit erstmals in einem *in vivo* Ansatz nachgewiesen werden.

3.3 Charakterisierung der Bindungsdomänen von SF2/ASF und Aly für NS1

Nachdem anhand unterschiedlicher Methoden die Interaktion zwischen NS1 und SF2/ASF bzw. Aly bestätigt wurden, und mittels *in vitro* Bindungsuntersuchungen festgestellt wurde, dass die zellulären Proteine mit dem N-Terminus des NS1 Proteins interagieren, stellte sich im Folgenden die Frage, welche Domänen der zellulären Proteine an der Interaktion beteiligt waren. Kenntnisse über die beteiligten Domänen würden Aufschlüsse über die Komplexbildung geben und zu einem besseren Verständnis der Interaktionen mit dem viralen NS1 Protein führen. Der Exportfaktor Aly beispielsweise wird über eine Bindung von UAP56 an den C-Terminus des Proteins (Aminosäuren 239-255) an zelluläre mRNA rekrutiert. Es wäre interessant zu verstehen, ob das NS1 Protein eine ähnliche Strategie verfolgt und mit UAP56 um diese Bindung konkurriert, oder ob es an eine andere Domäne bindet (M. L. Luo u. a. 2001).

Der N-Terminus des SF2/ASF Proteins besteht aus RNA-Erkennungssequenzen, der C-Terminus enthält die RS-Domäne, die die Lokalisation und Funktion des Proteins kontrolliert (Koizumi u. a. 1999; Ngo u. a. 2008). Durch eine Beteiligung des SF2/ASF Proteins am Spleißvorgang der M1 mRNA (Shih und Krug 1996) wäre es möglich, dass die RS-Domäne für eine Interaktion mit viralen Faktoren zugänglich wird. Um diese Möglichkeiten zu untersuchen wurden Expressionsplasmide für Mutanten der Aly und SF2/ASF Proteine für die Durchführung von BiFC Assays konstruiert. Anhand dieser sollte die Lokalisation der Interaktionsdomäne stattfinden.

3.3.1 Die RS-Domäne des SF2/ASF ist nicht an einer Interaktion mit NS1 beteiligt

Die Arginin/Serin reiche Domäne (RS-Domäne) des SF2/ASF Proteins vermittelt wichtige Funktionen des Proteins. Zum einen dient sie der Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen, zum anderen aber ist sie in die Spleiß-Funktion des Proteins involviert (Zuo und Manley 1993; Blaustein u. a. 2009).

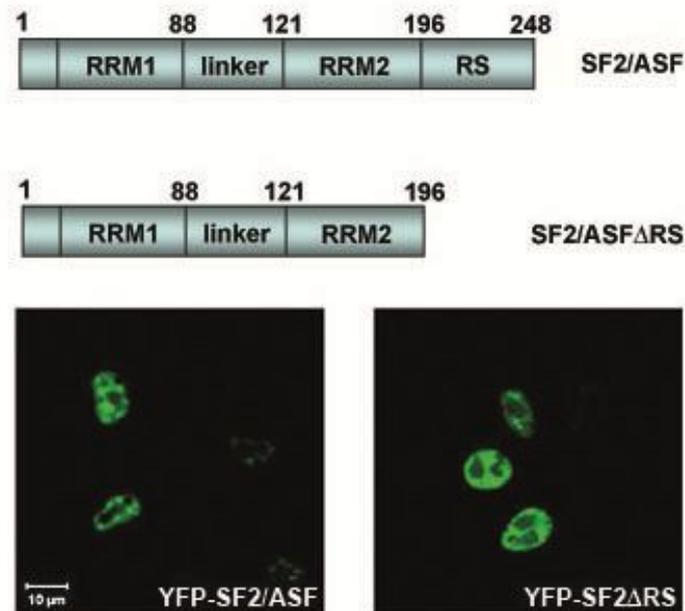


Abb.3.17: SF2/ASF Δ RS Mutante. Schematische Darstellung des SF2/ASF WT Proteins und des SF2/ASF Δ RS Proteins. Die Δ RS Mutante besitzt eine Deletion am C-Terminus des Proteins und ist somit um 52 Aminosäuren verkürzt. Immunfluoreszenzanalyse der YFP-Fusionsproteine in HeLa-Zellen zeigte, dass trotz der Deletion die mutierte Version des SF2/ASF ebenfalls im Zellkern lokalisiert war. RRM: RNA recognition morif; RS: Arginine/Serine rich motif.

Auch eine Beteiligung am Spleißvorgang der viralen M1 mRNA konnte von Shih und Kollegen nachgewiesen werden (Shih und Krug 1996). Die Phosphorylierung der RS-Domäne reguliert

sowohl die Funktion als auch die Lokalisation des Proteins (Koizumi u. a. 1999; Bourgeois, Lejeune, und Stévenin 2004; Yingqun Huang, Yario, und Steitz 2004). Weiterhin wurde beschrieben, dass die Phosphorylierung der RS Domäne notwendig ist für eine intrazelluläre Lokalisation des Proteins in Speckle Domänen (C.-T. Ma u. a. 2008) (siehe Abschnitt 1.2.1), wohingegen hypophosphoryliertes SF2/ASF bevorzugt an den Exportrezeptor TAP/NXF1 bindet (Yingqun Huang, Yario, und Steitz 2004; M.-C. Lai und Tarn 2004). Ob die RS-Domäne an der Interaktion mit dem NS1 Protein beteiligt war, sollte in BiFC Assays untersucht werden.

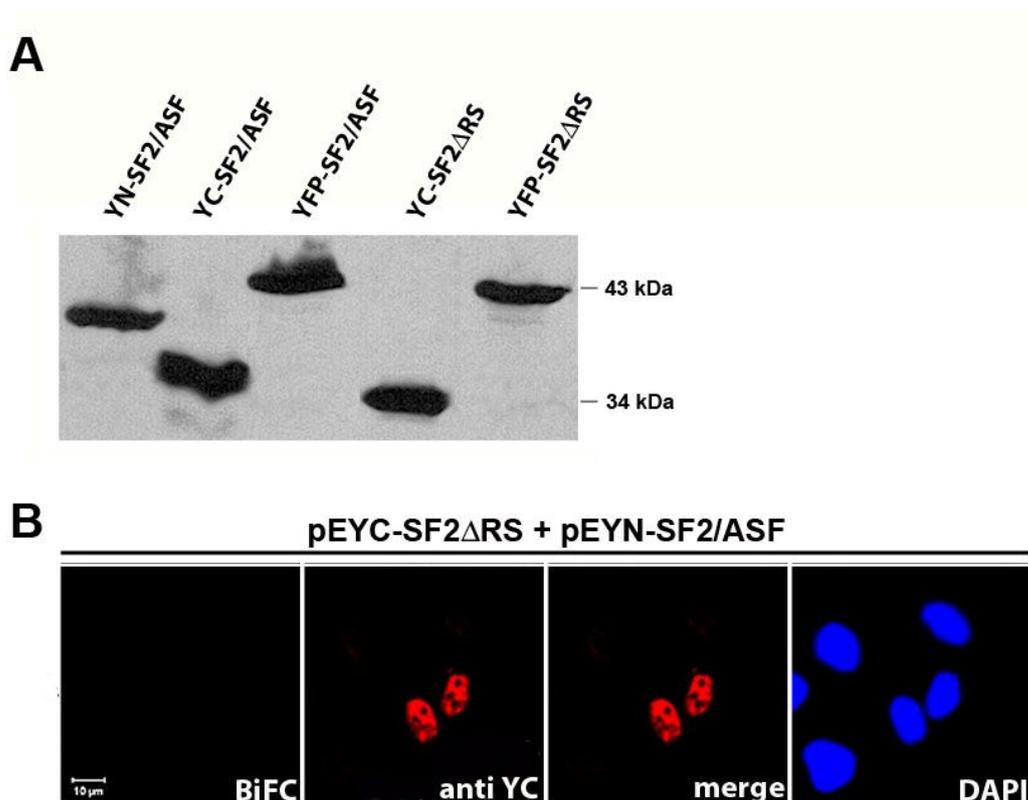


Abb. 3.18: YC-SF2/ASF Δ RS interagiert nicht mehr mit YN-SF2/ASF. A) Zur Nachweis der Expression der WT und mutierten SF2/ASF Proteine wurden 293T Zellen mit 2,5 μ g der jeweiligen Expressionsplasmide transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Lysate mittels Immunoblot analysiert. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte mit einem spezifischen SF2/ASF Antikörper. B) HeLa-Zellen wurden mit pEYC-SF2/ASF Δ RS und pEYN-SF2/ASF transient transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. In der Immunfluoreszenzanalyse wurde YC-SF2/ASF Δ RS mit einem spezifischen primären antiGFP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper detektiert, der das YC-Fragment erkennt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Abbildung 3.17 zeigt die schematische Darstellung des SF2/ASF Proteins und der SF2/ASF Δ RS Mutanten sowie die Expression der jeweiligen YFP-Fusionsproteine in HeLa Zellen. Die Lokalisation der Mutante war durch die Funktion im Vergleich zum WT nicht gestört, auch SF2/ASF Δ RS war wie das WT Protein im Nukleoplasma lokalisiert.

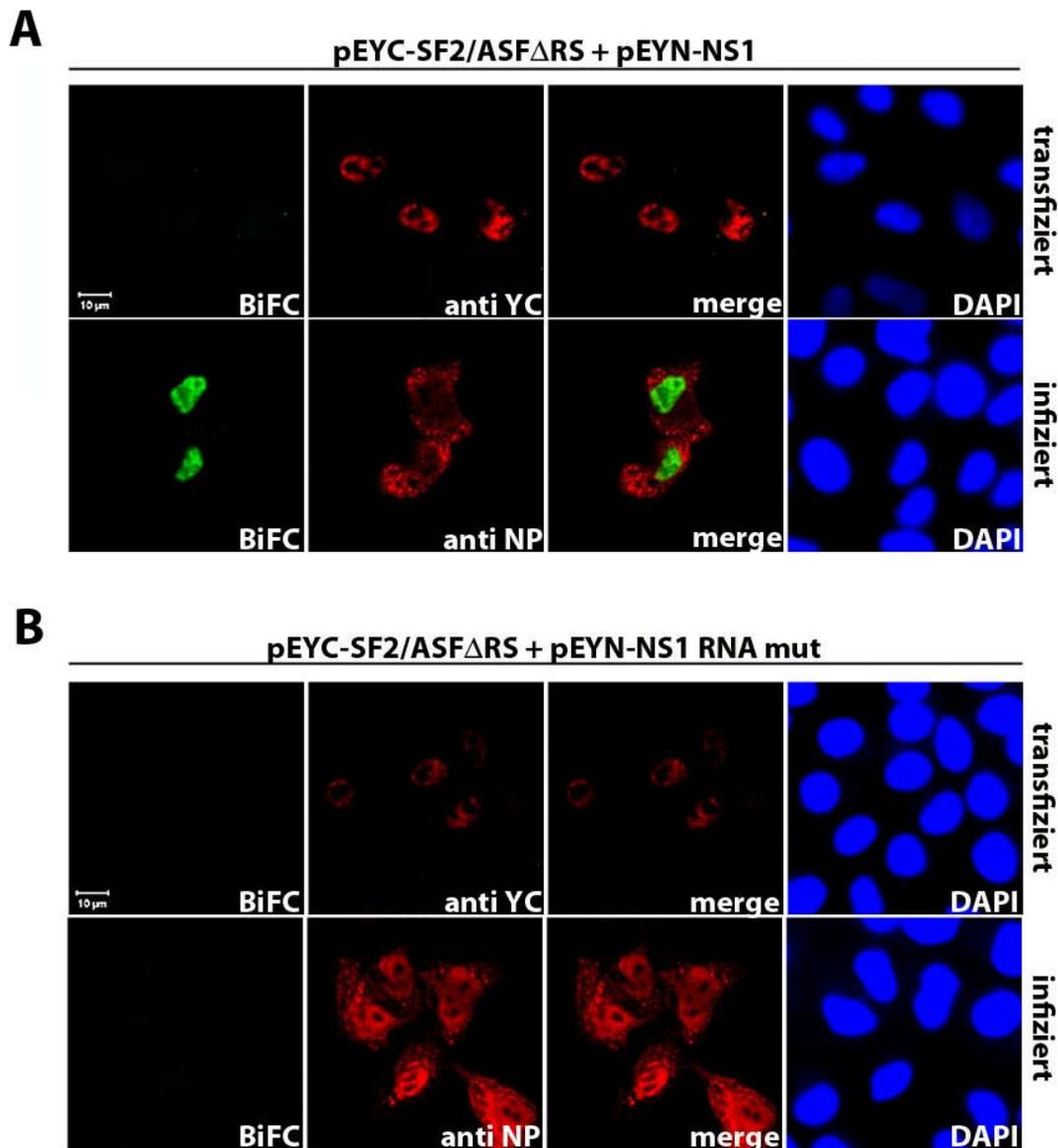


Abb. 3.19: Die RS-Domäne des SF2/ASF Proteins ist nicht notwendig für die Interaktion mit NS1. A) HeLa-Zellen wurden mit pEYC-SF2/ASF Δ RS und pEYN-NS1 transfiziert. Nach der BiFC Komplexbildung bei 30°C wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert. YC-SF2/ASF Δ RS wurde mit einem Protein-spezifischen antiGFP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper detektiert, der spezifisch das YC-Fragment erkennt (oberes Panel). Parallel wurden transfizierte Zellen mit Influenza A/PR/8 MOI 3 infiziert (unteres Panel). Nach 5 Stunden Inkubation bei 37°C und weiteren 2 Stunden bei 30°C wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Mit einem Protein-spezifischen primären antiNP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper wurde das virale NP Protein gefärbt. B) HeLa-Zellen wurden mit pEYC-SF2/ASF Δ RS und pEYN-NS1 RNA mut transfiziert (oberes Panel). Die Zellen wurden zuerst bei 37°C und dann bei 30°C inkubiert bevor sie fixiert und permeabilisiert wurden. In der Immunfluoreszenzanalyse wurde YC-SF2/ASF Δ RS mit einem primären antiGFP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper detektiert, der das YC-Fragment bindet. Dies galt dem Nachweis der erfolgreichen Transfektion. Im unteren Panel ist derselbe Versuchsansatz mit A/PR/8 infizierten Zellen gezeigt (MOI3). In diesem Ansatz wurde das virale NP Protein mit einem Protein-spezifischen antiNP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus spezifischen Antikörper gefärbt, um die Infektion nachzuweisen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Bereits Cazalla und Kollegen zeigten, dass eine SF2/ASF Δ RS Mutante im Zellkern lokalisiert, aber auch im Zytoplasma nachweisbar war (Cazalla u. a. 2002). Es ist möglich, dass die Konzentration der Mutante im Zytoplasma zu gering war, um sie in diesem Ansatz zu detektieren. Die korrekte Expression der mutierten und WT SF2/ASF Proteine wurde kontrolliert, indem die Fusionsproteine in 293T Zellen exprimiert und im Immunoblot analysiert wurden (Abb. 3.18 A). Anschließend wurden, wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben BiFC Assays durchgeführt. Als erstes wurde getestet, ob das SF2 Δ RS Protein mit dem WT SF2/ASF interagieren konnte (Abb. 3.18 B). Danach wurde die Interaktion des SF2 Δ RS mit NS1 bzw. NS1 RNA mut überprüft (Abb. 3.19). Dazu wurden HeLa-Zellen transient transfiziert, die Hälfte der Ansätze wurde im Anschluss mit Influenza PR/8/34 infiziert. Nach entsprechender Inkubation wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit spezifischen monoklonalen GFP, bzw. NP Antikörpern und den sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG-Maus-spezifischen Antikörpern gefärbt und für die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) vorbereitet. Die Analyse der 293T Zelllysate zeigte eine vergleichbare Expression der SF2ASF Fusionsproteine und der SF2 Δ RS Fusionsproteine (Abb. 3.18 A). Das unterschiedliche Laufverhalten im Gel beruhte auf den unterschiedlichen molekularen Größen der YC-, YN- und YFP-Fragmente sowie auf der Deletion der RS-Domäne. Das BiFC Assay ergab, dass SF2/ASF Δ RS nicht mehr mit SF2/ASF dimerisieren konnte (Abb. 3.18 B). Dies deutete auf eine Beteiligung der RS-Domäne an der Dimerisierung von SF2/ASF hin. In der Literatur ist bisher nicht beschrieben worden, welcher Part des SF2/ASF Proteins für die Multimer-Bildung notwendig ist. In BiFC Assays mit SF2/ASF Δ RS und NS1 wurde keine Interaktion detektiert (Abb. 3.19 A, oberes Panel). Nach Infektion hingegen konnte ein Fluoreszenzsignal in der Analyse nachgewiesen werden, was auf eine Interaktion von SF2/ASF Δ RS mit NS1 hindeutete (Abb. 3.19 A, unteres Panel). Dieselbe Untersuchung wurde ebenfalls mit der bereits eingeführten NS1 RNA mut durchgeführt (Abb. 3.19 B). In diesem Fall war aufgrund der Mutation im NS1 Protein weder in transfizierten noch in zusätzlich infizierten Zellen eine Interaktion zu beobachten. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der RNA-Bindungsdomäne des NS1 Proteins für die Ausbildung der Interaktion mit SF2/ASF. Wie zuvor in GST-Bindungsstudien gezeigt, konnte das SF2/ASF WT Protein keine Interaktion mit dem NS1 RNA mut Protein ausbilden (Abb. 3.10). Die RNA Bindungsdomäne des NS1 Proteins ist daher für eine Interaktion mit SF2/ASF notwendig.

Da mit dem WT NS1 Protein eine Interaktion mit SF2/ASF Δ RS Protein in infizierten Zellen detektiert werden konnte, wurde aus diesen Daten geschlossen, dass die RS-Domäne des SF2/ASF Proteins nicht an der Interaktion mit NS1 beteiligt war.

3.3.2 Charakterisierung der Interaktion von Aly und NS1

Neben SF2/ASF übernimmt auch Aly wichtige Aufgaben im zellulären mRNA Exportweg (Stutz et al., 2000; Zhou et al., 2000). Es war von Interesse, die Aly-Domäne zu charakterisieren, die

an einer Interaktion mit NS1 beteiligt war, um Rückschlüsse über das Zusammenspiel und den zugrunde liegenden Mechanismen zu ziehen. Hierfür wurden Expressionsvektoren für drei Aly-Mutanten konstruiert (Abb. 3.20): eine Aly Δ RGG1 Mutante, deren N-Terminus deletiert war, eine Aly Δ RGG2 und eine Aly Δ C Mutante. Die beiden letzten trugen Deletionen am C-Terminus, die entweder die RGG2 Domäne mit beinhaltet, oder nur den kurzen C-terminalen Abschnitt. Zenklusen und Kollegen haben beschrieben, dass eine C-terminale Deletion des Proteins nur eine moderate Abnahme der mRNA Exportaktivität des Proteins hervorruft, wohingegen eine N-terminale Deletion zu starken Einschränkungen im mRNA Export in Hefen führt (Zenklusen u. a. 2001). Diese Beeinträchtigung beruht auf einer verminderten Bindungsaffinität der N-Terminale trunkierten Version an RNA und TAP/NXF1 (Zenklusen u. a. 2001). Weiterhin gilt der C-terminale Abschnitt von Aminosäure 239 bis 255 des Aly Proteins als eine Domäne, die Protein-Protein Interaktionen vermittelt. So führte eine Deletion dieser Domäne zu einer Aufhebung der Interaktion mit UAP56 (M. L. Luo u. a. 2001).

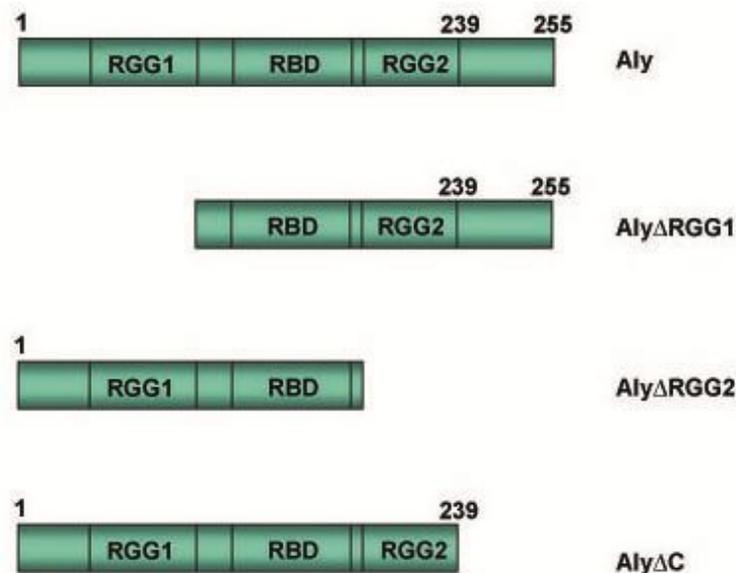


Abb. 3.20: Schematische Darstellung der Aly Mutanten und Expression der YFP-Konstrukte. Die Δ RGG1 Mutante besitzt eine Deletion am N-Terminus des Proteins und die aminoterminal RGG Domäne nicht mehr aufweist. Die Δ RGG2 Mutante besitzt im Gegensatz dazu eine Deletion am C-Terminus des Proteins und trägt somit keine RGG2 Domäne. Die Δ C Mutante verfügt über eine kurze Deletion am C-Terminus, die RGG Domäne ist aber noch intakt. Immunfluoreszenzanalyse der YFP-Fusionsproteine in HeLa Zellen zeigte, dass trotz der Deletionen der einzelnen Mutanten die mutierte Version des Aly ebenfalls im Zellkern lokalisiert war. RGG: Arginine/Glycin rich domain; RBD: RNA binding domain.

Die Expression der YFP-Fusionsproteine von Aly Δ RGG1 und Aly Δ RGG2 zeigte, dass beide Mutanten, wie auch das WT Protein im Nukleoplasma detektiert werden konnten (Abb. 3.21 A). Die Expression der Mutanten wurde zusätzlich in 293T Zellen kontrolliert. 24 Stunden nach Transfektion der Zellen wurden diese lysiert und die Lysate im Immunoblot mit einem

spezifischen antiAly Antikörper analysiert (Abb. 3.21 B). Alle Mutanten konnten detektiert werden, die Expression der Proteine war demnach nicht beeinträchtigt.

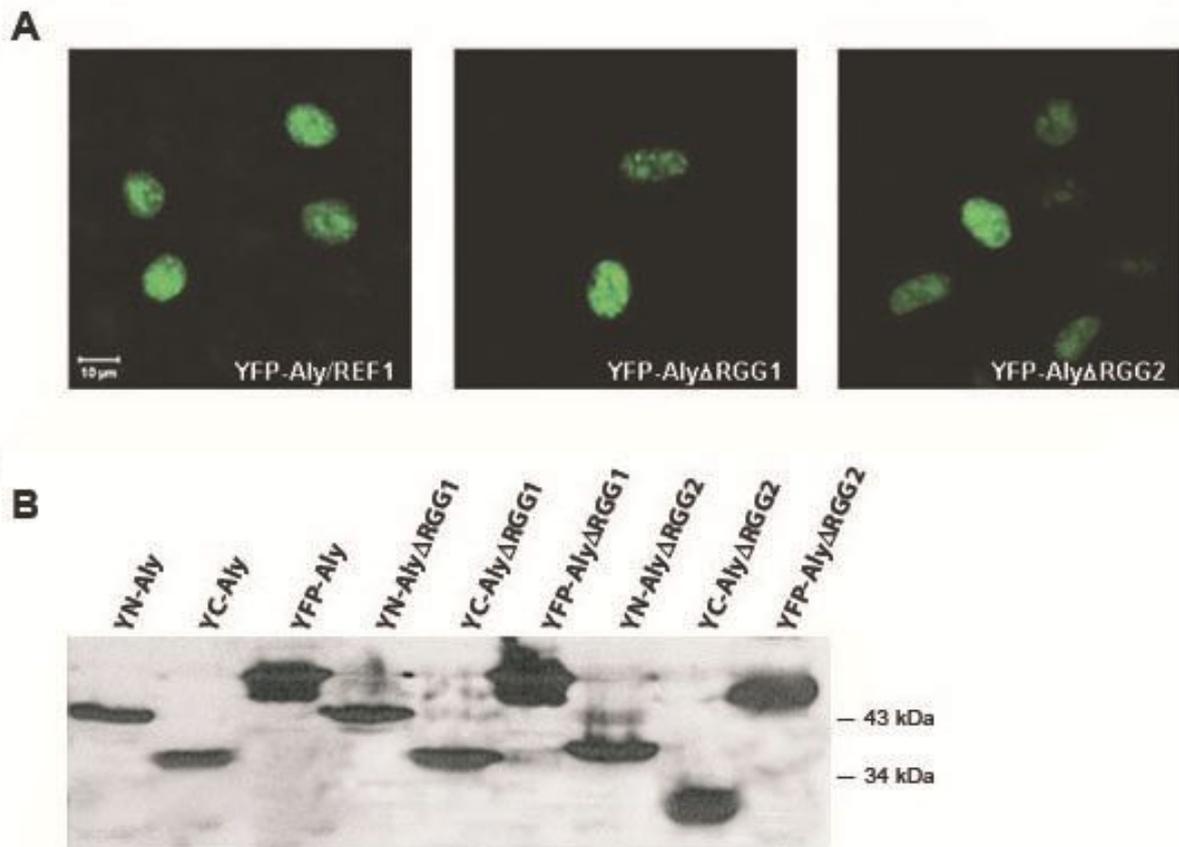


Abb. 3.21: Expression der YFP-Konstrukte der AlyΔRGG1 und AlyΔRGG2 Mutanten im Vergleich zu Aly WT. A) Immunfluoreszenzanalyse der YFP-Fusionsproteine in HeLa-Zellen zeigte, dass trotz der Deletionen der einzelnen Mutanten die mutierte Version des Aly ebenfalls im Zellkern lokalisiert war. B) Zur Kontrolle der Expression wurden 293T-Zellen mit den jeweiligen Expressionsplasmiden transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Lysate im Immunoblot analysiert. Der Nachweis der Aly Proteine erfolgte durch einen spezifischen Aly Antikörper. RGG: Arginine/Glycin rich domain; RBD: RNA binding domain.

3.3.3 AlyΔRGG1 interagiert mit dem viralen NS1 Protein

Die AlyΔRGG1 Mutante wurde zuerst in Kombination mit dem WT Aly in HeLa-Zellen exprimiert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden das YC-Fusionsprotein mit einem primären monoklonalem GFP Antikörper gefärbt um die Transfektion zu kontrollieren (Abb. 3.22). Es konnte keine Dimerisierung von Aly mit AlyΔRGG1 detektiert werden (Abb. 3.22). Das deutete auf eine Beeinträchtigung in der Funktion der Aly Mutante hin, da Aly im Normalfall Homodimere ausbilden kann. Welche Domäne für eine Dimer-Bildung notwendig ist, wurde bisher nicht beschrieben. Die hier dargestellten Ergebnisse deuten auf eine Dimerisierung über die RGG1 Domäne hin.

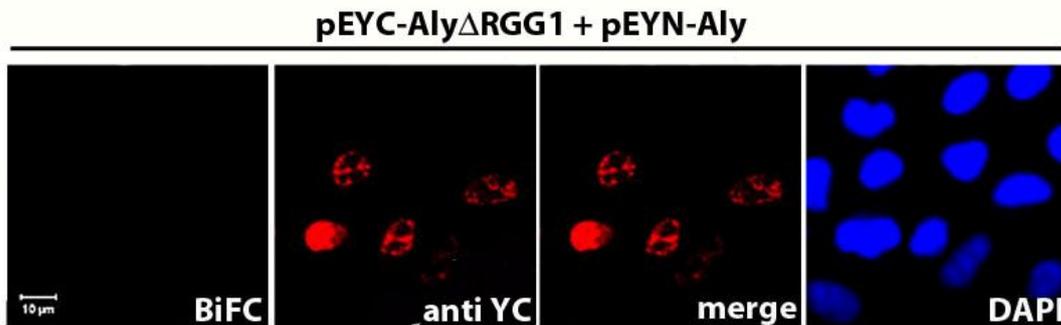


Abb. 3.22: YC-Aly Δ RGG1 interagiert nicht mehr mit YN-Aly. HeLa-Zellen wurden entweder mit pEYC-Aly Δ RGG1 allein, oder mit pEYC-Aly Δ RGG1 und pEYN-Aly transient transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. In der Immunfluoreszenzanalyse wurde YC-Aly Δ RGG1 mit einem spezifischen primären antiGFP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper detektiert, der das YC-Fragment erkennt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Um zu untersuchen, ob eine Interaktion mit NS1 stattfindet, wurden NS1- und Aly Δ RGG1-Fusionskonstrukte in HeLa-Zellen transient transfiziert. Die Zellen wurden entweder nicht oder mit PR/8/34 (MOI 5) für insgesamt acht Stunden inkubiert, davon drei Stunden bei 30°C. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. YC-Aly Δ RGG1 oder NP wurden mit primären spezifischen antiFP oder antiNP Antikörpern und sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörpern gefärbt und für die CLSM vorbereitet. Sowohl in transfizierten, als auch in zusätzlich infizierten Zellen wurden eine Fluoreszenzkomplementation detektiert (Abb. 3.23 A). Dasselbe Assay wurde parallel mit NS1 RNA mut durchgeführt (Abb. 3.23 B). In diesen Ansätzen konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Das bedeutete, dass Aly Δ RGG1 in der Lage war mit NS1 zu interagieren. Eine Mutation in der RNA-Bindungsdomäne des NS1 Proteins hingegen konnte keinen Komplex mit Aly Δ RGG1 ausbilden. Somit zeigen diese Ergebnisse, dass die RGG1 Domäne des Exportfaktors Aly nicht notwendig für die Interaktion mit NS1 war. Die RNA-Bindungsdomäne des NS1 Proteins war hingegen für eine Interaktion essentiell. Diese Ergebnisse deuteten daraufhin, dass der N-Terminus des Aly Proteins, die RGG1 Domäne, nicht für die Ausbildung der Interaktion mit NS1 notwendig war, da auch ohne diese Domäne eine Interaktion im BiFC beobachtet werden konnte.

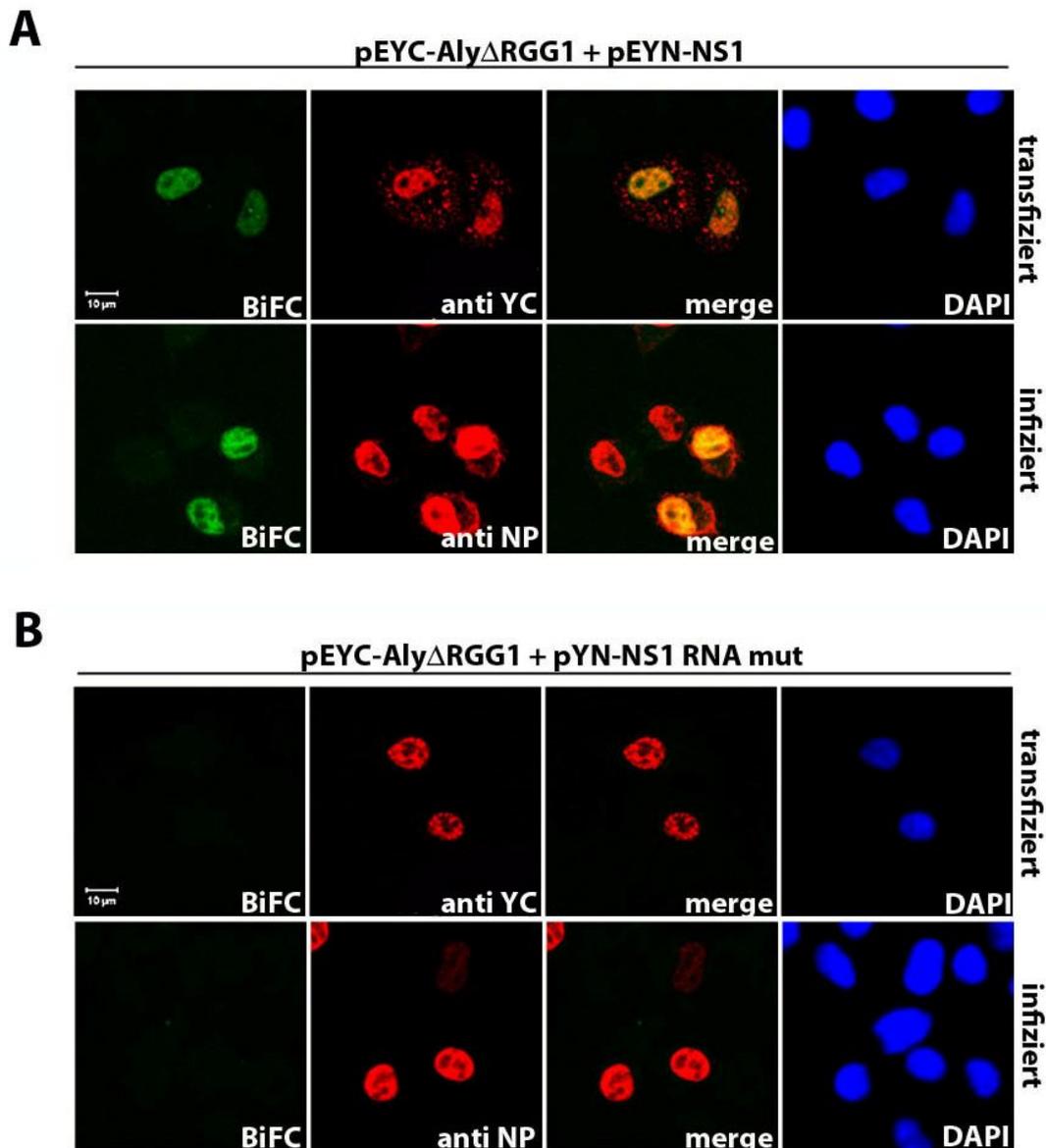


Abb. 3.23: Die RGG1 Domäne des Aly Proteins ist für die Interaktion mit NS1 nicht notwendig. A) HeLa-Zellen wurden mit pEYC-Aly Δ RGG1 und pEYN-NS1 transfiziert. Nach der BiFC Komplexbildung bei 30°C wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert. YC-Aly Δ RGG1 wurde mit einem Protein-spezifischen antiGFP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper detektiert, der spezifisch das YC-Fragment erkennt (oberes Panel). Parallel wurden transfizierte Zellen mit Influenza A/PR/8 MOI3 infiziert (unteres Panel). Nach 5 Stunden Inkubation bei 37°C und weiteren 2 Stunden bei 30°C wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Mit einem Protein-spezifischen primären antiNP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper wurde das virale NP Protein gefärbt. B) HeLa-Zellen wurden mit pEYC-Aly Δ RGG1 und pEYN-NS1 RNA mut transfiziert (oberes Panel). Die Zellen wurden zuerst bei 37°C und dann bei 30°C inkubiert bevor sie fixiert und permeabilisiert wurden. In der Immunfluoreszenzanalyse wurde YC-Aly Δ RGG1 mit einem primären antiGFP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper detektiert, der das YC-Fragment bindet. Dies galt dem Nachweis der erfolgreichen Transfektion. Im unteren Panel ist derselbe Versuchsansatz mit A/PR/8 infizierten Zellen gezeigt (MOI3). In diesem Ansatz wurde das virale NP Protein mit einem Protein-spezifischen antiNP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus spezifischen Antikörper gefärbt, um die Infektion nachzuweisen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

3.3.4 Der Carboxyterminus von Aly ist für eine Interaktion mit NS1 notwendig

Als nächstes wurde Aly Δ RGG2 auf eine Interaktion mit NS1 untersucht. YC-Aly Δ RGG2 wurde allein oder zusammen mit Aly WT in HeLa Zellen koexprimiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für zwei Stunden bei 30°C inkubiert und im Anschluss fixiert und permeabilisiert. YC-Aly Δ RGG2 wurde mit einem primären monoklonalen Antikörper gegen GFP gefärbt. Einzeln exprimiert kam es zu keinem Fluoreszenzsignal. In Kombination mit dem Aly WT-Protein konnte die Mutante ein Heterodimer bilden (Abb. 3.24). Wie unter Abb. 3.3 beschrieben, wurde auch hier ein Fluoreszenzsignal sowohl im Nukleoplasma, als auch in den Zellnukleoli detektiert. Neben der bereits beschriebenen Möglichkeit einer Überexpression, könnte eine durch Stress induzierte nukleolare Lokalisation hervorgerufen worden sein, wie es in Pflanzen für Proteine des Exon Junction Komplexes (EJC), u.a. Aly, nach Stress nachgewiesen wurde (Koroleva u. a. 2009).

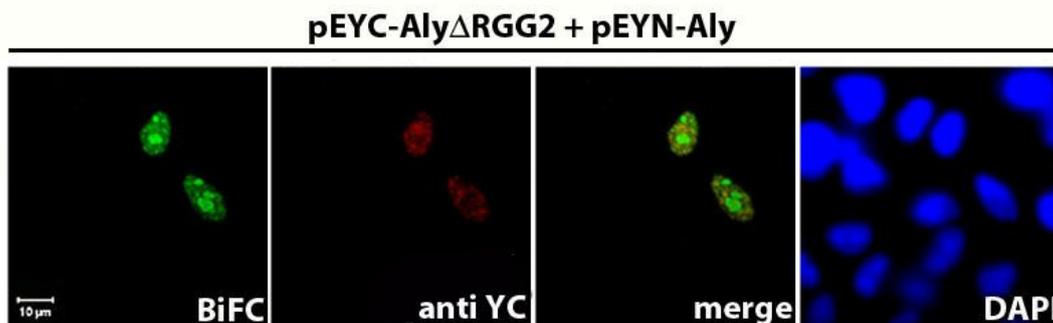


Abb. 3.24: YC-Aly Δ RGG2 dimerisiert mit YN-Aly. HeLa-Zellen wurden entweder mit pEYC-Aly Δ RGG2 allein, oder mit pEYC-Aly Δ RGG2 und pEYN-Aly transient transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. In der Immunfluoreszenzanalyse wurde YC-Aly Δ RGG2 mit einem spezifischen primären antiGFP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper detektiert, der das YC-Fragment erkennt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Es folgte die Untersuchung der Interaktion zwischen Aly Δ RGG2 und NS1 um die Rolle des C-Terminus von Aly bei der Interaktion mit NS1 zu klären. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit den jeweiligen Plasmiden transient transfiziert. Ein Teil der Zellen wurde 24 Stunden nach der Transfektion zusätzlich mit PR/8/34 (MOI 5) infiziert. Nach den Inkubationsschritten bei 37°C und 30°C wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. YC-Aly Δ RGG2 oder NP wurden mit spezifischen primären GFP oder NP Antikörpern gefärbt. Weder in transfizierten noch in zusätzlich infizierten Zellen konnte eine Fluoreszenzkomplementation zwischen Aly Δ RGG2 und NS1 detektiert werden (Abb. 3.25 A). Es wurde ebenfalls keine Interaktion zwischen Aly Δ RGG2 und NS1 RNA mut beobachtet (Abb. 3.25 B).

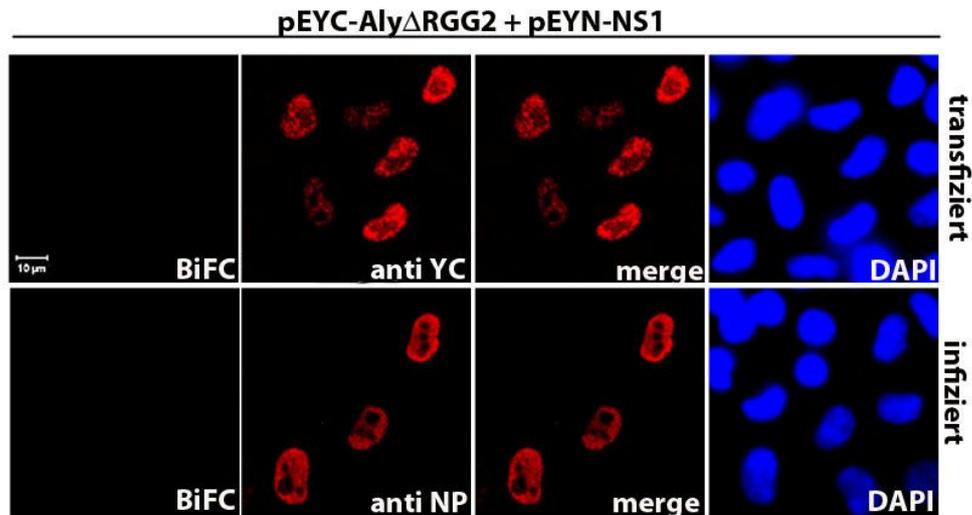
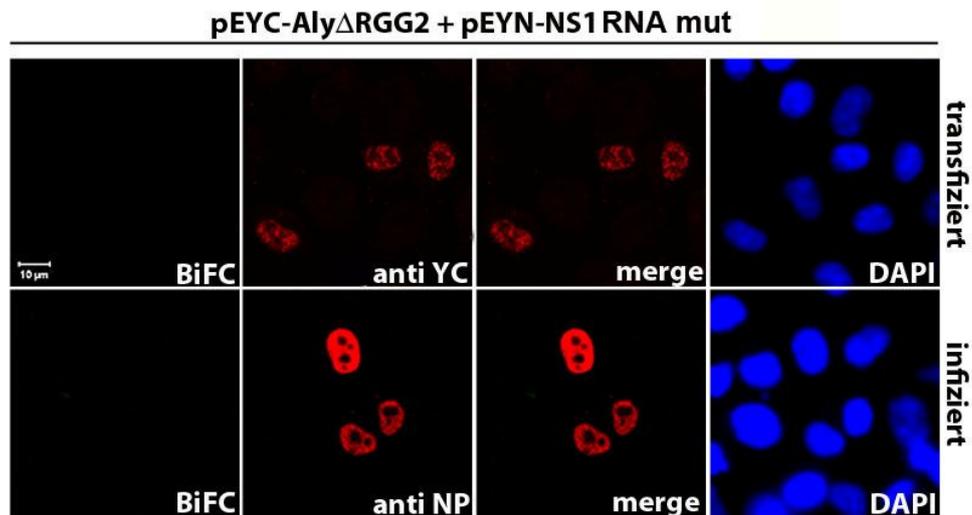
A**B**

Abb. 3.25: Die RGG2 Domäne des Aly Proteins ist für die Interaktion mit NS1 notwendig. A) HeLa-Zellen wurden mit pEYC-Aly Δ RGG2 und pEYN-NS1 transfiziert. Nach der BiFC Komplexbildung bei 30°C wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert. YC-Aly Δ RGG2 wurde mit einem Protein-spezifischen antiGFP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper detektiert, der spezifisch das YC-Fragment erkennt (oberes Panel). Parallel wurden transfizierte Zellen mit Influenza A/PR/8 MOI3 infiziert (unteres Panel). Nach 5 Stunden Inkubation bei 37°C und weiteren 2 Stunden bei 30°C wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Mit einem Protein-spezifischen primären antiNP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper wurde das virale NP Protein gefärbt. B) HeLa-Zellen wurden mit pEYC-Aly Δ RGG2 und pEYN-NS1 RNA mut transfiziert (oberes Panel). Die Zellen wurden zuerst bei 37°C und dann bei 30°C inkubiert bevor sie fixiert und permeabilisiert wurden. In der Immunfluoreszenzanalyse wurde YC-Aly Δ RGG2 mit einem primären antiGFP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper detektiert, der das YC-Fragment bindet. Dies galt dem Nachweis der erfolgreichen Transfektion. Im unteren Panel ist derselbe Versuchsansatz mit A/PR/8 infizierten Zellen gezeigt (MOI3). In diesem Ansatz wurde das virale NP Protein mit einem Protein-spezifischen antiNP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus spezifischen Antikörper gefärbt, um die Infektion nachzuweisen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Diese Ergebnisse zeigten, dass der C-Terminus von Aly für die Interaktion mit NS1 benötigt wurde. Um diesen Bereich weiter einzuschränken, wurde eine Aly Δ C Mutante benutzt. Diese Mutante besitzt noch das RGG2 Motiv und wies nur eine kurze Deletion von 15 Aminosäuren (AS 240-255) am Carboxyterminus auf (Abb. 3.21). Für die Untersuchung wurden HeLa-Zellen transient mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PR/8/34 infiziert (MOI 5). Nach 5 Stunden Inkubation bei 37°C und drei Stunden bei 30°C wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und NP zum Nachweis einer erfolgreichen Infektion gefärbt (Abb. 3.26). Die erfolgreiche Expression von Aly Δ C wurde ebenfalls in der Immunfluoreszenz kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

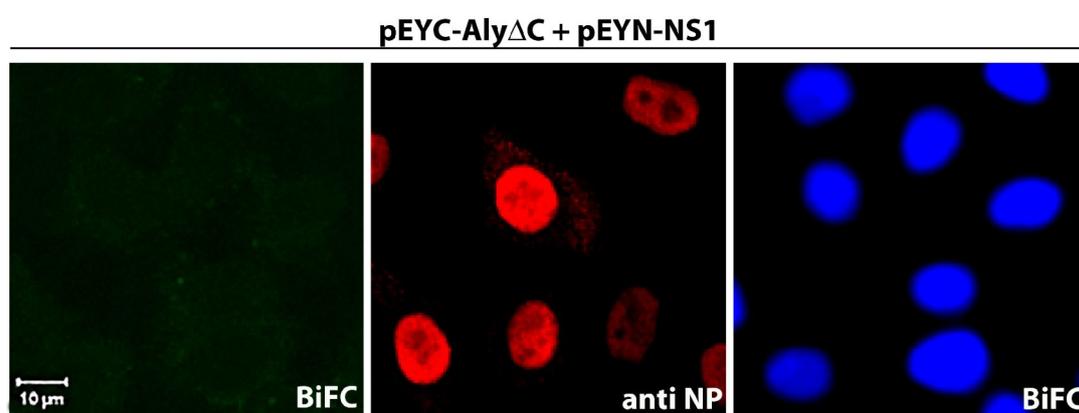


Abb. 3.26: Aly Δ C interagiert nicht mit NS1. HeLa-Zellen wurden mit pEYC-Aly Δ C allein und pEYN-NS1 transient transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Influenza A/PR/8/34 mit einer MOI von 3 infiziert. Nach achtstündiger Infektion bei 37°C und 30°C wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. In der Immunfluoreszenzanalyse wurde virales NP Protein mit einem spezifischen primären antiNP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper detektiert, der das YC-Fragment erkennt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Es konnte keine Fluoreszenzkomplementation zwischen Aly Δ C und NS1 detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass der C-terminale Part von Aminosäureposition 239 bis 255 die Interaktion mit dem viralen NS1 Protein vermittelte. Wie bereits in den Bindungsassays gezeigt wurde, war die Interaktion von Aly und NS1 RNA-sensitiv. Die proximale RGG2 Domäne (AS 188-239), die für die Bindung von Aly an RNA verantwortlich ist, könnte durch Bindung von RNA eine Interaktion stabilisieren.

3.4 Assoziation von viraler mRNA mit SF2/ASF

Ausgehend von einer potentiellen Vermittlungsfunktion des NS1 Proteins im viralen mRNA Export, war zusätzlich zu einer Interaktion mit mRNA Exportfaktoren, eine Bindung an virale mRNA Moleküle *in vivo* zu erwarten. In einer Arbeit von Wang und Kollegen wurde bereits gezeigt, dass NS1 mit viraler NA und M1 mRNA präzipitierte (Wei Wang u. a. 2008). Neben einer Bestätigung dieser Daten wurde die Bindung von SF2/ASF an virale mRNA Moleküle

untersucht. SF2/ASF und Aly sind RNA-bindende Proteine und vermitteln über ihre RNA-Bindung den Export der Moleküle. Die bisherigen Daten bestätigten eine direkte Interaktion der zellulären Faktoren mit dem viralen NS1 Protein. Im Folgenden wurde eine zusätzliche potentielle Assoziation mit viraler mRNA untersucht. Für Aly wurde eine Assoziation mit viraler mRNA bereits gezeigt (Bier, York, und Fodor 2011), SF2/ASF wurde hinsichtlich dieser Funktion bisher nicht untersucht. Aus diesem Grund war es wichtig, eine Assoziation von SF2/ASF an virale mRNA nachzuweisen. Im zellulären mRNA Export bindet SF2/ASF erst an die zu exportierende mRNA und rekrutiert daraufhin den Exportrezeptor TAP/NXF1. Ein Nachweis der Bindung von SF2/ASF an virale mRNA würde ein weiteres Argument für eine Beteiligung dieses Exportfaktors am viralen mRNA Export liefern.

3.4.1 NS1 präzipitiert virale mRNAs

Für die RNA-Immunpräzipitation wurden A549 Zellen nicht oder mit Influenza A/PR/8/34 WT infiziert. Sechs Stunden nach der Infektion wurden die Zellen lysiert.

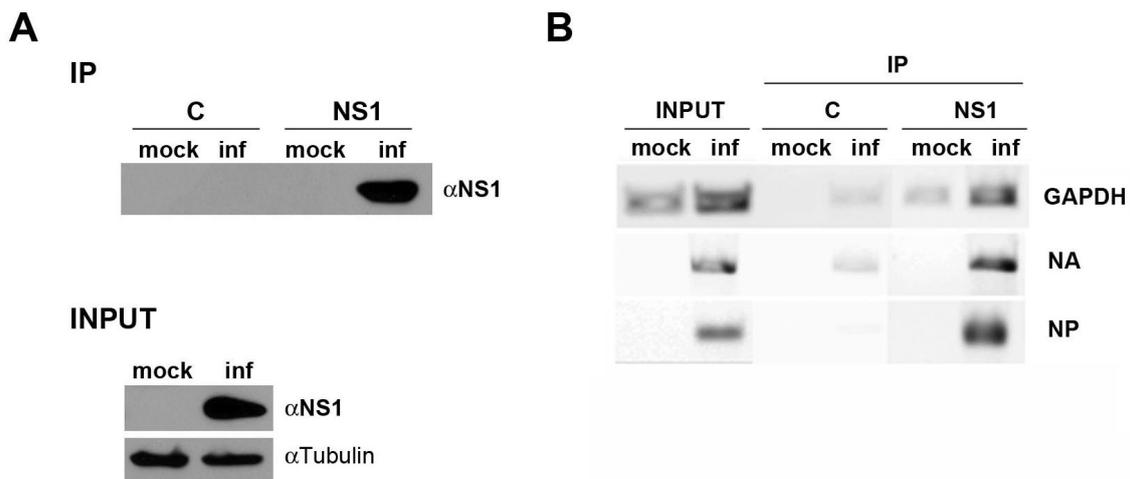


Abb. 3.27: Das virale NS1 Protein präzipitiert virale mRNA. A549-Zellen wurden nicht oder mit Influenza A/PR/8 Virus mit einer MOI von 3 infiziert. Sechs Stunden nach der Infektion wurden die Zellen lysiert. 5% der Lysate wurden als Inputkontrolle im Immunoblot analysiert. Für die RNA-Isolierung wurden je 15% der Lysate als Inputkontrollen verwendet. Die Zelllysate wurden geteilt und mit an Protein G-Agarose immobilisiertem NS1 Antiserum oder einem Prä-Immunsereum in einem Reaktionsansatz inkubiert. Die Präzipitate einer Hälfte der Proben sowie die Input Proben wurden im Immunoblot mit Antikörpern gegen NS1 und Tubulin, welches als Ladekontrolle diente, analysiert (A). Aus der anderen Hälfte der Lysate 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 den spezifischen Primern zur Amplifikation von viralen NA, NP und M1 und zellulären GAPDH cDNAs eingesetzt. Die PCR Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert (B). mock: nicht-infizierte Zellen; inf: mit Influenza A/PR/8/34 infizierte Zellen; Input: Einsatz; IP: Immunpräzipitation; C: Prä-Immunsereum wurde zur Koimmunpräzipitation benutzt; NS1: NS1-Immunsereum wurde zur Koimmunpräzipitation benutzt. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Für die Immunopräzipitation (IP) der NS1 Protein und der damit verbundenen RNA-Koimmunopräzipitation wurden die Lysate mit einem an Protein G-Agarose immobilisierten NS1-spezifischen Kaninchen-Antiserum oder dem entsprechenden Kontroll-Präimmunserum inkubiert. Die erfolgreiche Immunopräzipitation der NS1 Proteine wurden mit der Hälfte der Probe im Immunoblot gezeigt (Abb. 3.27 A). 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 und NP mRNA, sowie zelluläre GAPDH mRNA in den Input Proben und den immunpräzipitierten Proben nachgewiesen (Abb. 3.27 B). Wie bereits in der Literatur gezeigt konnte das virale NS1 Protein virale NA und NP mRNA präzipitieren. Vergleichbare Ergebnisse konnten für die M1 mRNA gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Präzipitation viraler mRNA ist auf eine direkte oder indirekte Bindung des NS1 Proteins an die mRNA zurückzuführen.

3.4.2 SF2/ASF präzipitiert virale mRNAs

Wie zuvor beschrieben wurde eine Bindung von SF2/ASF an virale mRNA Moleküle in einer RNA-Immunopräzipitation untersucht. Hierzu wurden A549 Zellen nicht oder mit Influenza A/PR/8/34 WT infiziert. Nach sechsständiger Infektion wurden die Zellen lysiert. Die Lysate wurden für die Immunopräzipitation der SF2/ASF Proteine und der damit verbundenen RNA-Koimmunopräzipitation mit einem an Protein G-Agarose gekoppelten SF2/ASF spezifischen monoklonalen Antikörper oder einem Kontroll-Antikörper inkubiert. Die Hälfte des Immunopräzipitats wurde im Immunoblot analysiert (Abb. 3.28 A). Die andere Hälfte wurde benutzt, um durch reverse Transkription poly(A)-haltiger RNA und anschließender PCR mit spezifischen NA, NP und M1 Primern die präzipitierten mRNA Moleküle nachzuweisen (Abb 3.28 B). In infizierten Zellen kopräzipitierten M1, NA und NP mRNA mit SF2/ASF. Diese Ergebnisse zeigten, dass SF2/ASF an virale mRNA *in vivo* binden konnte. Für eine Funktion im viralen mRNA Export ist diese Erkenntnis von großer Bedeutung. Somit könnte die virale mRNA in den zellulären mRNA Exportweg eingeschleust werden. Es wurde bereits gezeigt, dass SF2/ASF als Adapterprotein agiert und zelluläre mRNAs bindet um sie an den Exportrezeptor TAP/NXF1 zu übergeben (Yingqun Huang u. a. 2003; M.-C. Lai und Tarn 2004). Die Präzipitation viraler mRNA von SF2/ASF unterstreicht eine mögliche Beteiligung von SF2/ASF am viralen mRNA Export.

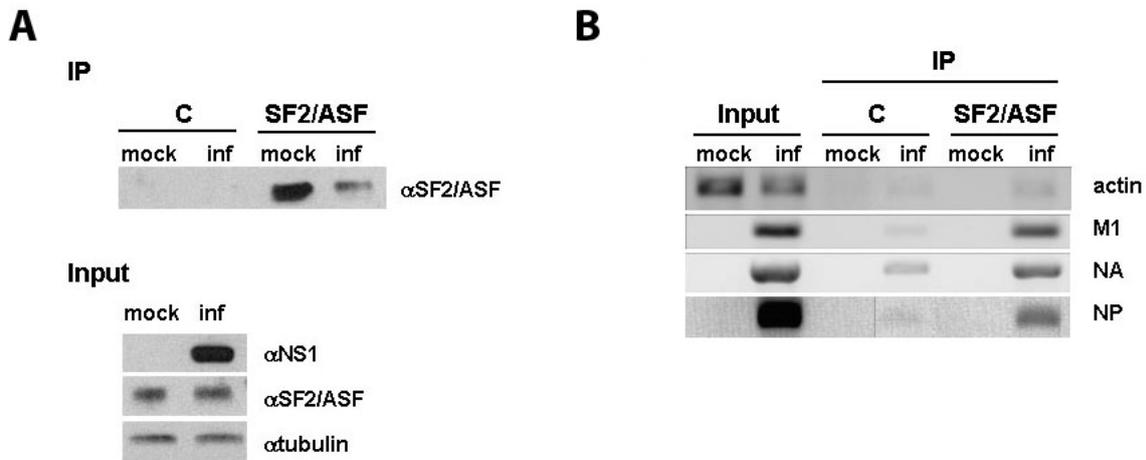


Abb. 3.28: Das zelluläre SF2/ASF Protein interagiert während einer Infektion mit viraler mRNA. A549-Zellen wurden nicht oder mit Influenza A/PR/8 mit einer MOI von 3 infiziert. Sechs Stunden nach der Infektion wurden die Zellen lysiert. 5% der Lysate wurden als Inputkontrolle im Immunoblot analysiert. Für die RNA-Isolierung wurden je 15% der Lysate als Inputkontrollen eingesetzt. Die Zelllysate wurden geteilt und mit an Protein G-Agarose immobilisiertem SF2/ASF Antikörper oder einem Kontroll-Antikörper in einem Reaktionsansatz inkubiert. Die Präzipitate einer Hälfte der Proben sowie die Input Proben wurden im Immunoblot mit Antikörpern gegen SF2/ASF, NS1 und Tubulin, welches als Ladekontrolle diente, analysiert (A). Aus der anderen Hälfte der Lysate 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 den spezifischen Primern zur Amplifikation von viralen NA, NP und M1 und zellulären Aktin cDNAs eingesetzt. Die PCR Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert (B). mock: nicht-infizierte Zellen; inf: mit Influenza A/PR/8 infizierte Zellen; Input: Einsatz; IP: Immunpräzipitation; C: Kontroll-Antikörper wurde zur Koimmunpräzipitation benutzt; SF2/ASF: SF2/ASF-Antikörper wurde zur Koimmunpräzipitation benutzt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

3.5 SF2/ASF stimuliert die Expression viraler Transkripte

Um einen Effekt auf die Translation viraler Konstrukte zu untersuchen wurde ein Minigenom-Assay durchgeführt (Abb. 3.29). Hierbei wurden Konstrukte zur Herstellung viraler RNA (pPoll) und Expressionskonstrukte (pcDNA) des viralen Polymerasesatzes – bestehend aus PB1, PB2, PA und NP – transfiziert. Die Herstellung viraler RNA von pPoll Konstrukten war nur durch die virale Polymerase möglich. Aus diesem Grund wurden die pcDNA Expressionskonstrukte transfiziert, um die viralen Polymeraseproteine zu exprimieren. Desweiteren wurden NS1, bzw. SF2/ASF oder aber beide Konstrukte zusammen zu einigen Ansätzen titriert. Anhand eines Luziferase-Reporterkonstrukts unter der Kontrolle der viralen Polymerase, wurde die Expression viraler Transkripte gemessen (Abb. 3.30) Das Luziferase-Reporterkonstrukt war ebenfalls in einem pPoll Konstrukt enthalten. Eine Expression erfolgte somit nur unter der Kontrolle der viralen Polymerase.

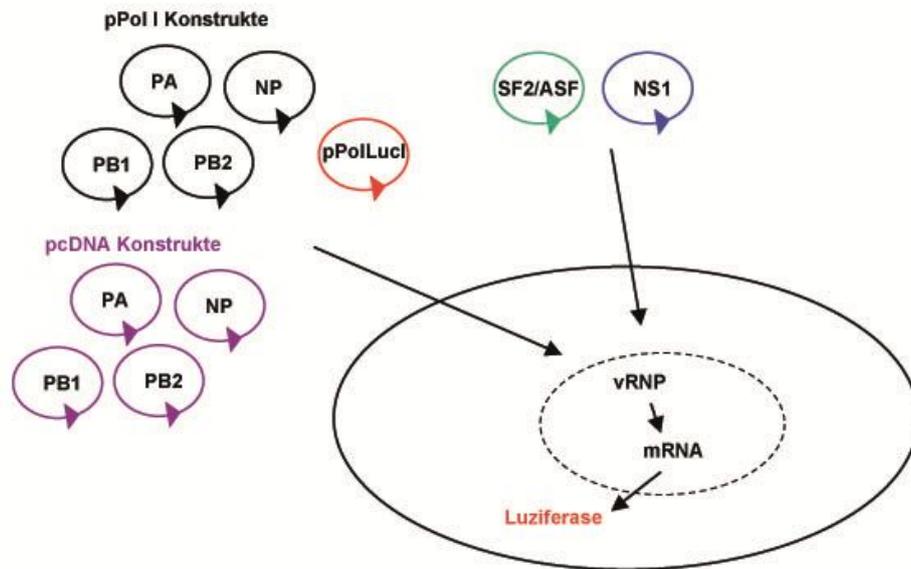


Abb. 3.29: Influenza A Virus Minigenom-Assay. 293T-Zellen wurden mit pPol und pcDNA-Konstrukten der viralen Polymerase PA, PB1, PB2 und dem Nukleoprotein NP transfiziert. Die Expression der Polymerase-Einheiten durch pcDNA Konstrukte ist notwendig zur Bereitstellung des viralen Polymerasekomplexes. Dieser kann von den pPol I Konstrukten virale RNA herstellen, bzw. von dem pPol I Luziferase Reporterkonstrukt das Luziferase-Gen exprimieren. Somit korreliert die Luziferase-Expression mit der transkriptionellen und replikativen Aktivität der viralen Polymerase. Um einen Einfluss der NS1 und /oder SF2/ASF Proteine auf die Expression viraler Konstrukte zu untersuchen wurden zusätzlich deren pcDNA Konstrukte transfiziert.

Die Ergebnisse des Assays zeigten, dass durch Zugabe von NS1 und SF2/ASF die Expression viraler Transkripte deutlich gesteigert werden konnte. Im Vergleich zur Positivkontrolle (+), bei der der virale Polymerasesatz mit dem Reporterkonstrukt transfiziert wurde, konnte bei Koexpression von NS1 und SF2/ASF eine bis zu 6-fache Erhöhung der Luziferaseaktivität gemessen werden. Eine Expression von NS1 oder SF2/ASF alleine hingegen hatte nur eine leicht erhöhte Expression zur Folge. Im Immunoblot wurde die Proteinexpression der koexprimierten NS1 und SF2/ASF Proteine in den einzelnen Ansätzen kontrolliert. Um eine gleichmäßige Probenauftragung zu kontrollieren wurde ebenfalls Tubulin detektiert. Das Zusammenspiel von NS1 und SF2/ASF in diesem Assay zeigte eine verstärkte Expression eines viralen Reporterkonstrukts. Das bestärkte die Hypothese einer möglichen Beteiligung von SF2/ASF an dem Export viraler mRNA. Ob der positive Effekt von NS1 und SF2/ASF auf der Ebene der Transkription, dem Export der mRNA oder der Translation beruhte, ließ sich anhand dieses Assays nicht genauer bestimmen.

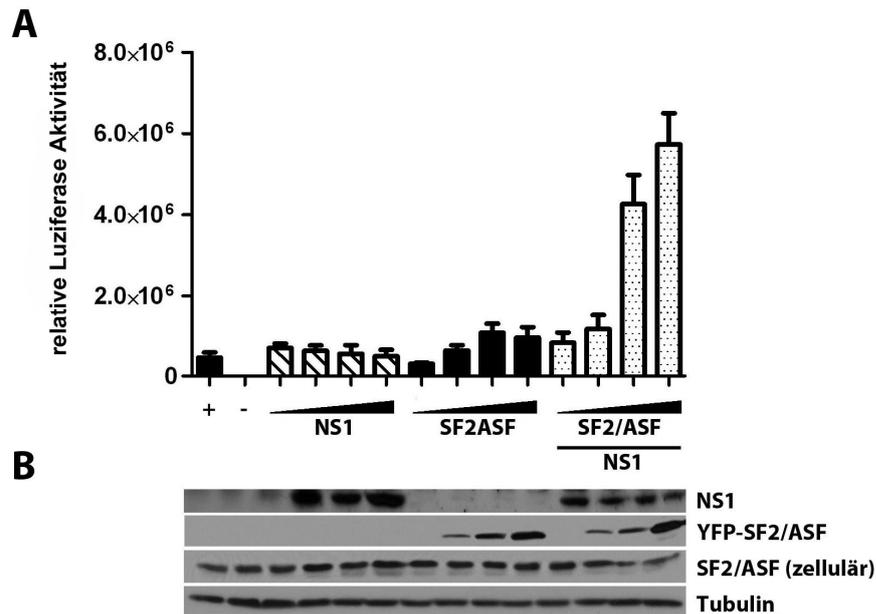


Abb. 3.30: SF2/ASF und NS1 verstärken die Expression viraler Transkripte. A) Humane 293T-Zellen wurden mit pPoll-Konstrukten und pcDNA Konstrukten der viralen Segmente PB1, PB2, PA und NP transfiziert. Auf diese Weise wurde der virale Polymerasekomplex exprimiert und konnte virale mRNA von pPoll Konstrukten transkribieren. Zusätzlich wurde entweder NS1 oder SF2/ASF in unterschiedlichen Konzentrationen koexprimiert (Transfektion von 50, 100, 250 oder 500 ng; wurden SF2/ASF und NS1 zusammen transfiziert, so wurden in allen Ansätzen 100 ng NS1 Expressionsplasmid transfiziert). Zur Analyse der Aktivität viraler Konstrukte wurde zu allen Ansätzen ein pPol-Konstrukt zugegeben, welches das virale HA-Fragment trägt, HA jedoch durch ein Luziferase-Gen ersetzt wurde. Als interne Kontrolle wurde zudem in allen Ansätzen zur späteren Normalisierung pRL-TK-Luc kotransfiziert, das für die *Renilla* Luziferase unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors kodiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Luziferase-Aktivität im Zellextrakt bestimmt. Fehlerbalken geben die SEM an. B) Nachweis der Expression der transfizierten NS1 und SF2/ASF Konstrukte mittels Immunoblot. +: Polymerasesatz (PB1, PB2, PA, NP) transfiziert, „Positivkontrolle“; -: unvollständiger Polymerasesatz (PB2, PA, NP), „negativ Kontrolle“.

3.6 Verteilung viraler mRNA

Bisher wurde durch unterschiedliche Methoden nachgewiesen, dass das NS1 Protein mit den zellulären mRNA Exportfaktoren SF2/ASF und Aly interagiert. Ebenso wurde gezeigt, dass die Proteine an viraler mRNA binden. Nach dem Ergebnis des Minigenom Assays, in dem SF2/ASF und NS1 die Expression viraler Transkripte förderte, wurde im Folgenden untersucht, ob auf mRNA Ebene eine Auswirkung auf eine veränderte Expression oder Lokalisation zu beobachten war. Dies würde Rückschlüsse auf die Funktion von NS1 und SF2/ASF in diesem Zusammenhang zu ermöglichen.

3.6.1 HA, NA und M1 mRNA werden durch SF2/ASF und NS1 vermehrt exportiert

Um einen Effekt auf die Expression und die Lokalisation der mRNA nachzuweisen wurde ein Fraktionierungsassay durchgeführt. Dazu wurden Zellen wie zuvor im Minigenom Assay beschrieben (Abschnitt 3.5; Abb. 3.29) transfiziert, nur statt eines Luziferase Reporterplasmid wurden pPol-Reporterkonstrukte verwendet, die die Segmente HA, NA oder M1 kodierten. Die Proben wurden anschließend in eine zytoplasmatische und eine nukleoplasmatische Fraktion geteilt. Die Fraktionen wurden halbiert, ein Teil wurde zur Analyse im Immunoblot benutzt (Abb. 3.30 A), aus der anderen Hälfte wurde RNA präzipitiert. Durch eine Two-Step RT PCR wurden virale NA, M1 und HA mRNAs in den Präzipitaten nachgewiesen (Abb. 3.30 B).

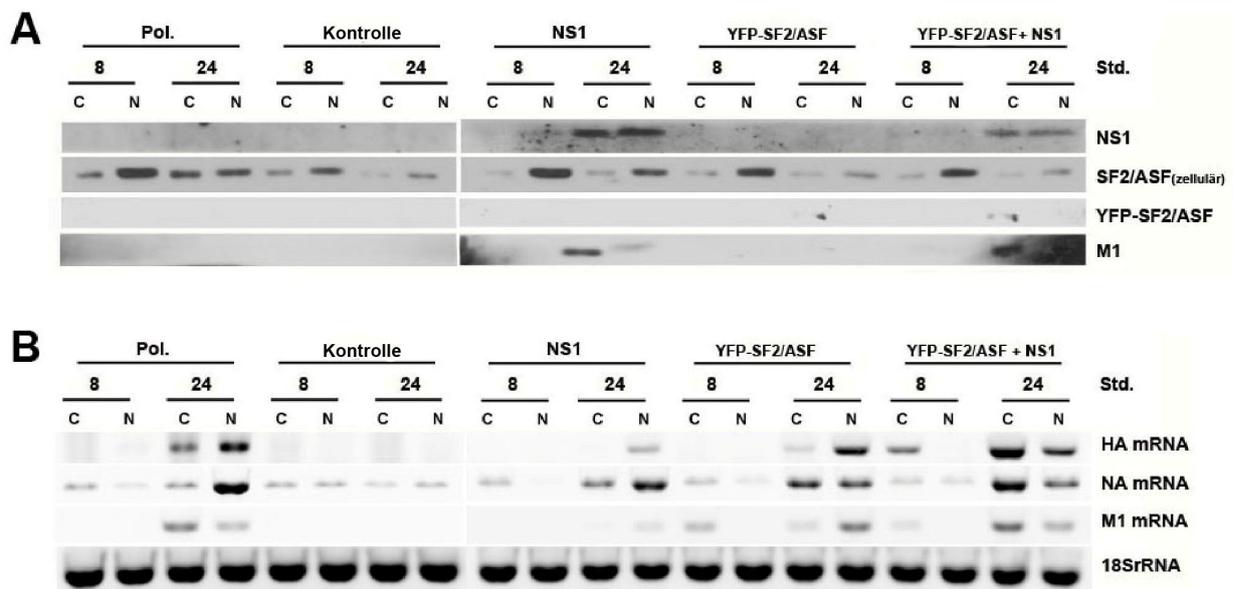


Abb. 3.31: Der Export von HA und NA mRNA kann durch Ko-Expression von SF2/ASF und NS1 gesteigert werden. Humane 293T-Zellen wurden mit pPol Konstrukten der viralen Fragmente PB1, PB2, PA und NP, sowie deren pcDNA Expressionskonstrukte transfiziert. Die Expression der viralen Polymerase-Einheiten von pcDNA Konstrukten war notwendig, da nur die virale Polymerase RNA von den pPol Konstrukten transkribieren konnte. In einigen Ansätzen – wie angegeben - wurden zusätzlich pcDNA-NS1 oder pYFP-SF2/ASF oder beide zusammen transfiziert. Zur Bestimmung der Expression viraler mRNA wurde pPol/SapI-A/PR/8-HA, pPol/SapI-A/PR/8-NA oder pPol/SapI-A/PR/8-M transfiziert. Zur Analyse wurden die Zellen jeweils nach 8 und 24 Stunden in eine cytoplasmatische und eine nukleare Fraktion getrennt. Die Hälfte der Fraktionen wurde zum Nachweis der Expression von NS1, SF2/ASF und M1 Proteinen mittels Immunoblot benutzt (A). Aus der restlichen Fraktion wurde RNA isoliert. 5ng Gesamt-RNA wurde mit entsprechendem OligodT Primer revers transkribiert. Die cDNAs wurden in PCRs mit den spezifischen Primern zur Amplifikation von viralen HA, NA und M1 cDNAs eingesetzt. Zur Konzentrationskontrolle wurde die 18SrRNA in einer RT-PCR amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert (B). N: nukleare Fraktion; C: cytoplasmatische Fraktion; Pol.: vollständiger Polymerase-Satz (PB1, PB2, PA, NP).

Im Immunoblot konnten die transfizierten NS1 und YFP-SF2/ASF Proteine, letztere nur in Spuren, sowie zelluläres SF2/ASF nachgewiesen werden. Die Antikörper, die zum Nachweis von HA und NA Proteinen zur Verfügung standen detektierten keine Signale, daher konnte nur die Expression des viralen M1 Proteins nachgewiesen werden.

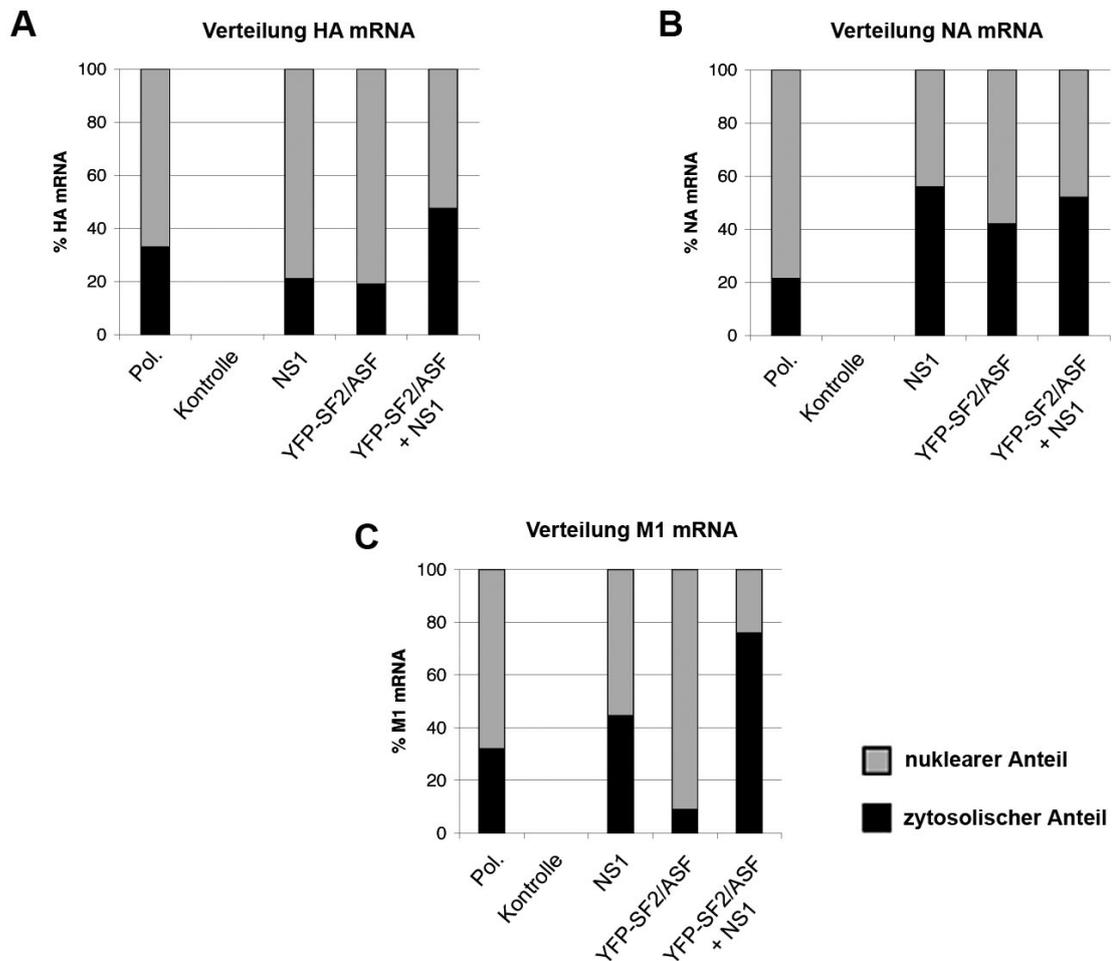


Abb.3.32: Verstärkter Export von HA und NA mRNA durch SF2/ASF und NS1. Die Auswertung der Agarosegele erfolgte mit der ImageJ Software. Die dargestellten Diagramme zeigen die Verhältnisse von nuklearem und zytosolischem Anteil der HA mRNA (A), NA mRNA (B) oder M1 mRNA (C) nach 24 Stunden. Aufgetragen sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten. Pol.: vollständiger Polymerasesatz (PB1, PB2, PA, NP).

In Ansätzen, die mit NS1 alleine oder mit NS1 und SF2/ASF transfiziert wurden, konnte nach 24 Stunden eine Expression des M1 Protein nachgewiesen werden (Abb. 3.31 A). Hierbei konnte in Ansätzen nach 24 Stunden, die NS1 und SF2/ASF enthielten mehr M1 Protein im Zytoplasma detektiert werden. Bei Betrachtung der dazugehörigen mRNA Daten konnte diese Beobachtung bestätigt werden (Abb. 3.31 B). HA und NA mRNA zeigten deutlich stärkere Banden in der zytoplasmatischen Fraktion der Ansätze mit NS1 und SF2/ASF nach 24 Stunden (Abb. 3.31 B).

Eine Zusammenfassung der durchgeführten Experimente und quantitative Analyse durch Densitometrie ist in Abbildung 3.32 dargestellt. Hierzu wurden die Intensitäten der Banden der Agarosegele anhand der ImageJ Software bestimmt und graphisch dargestellt. Die Quantifizierung der mRNA Daten bestätigte bei Betrachtung der zytoplasmatischen Werte den verstärkten Export der viralen mRNAs in Anwesenheit von NS1 und SF2/ASF verglichen mit den übrigen Ansätzen (Abb. 3.32). NA mRNA wurde in Anwesenheit von NS1 oder in Anwesenheit von NS1 und SF2/ASF vergleichbar gut exportiert. Virale HA mRNA wurde in Gegenwart von NS1 und SF2/ASF deutlich besser zum Kontrollansatz exportiert, knapp 50% der HA mRNA wurde nach 24 Stunden im Zytoplasma detektiert, verglichen mit 30% im Ansatz ohne Expression der beiden Proteine. Noch deutlicher war der Effekt auf M1 mRNA, hier wurden 75% der mRNAs nach 24 Stunden im Zytoplasma detektiert, in Anwesenheit von NS1 und SF2/ASF. In der Kontrolle, die nur die viralen Polymeraseproteine exprimierte, wurden zum gleichen Zeitpunkt nur 30% nachgewiesen. Der Export der viralen M1 mRNA konnte demnach mehr als verdoppelt werden. Bei Betrachtung des NA mRNA Exports konnte kein Unterschied im nuklearen Export zwischen Ansätzen mit NS1 alleine oder NS1 und SF2/ASF festgestellt werden. In beiden Fällen wurden etwa 55% der mRNAs im Zytoplasma detektiert, in Ansätzen ohne NS1 und SF2/ASF hingegen nur 20%. Bereits NS1 alleine sorgte somit für eine Verdreifachung des NA mRNA Exports, die Expression von SF2/ASF hatte keine zusätzliche Wirkung in diesen Ansätzen. Insgesamt bestärken diese Ergebnisse die Hypothese, dass NS1 in Verbindung mit SF2/ASF zu einem verstärkten Export viraler mRNA führte. Die Expression von Aly oder anderen Exportfaktoren wurde in diesen Ansätzen nicht untersucht.

3.7 Analyse der Replikationseffizienz von Influenza A/WSN Virus nach siRNA Behandlung

Nach der Identifizierung der Interaktion zwischen dem NS1 Protein und den zellulären mRNA-Exportfaktoren SF2/ASF und Aly wurde im Folgenden untersucht, wie sich diese Interaktionen auf die Replikationseffizienz von Influenza A Viren auswirkten. Hierfür wurden 293T Zellen mit siRNAs gegen die mRNA der zellulären SF2/ASF und Aly Proteine behandelt, um deren Expression zu vermindern. Die Zellen wurden anschließend für eine Replikationsanalyse von Influenza A/WSN/33 genutzt.

3.7.1 Knock-down durch SF2/ASF- und Aly-spezifische siRNAs hat keine zytotoxischen Effekte

Vor der Replikationsanalyse wurde zunächst untersucht, ob sich eine Behandlung mit siRNAs zur Verringerung der Konzentration von SF2/ASF und Aly negativ auf die Zellvitalität auswirkt. Dadurch sollte ein potentieller zytotoxischer Effekt der siRNA Behandlung untersucht werden. Um dies zu überprüfen wurde ein MTT-basiertes Proliferationsassay durchgeführt. 293T-Zellen

wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (25, 50 und 100 pMol) der jeweiligen siRNAs gegen SF2/ASF, Aly, UAP56 einzeln oder in Kombination, sowie mit einer Kontroll-siRNA behandelt. Als weitere Kontrollen wurden unbehandelte Zellen sowie DMSO-behandelte Zellen mitgeführt. DMSO ist ein organisches Lösungsmittel, das zytotoxische Wirkung besitzt. 24 Stunden nach Transfektion der siRNAs wurde das MTT Assay durchgeführt. Die Auftragung der photometrisch gemessenen Werte ist in Abbildung 3.33 dargestellt. Wie erwartet zeigt DMSO starke Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen (Abb 3.32, schwarzer Balken mit unausgefüllten Dreiecken). Alle weiteren siRNA-behandelten oder unbehandelten Zellen zeigten hingegen keine eingeschränkte Proliferation. Die Zellvitalität war demnach durch die reduzierte Expression der jeweiligen Proteine nicht beeinträchtigt. Bei der Durchführung von Wachstumskinetiken konnte im Folgenden davon ausgegangen werden, dass eventuelle Effekte nicht auf Zytotoxizität der siRNA Behandlung zurückzuführen waren, sondern einzig auf die Abwesenheit des jeweiligen Faktors.

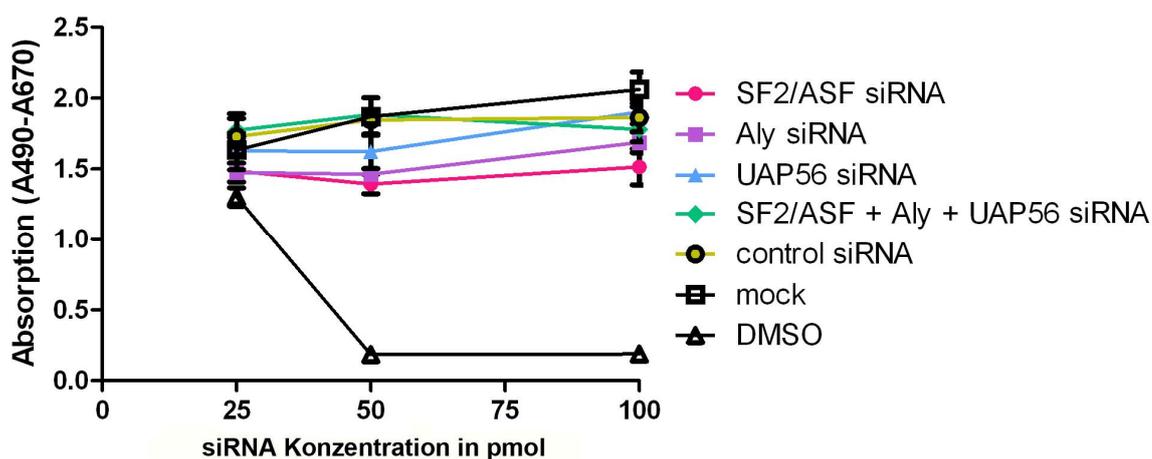


Abb.3.33: Die siRNA Behandlung zeigt keine Zytotoxizität. 293T-Zellen wurden mit 25, 50 oder 100 pMol der spezifischen siRNAs gegen SF2/ASF, Aly oder UAP56 einzeln oder in Kombination, bzw. mit einer Kontroll-siRNA transfiziert. Zur Kontrolle dienten unbehandelte und DMSO behandelte Zellen. 24 Stunden nach der Transfektion wurden 10µl des MTT-Reagenz zu den Zellen pipettiert. Nach sechsstündiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 100µl des MTT-Detergenz. Anschließend wurde die Formazan-Konzentration photometrisch bestimmt.

3.7.2 Exportfaktor Aly hat einen signifikanten Einfluss auf die Replikationseffizienz von Influenza A Viren

Die bisherigen Daten unterstützten eine mögliche Funktion der zellulären Faktoren SF2/ASF und Aly im Export viraler mRNAs. Zur Untersuchung eines Einflusses von SF2/ASF oder Aly auf die virale Replikation wurden 293T-Zellen einen Tag vor der Infektion mit den jeweiligen siRNAs behandelt.

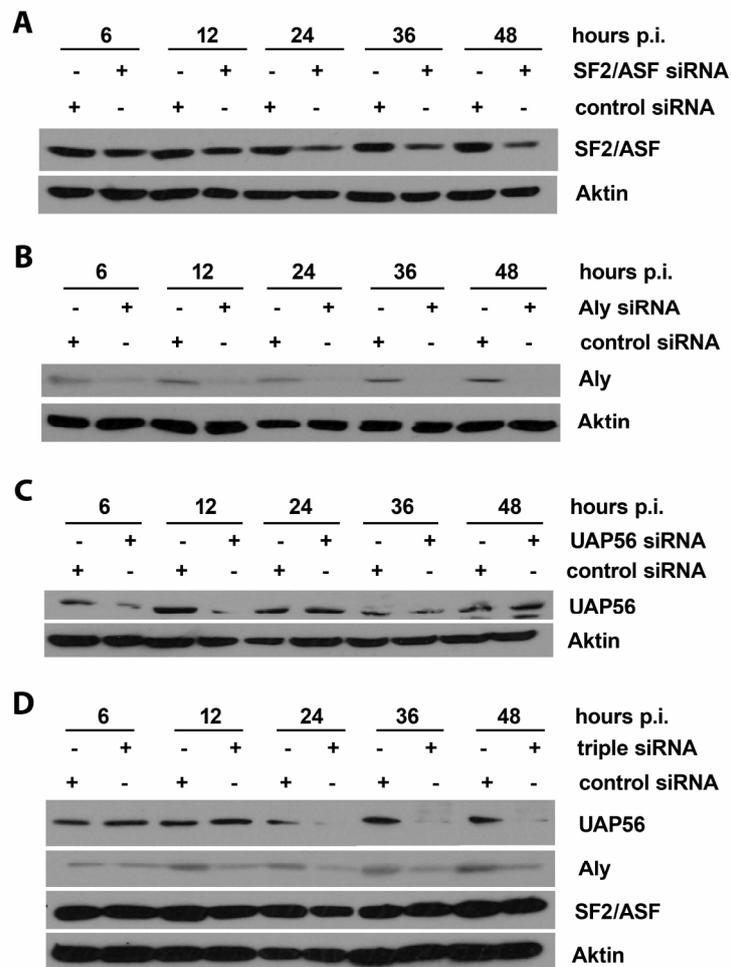


Abb.3.34: Kontrolle der Expression zellulärer Proteine nach siRNA Behandlung in Zellen der Replikationsanalyse. 293T-Zellen wurden mit spezifischen siRNAs (50 pMol) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Influenza A/WSN/33 mit einer MOI von 0,01 infiziert. 6, 12, 24, 36 und 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen lysiert. Das Zelllysate wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Untersucht wurde die Expression der zellulären Proteine, die durch die siRNA Behandlung herunter reguliert werden sollten. Der Nachweis des zellulären Proteins Aktin diente als Ladekontrolle.

Eine Behandlung mit UAP56 spezifischer siRNA diente als Kontrolle, da Read und Kollegen bereits eine reduzierte Replikation von Influenza A Viren nach Verringerung der UAP56 Expression beobachten konnten (Read und Digard 2010). Des Weiteren wurde ein verminderter Export viraler mRNA nach UAP56-siRNA Behandlung gemessen (Wisskirchen, Ludersdorfer, Müller, Moritz, und Pavlovic 2011a). Zusätzlich wurden Zellen mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA behandelt. Es folgte eine Infektion mit Influenza A WSN/33 Virus mit einer MOI von 0,01. Die Wachstumskinetik wurde untersucht indem 6, 12, 24, 36 und 48 Stunden nach Infektion Proben der Überstände entnommen wurden. Die Bestimmung der enthaltenen Viruspartikel erfolgte mit Hilfe eines Avicel-Plaques-Assays. Die Analyse der Replikationskurven ist in Abbildung 3.34 dargestellt. Zur Überprüfung der siRNA knockdowns wurden zusätzlich die Proteine aus Gesamt-Zelllysaten im SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot ausgewertet

(Abb. 3.33). Dies diente der Kontrolle der Effizienz der siRNA-Behandlung. Eine siRNA-Behandlung hing von verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise von der Kopienzahl der mRNA, gegen die die siRNA gerichtet war. Des Weiteren konnte die Stabilität des Proteins den Knock-down beeinträchtigen.

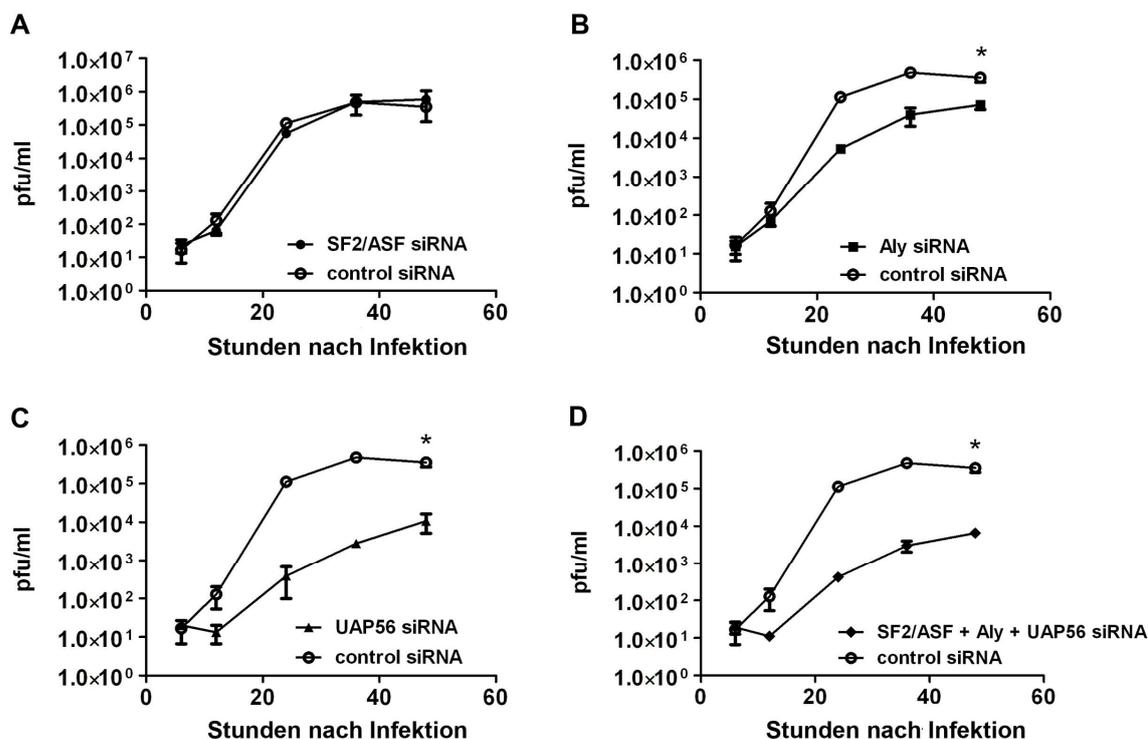


Abb. 3.35: siRNA-vermittelter Knock-down von Aly führt zu signifikant verminderter viraler Replikationseffizienz. 293T-Zellen wurden mit spezifischen siRNAs transfiziert (50 pMol). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit einer MOI von 0,01 mit Influenza A/WSN/33 infiziert. 6, 12, 24, 36 und 48 Stunden wurde Zellkulturüberstand entnommen. Der Titer der darin enthaltenen Viren wurde mittels Avicell-Plaques-Assay auf MDCKII-Zellen bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) an. Die Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U Test berechnet (U-Test; $p < 0,05$).

Die Analyse der Replikationskurven zeigte, dass ein Knock-down von SF2/ASF keinen Einfluss auf die Replikation hatte (Abb. 3.35 A). Auf mit SF2/ASF-siRNA behandelten Zellen replizierte das Virus zu ähnlichen Titern, wie auf mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Die Analyse der Zelllysate zeigte eine deutliche Reduktion des SF2/ASF Proteins durch die siRNA Behandlung, aber keinen vollständigen Knock-down (Abb. 3.34 A). Die dadurch vorhandene geringe Proteinmenge könnte für eine effiziente Replikation ausgereicht haben, so dass in der Replikationsanalyse kein Effekt festgestellt werden konnte. Auf mit Aly-siRNA behandelten Zellen wurde eine etwa um das zehnfache erniedrigte Replikation beobachtet (Abb. 3.35 B). Auf Proteinebene war der Knock-down von Aly sehr effizient, bereits nach sechs Stunden wurde deutlich weniger Protein im Vergleich zu Kontroll siRNA-behandelten Zellen detektiert. Nach 24 Stunden konnte kein Signal mehr für Aly nachgewiesen werden (Abb. 3.34 B). Die virale

Replikation war in Zellen stark inhibiert, die mit UAP56-siRNA oder mit SF2/ASF-, Aly- und UAP56-siRNA gleichzeitig behandelt wurden (Abb. 3.35 C, D). In diesen Ansätzen wurde eine bis um drei Log Stufen verminderte Replikation beobachtet. Die Analyse der Zelllysate zeigte die Knock-down Effizienzen der einzelnen Proteine (Abb 3.34 C, D). Die siRNA Behandlungen von Aly und UAP56 war effizient und führten zu einer verminderten Proteinexpression, der Knock-down von SF2/ASF hingegen war nicht effizient. Es konnte kein Rückgang der Expression detektiert werden. Um nachzuweisen, dass der beobachtete Effekt der verminderten Replikation in mit Aly-siRNA behandelten Zellen spezifisch war und nicht durch einen zytotoxischen Nebeneffekt der siRNA-Behandlung hervorgerufen wurde, wurden dieselben Replikationsanalysen mit Vesicular-Stomatitis-Viren (VSV) durchgeführt (Abb. 3.36).

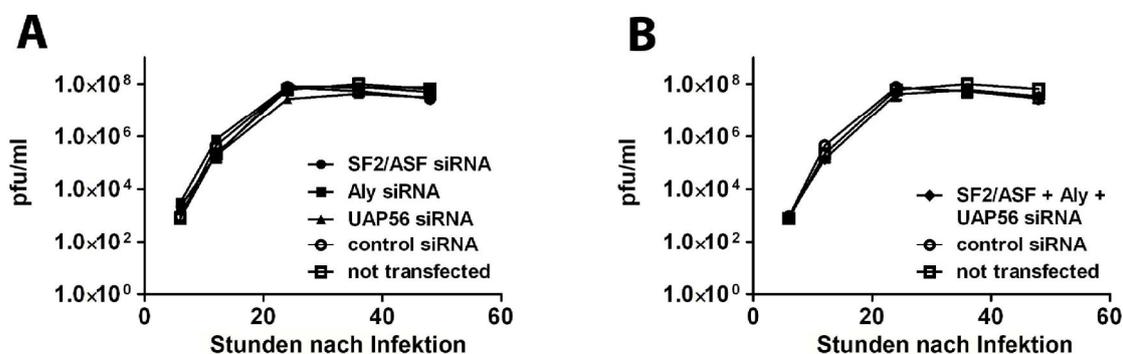


Abb. 3.36: Die Replikation von VSV wird durch siRNA vermittelten Knock-down zellulärer mRNA Faktoren nicht beeinflusst. 293T-Zellen wurden mit spezifischen siRNAs transfiziert (50 pMol). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit einer MOI von 0,01 mit Vesicular-Stomatitis-Virus infiziert. 6, 12, 24, 36 und 48 Stunden wurde Zellkulturüberstand entnommen. Der Titer der darin enthaltenen Viren wurde mittels Avicell-Plaque-Assay auf MDCKII-Zellen bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) an.

Diese Viren replizieren nicht im Zellkern und sind daher nicht auf zelluläre mRNA Exportfaktoren angewiesen. Eine verminderte Proteinexpression der zellulären Kernfaktoren sollte daher die Replikation der Viren nicht beeinträchtigen. Für die Replikationsanalyse wurden 293T-Zellen mit den jeweiligen siRNAs gegen SF2/ASF-, Aly-, UAP56-, bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Infektion mit VSV (MOI 0,01). Für die Wachstumskinetik wurden nach 6, 12, 24, 36 und 48 Stunden Überstände entnommen und durch neues Infektionsmedium ersetzt. Die im Überstand enthaltenen Viren wurden mittels Avicell-Plaque-Test getitert. Die Analyse der Replikationskurven zeigte, dass die siRNA-Behandlungen keinen Einfluss auf die Replikation von VSV hatten (Abb. 3.36). Weder ein einzelner knockdown eines der mRNA Exportfaktoren, noch ein triple Knock-down von SF2/ASF, Aly und UAP56 zeigten Auswirkungen auf das virale Wachstum. Die beobachtete Reduktion des viralen Titers von Influenza A Viren in Aly siRNA behandelten Zellen zeigte, dass die Knock-downs die Fähigkeit der Zellen zur Vermehrung eines zytosolisch replizierenden

Virus nicht herabsetzt und daher vermutlich einen Effekt auf den Kernexport von Influenza A Virus mRNA angenommen werden konnte.

3.8 YN-NS1 und YC-NS1 exprimierende Viren

3.8.1 Konstruktion der rekombinanten Viren

Am Beginn dieser Arbeit stand die Etablierung des BiFC Assays, sowie die Suche potenzieller zellulärer Interaktionspartner des viralen NS1 Proteins. Die rekombinanten Viren sollten verwendet werden, um mit viral exprimiertem NS1 Protein die bisherigen Interaktionen mit den zellulären Exportfaktoren zu bestätigen. In weiterführenden Studien in fixierten Zellen oder Life Cell Imaging Ansätzen könnten die rekombinanten Viren genutzt werden, um BiFC-Komplexe im Verlauf der Infektion zu beobachten und Aufschlüsse über Mobilität und Lokalisation der Komplexe zu erhalten. Eine Anwendung in Tiermodellen könnte zudem die Lokalisation von NS1-Komplexen in unterschiedlichen Organen und Zelltypen unkompliziert ermöglichen. Somit wurden in Kooperation mit dem Labor von Adolfo Garcia-Sastre an der Mount Sinai School of Medicine in New York rekombinante Viren hergestellt. Die Besonderheit dieser Viren liegt in der Fusion eines YN-/ bzw. ein YC-Fragment an die kodierende Sequenz des NS1. Abbildung 3.36 zeigt eine schematische Darstellung des Segments 8 der rekombinanten Influenza A Viren im Vergleich zu einem Wildtyp Virus. Die Fusion der YN-/ bzw. YC-Fragmente hatte folgende Konsequenzen: Das NS1 Protein wird im Normalfall von der ungespleißten mRNA des achten Segments translatiert. Durch Spleißen der mRNA entstand eine weitere mRNA Form, von der das NEP/NS2 Protein translatiert wurde. Die 10 aminoterminalen Aminosäurereste des NEP/NS2 Proteins waren mit denen des NS1 Proteins identisch, durch das Spleißen ändert sich aber das Leseraster und damit die Proteinsequenz. Für die Herstellung rekombinanter YN- und YC-Fusionsproteine wurde das Segment so verändert, dass eine bicistronische mRNA transkribiert wurde. Kotranslationell wurde dann das YN-NS1, bzw. YC-NS1 Protein von dem NEP/NS2 Protein durch eine eingefügte PTV-1 2A Sequenz abgespalten. Bei der PTV-1 2A Sequenz handelt es sich um die 2A Protease des porcinen Teschovirus. Diese Autoprotease entfaltet ihre Aktivität kotranslationell und schnitt die Aminosäurekette auseinander. Mit Hilfe dieser Viren konnte zumindest eines der Konstrukte für das BiFC Assay – das YN-NS1, bzw. das YC-NS1 – im Kontext einer normalen viralen Expression untersucht werden. Zur Charakterisierung der Viren wurde zuerst die Expression der NS1-Fusionsproteine im Immunoblot überprüft (Abschnitt 3.6.2).

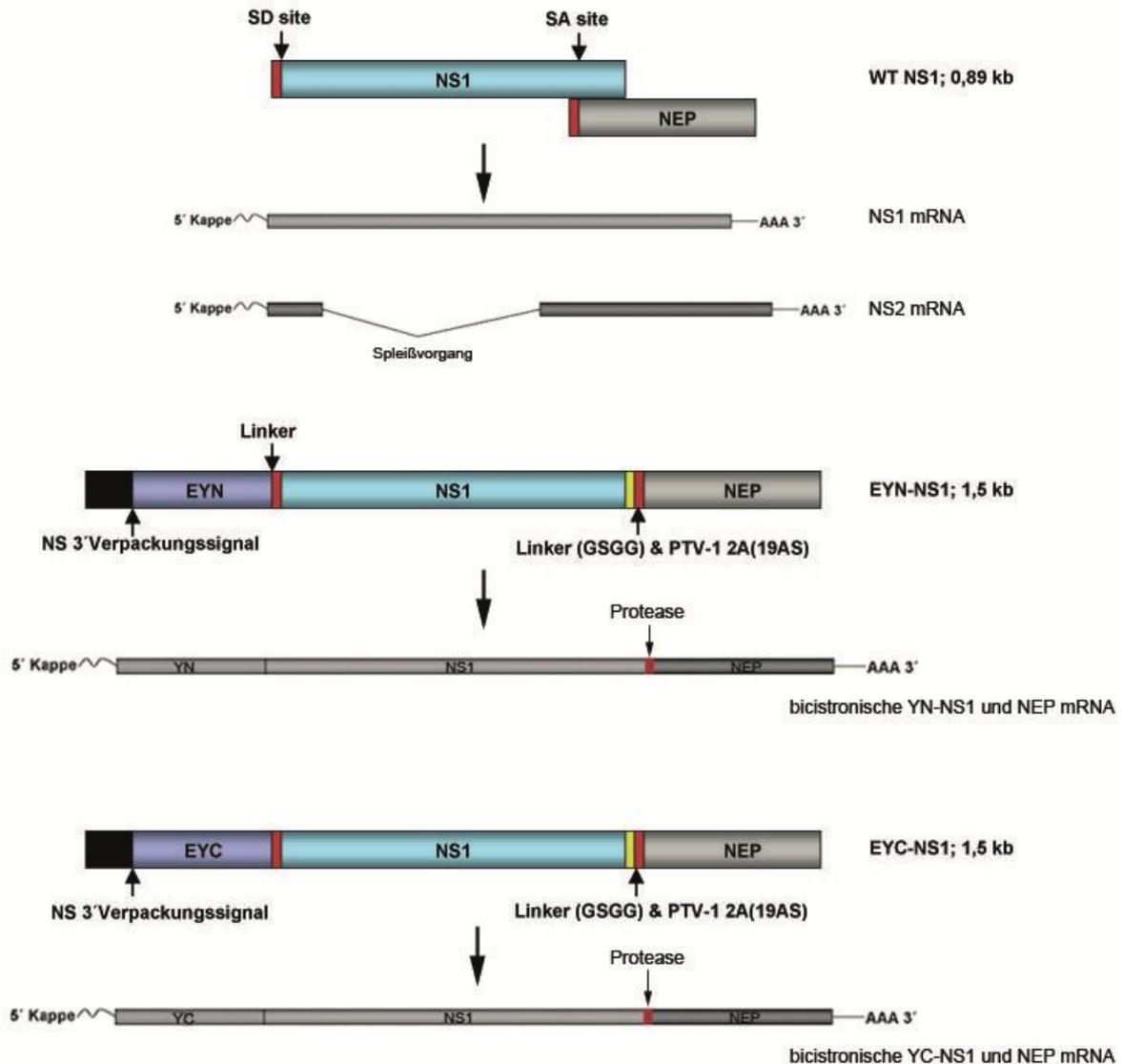


Abb. 3.37: Schematische Darstellung der Konstrukte zur Herstellung rekombinanter A/PR/8/YN NS1 und A/PR/8/YC NS1 Viren. Dargestellt ist das WT NS1 Konstrukt (oben) sowie die YN-NS1 (mittig) und YC-NS1 (unten) Fusionskonstrukte zur Herstellung rekombinanter Viren. Normalerweise überlappen die Leserahmen für die NS1 und NEP/NS2 Proteine (siehe WT Sequenz, oben) und die unterschiedlichen mRNAs entstehen durch einen Spleißvorgang. Die rekombinanten Konstrukte zur Herstellung der YN-NS1 und YC-NS1 Fusionsproteine hingegen sind bicistronische Konstrukte, die open reading frames liegen hintereinander und es wird eine einzige mRNA gebildet. Erst co-transkriptionell werden die neu gebildeten Proteine YN-NS1, bzw. YC-NS1 und NEP/NS2 durch eine eingebaute Spaltsequenz voneinander getrennt. SD: Spleiß-Donor Site; SA: Spleiß-Akzeptor Site; PTV-1 2A: 2A Protease des porcinen Teschovirus (Familie: *Picornaviridae*).

3.8.2 Charakterisierung der Expression von YN-NS1 und YC-NS1 Fusionsproteinen

Durch die Fusion des YN-/ oder YC-Fragments an das NS1 Protein veränderte sich dessen molekulare Massen von 26kDa auf 37kDa (YC-NS1), bzw. 45kDa (YN-NS1). Mittels Immunoblot Analyse konnte ein veränderte Laufverhalten nachgewiesen werden (Abb. 3.37). Zur Detektion der Fusionsproteine wurde ein spezifisches anti-NS1 Antiserum benutzt. Der Titer der

rekombinanten Viren PR/8/YN-NS1 und PR/8/YC-NS1 wurde mittels Avicel-Plaquesassay bestimmt. In Abbildung 3.38 sind Plaques beider Viren in MDCK-Zellen gezeigt. Hierbei war die Morphologie der Plaques mit dem WT vergleichbar.

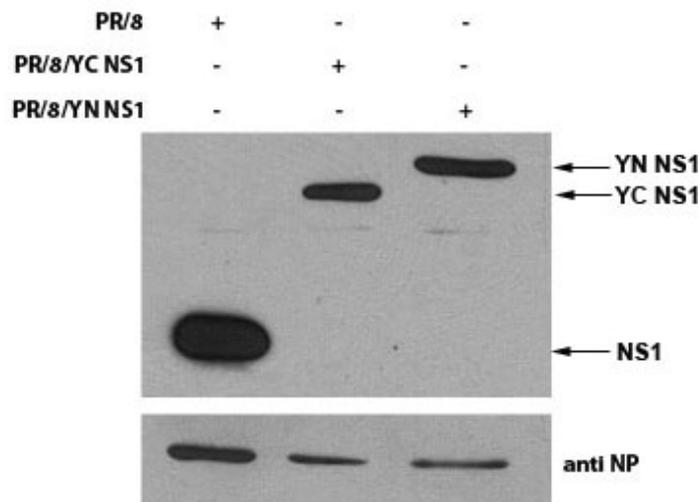


Abb. 3.38: Expression von YN-NS1 und YC-NS1 Fusionsproteinen der rekombinanten Viren. MDCK-Zellen wurden mit Influenza PR/8 WT, PR/8/YC NS1 oder PR/8/YN NS1 Viren mit einer MOI von 1 infiziert. Nach acht Stunden Inkubation bei 37°C wurden Zelllysate hergestellt und im Immunoblot analysiert. NS1 Proteine wurden mit einem spezifischen antiNS1-Antiserum detektiert. Das unterschiedliche Laufverhalten der Proteine beruht auf den unterschiedlichen molekularen Massen aufgrund der Fusion mit dem YC- oder YN-Fragmenten. Während das WT NS1 Protein ein Molekulargewicht von 26 kDa besitzt, liegt das von YC NS1 bei 37 kDa und von YN NS1 bei 45 kDa.

Das NS1 Protein gilt als wichtiger Modulator der zellulären Immunantwort. Influenza Viren, die kein NS1 Protein exprimieren (delNS1) induzieren große Mengen Interferon (INF) in infizierten Zellen (A García-Sastre u. a. 1998). Um sicherzustellen, dass die YN-NS1 und YC-NS1 Fusionsproteine weiterhin funktionell in ihrer antagonistischen Funktion der INF- β Induktion waren, wurde eine funktionelle Analyse des NS1 Proteins im Labor von Adolfo Garcia-Sastre an der Mount Sinai School of Medicine, New York, durchgeführt. Dies war notwendig um auszuschließen, dass bei späteren BiFC Assays beobachtete Ergebnisse aufgrund immunmodulatorischer Funktionen in der Zelle zustande kamen. Dazu wurden MDCK-Zellen mit PR/8 oder WSN/33 WT Viren, bzw. PR/8/YN NS1 oder PR/8/YC NS1 Viren infiziert. Als weitere Kontrolle fungierten WSN/33/delNS1. Die Infektionen wurden mit einer MOI von 1 durchgeführt. Der WSN/33/delNS1 Kontroll-Ansatz führte zu einer starken INF- β Induktion. Die Expression von YN-NS1 und YC-NS1 hingegen inhibierte ebenso wie eine WT NS1 Expression die INF- β Induktion (persönliche Kommunikation, B. Manicassamy; Mount Sinai School of Medicine, New York). Die Fusion der YN-/ oder YC-Fragmente hatte auf die antagonistische Funktion der Proteine somit keine Auswirkungen.

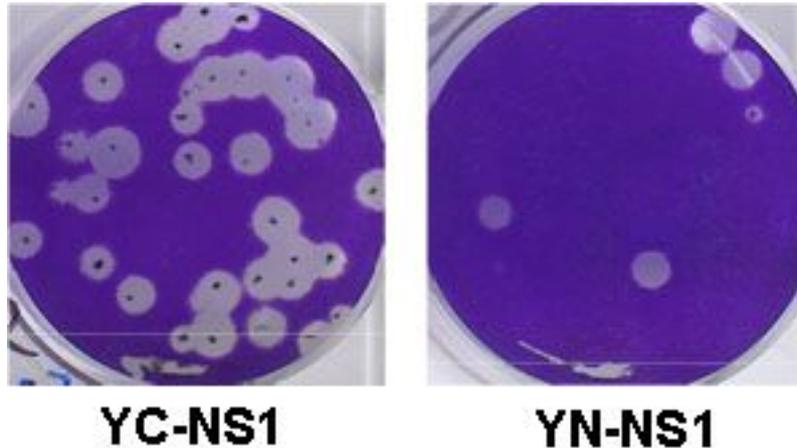


Abb. 3.39: Plaque-Morphologie der PR/8/YN NS1 und PR/8/YC NS1 Viren. MDCK-Zellen wurden mit PR/8/YN NS1 oder PR/8/YC NS1 infiziert und mittels Avidell-Plaque-Assay analysiert.

3.8.3 Analyse der rekombinanten YN-NS1 und YC-NS1 Viren im BiFC Assay

Nach alleiniger Infektion und Expression je eines der rekombinanten Viren wurde, wie erwartet, keine Autofluoreszenz festgestellt. Daraufhin wurden HeLa-Zellen parallel mit beiden rekombinanten Viren PR/8/YN NS1 und PR/8/YC NS1 infiziert.

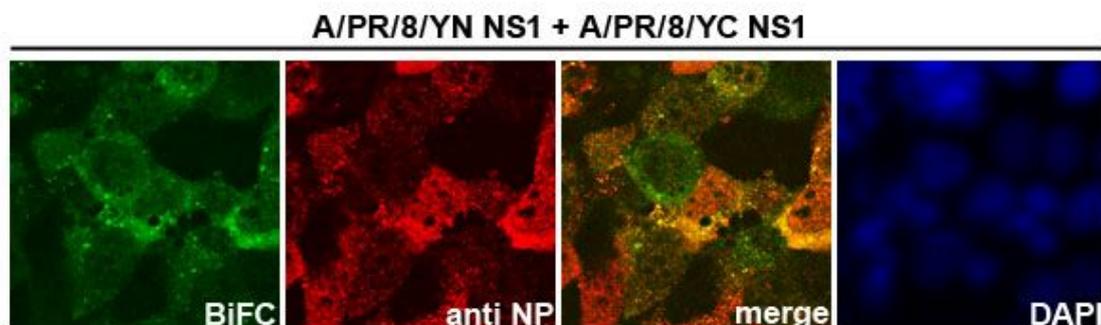


Abb. 3.40: Fluoreszenzkomplementation von viral exprimierten YN NS1 und YC NS1 Proteinen. MDCK-Zellen wurden parallel mit PR/8/YN NS1 und PR/8/YC NS1 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach Inkubation bei 37°C (5 Stunden) und 30°C (3 Stunden) wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Zur Kontrolle der Infektion wurde das NP Protein mit einem primären antiNP Antikörper und einem sekundärem Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Die Analyse der Zellen nach Inkubation bei 37°C und 30°C zeigte, dass die Dimerisierung der viral exprimierten NS1 Proteine ebenfalls im BiFC Assay nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.40). Es wurde eine leichte Fluoreszenz im Zellkern und eine etwas stärkere Fluoreszenz im Zytoplasma der Zellen detektiert. Das korrespondiert mit der Verteilung des NS1 Proteins in infizierten Zellen. Zu Beginn der Infektion ist das NS1 Protein im Zellkern zu detektieren, und zu

späteren Zeitpunkten vermehrt im Zytoplasma (Greenspan, Palese, und Krystal 1988; Newby, Sabin, und Pekosz 2007; Garaigorta, Falcón, und Ortín 2005; Melén u. a. 2007).

3.8.4 SF2/ASF und Aly interagieren mit viralen NS1-YFP Fusionsproteinen

Im Folgenden wurde untersucht, ob die viral exprimierte NS1-Fusionsproteine im BiFC Assay mit den Exportfaktoren SF2/ASF und Aly interagieren konnten. Somit könnte die Interaktion im Verlauf der Infektion beobachtet werden. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit Konstrukten zur Expression von Aly- oder SF/ASF-Fusionsproteinen transfiziert (Abb. 3.41, 3.42, 3.43). Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C erfolgte die Infektion mit dem korrespondierenden rekombinanten YN-NS1 bzw. YC-NS1 Virus. Wie zuvor beschrieben erfolgte erneut eine fünfständige Inkubation bei 37°C und eine dreistündige Inkubation bei 30°C zur Reifung der BiFC Komplexe.

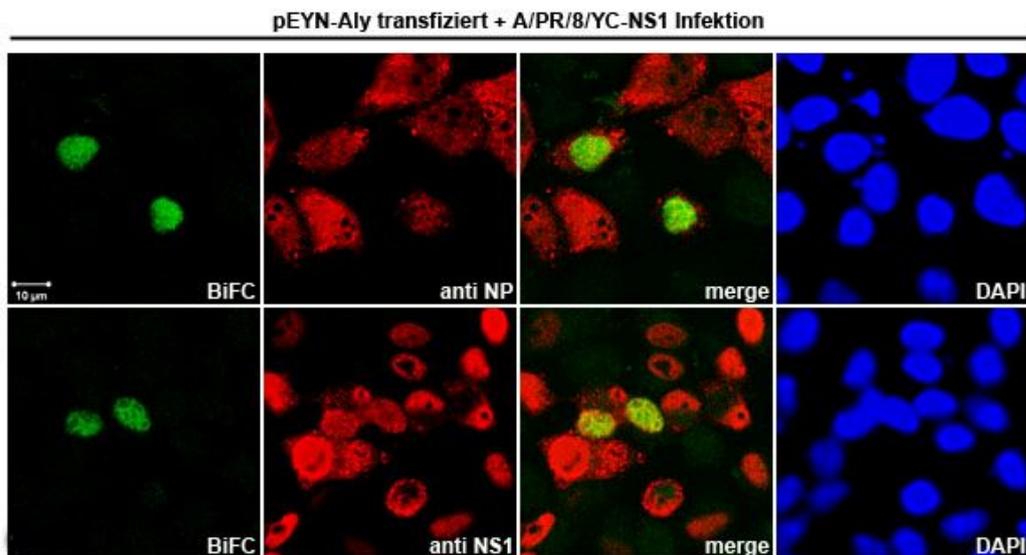


Abb.3.41: Viral exprimiertes YC-NS1 Protein interagiert mit Exportfaktor Aly im BiFC Assay. HeLa-Zellen wurden mit pEYN-Aly transient transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Infektion mit PR/8/YC NS1, MOI5. Nach Inkubation bei 37°C und 30°C wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. In der Immunfluoreszenz Analyse wurden NP (oberes Panel) oder NS1 (unteres Panel) jeweils mit primären Protein-spezifischen Antikörpern und sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen, bzw. IgG Kaninchen-spezifischen Antikörpern detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Auch in den Assays mit rekombinanten Viren konnte die Interaktion von NS1 und Aly im BiFC Assay bestätigt werden (Abb. 3.41). Ebenfalls die Aly Δ RGG1 und Aly Δ RGG2 Mutanten wurden in diesen Ansätzen getestet. Abbildung 3.42 zeigt die Ergebnisse. Wie in den zuvor durchgeführten BiFC Assays (Abb. 3.23, Abb. 3.25, Abb. 3.26), führte in diesen mit rekombinanten Influenza A Viren durchgeführten BiFC Analysen nur die Aly Δ RGG1 Mutante mit dem viral exprimierten YC-NS1 Protein zu einer Fluoreszenzkomplementation.

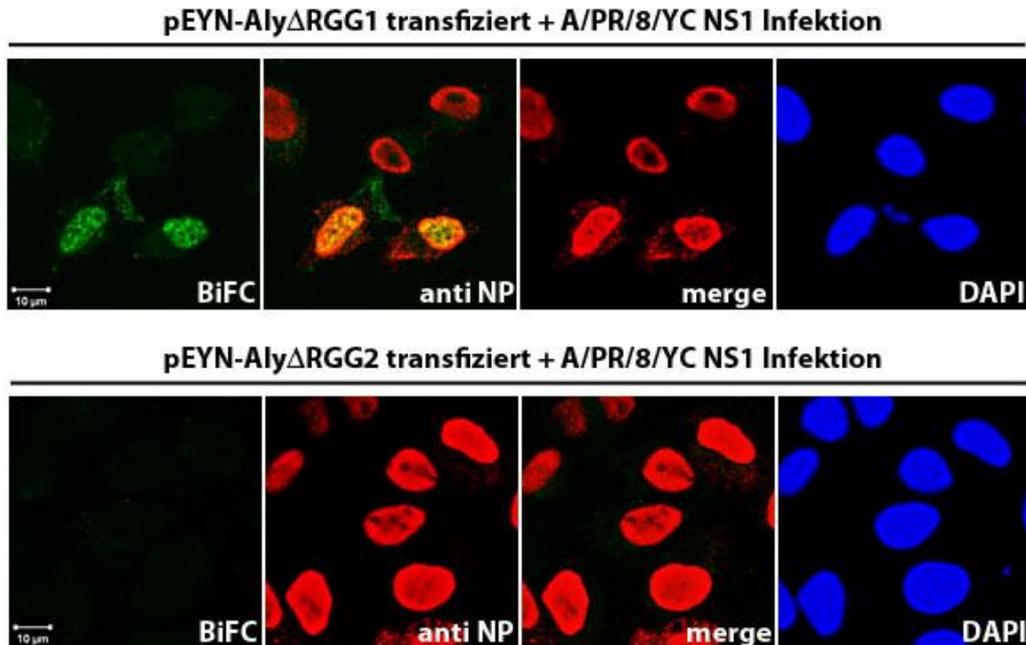


Abb.3.42: Der C-Terminus von Aly ist notwendig für die Interaktion mit NS1. HeLa-Zellen wurden mit pEYN-Aly Δ RGG1 oder pEYN-Aly Δ RGG2 transfiziert und am folgenden Tag mit PR/8/YC NS1 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach fünfstündiger Inkubation bei 37 °C und dreistündiger Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Das NP Protein wurde mit einem spezifischen, primären antiNP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper nachgewiesen, um die Infektion zu bestätigen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

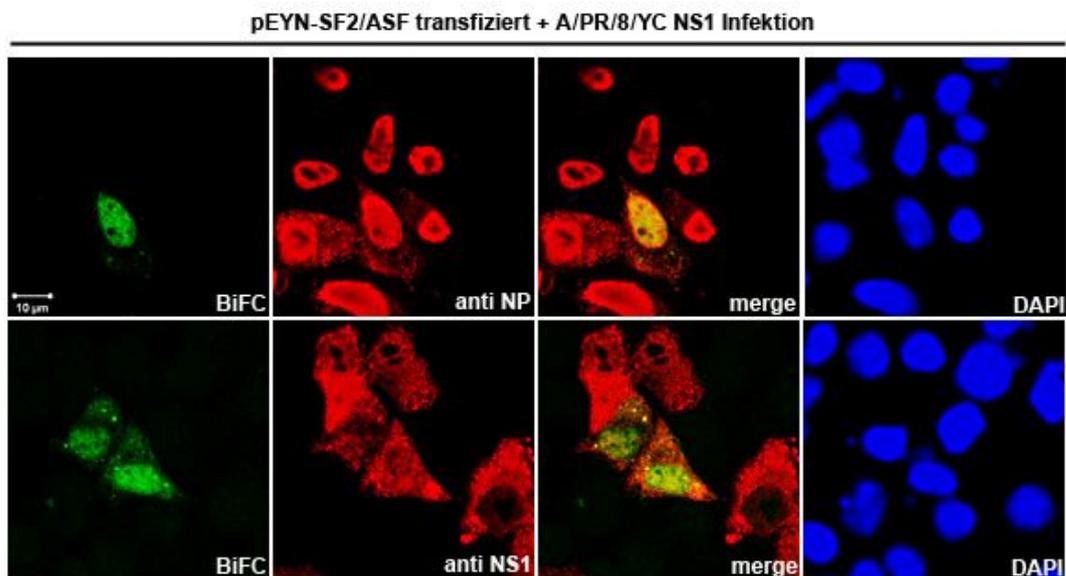


Abb. 3.43: SF2/ASF interagiert mit rekombinant exprimiertem NS1. HeLa-Zellen wurden mit pEYN-SF2/ASF transfiziert und am folgenden Tag mit PR/8/YC NS1 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach fünfstündiger Inkubation bei 37°C und dreistündiger Inkubation bei 30°C wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Das NP Protein wurde mit einem spezifischen, primären antiNP Antikörper und einem sekundären Alexa-594 gekoppelten IgG Maus-spezifischen Antikörper nachgewiesen, um die Infektion zu bestätigen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Auch die Interaktion von NS1 und dem Spleiß- und Exportfaktor SF2/ASF wurde mit rekombinanten Viren überprüft. Wie in Abbildung 3.43 dargestellt konnte auch in diesem Fall die Interaktion bestätigt werden, die im Nukleoplasma auftrat. Die BiFC Assay mit rekombinanten Influenza Viren konnten die vorher durchgeführten BiFC Assays bestätigen. Somit wurde gezeigt, dass die zellulären Exportproteine im Rahmen einer Infektion mit dem viralen NS1 Protein interagieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit erworbenen Kenntnisse geben Hinweise auf eine Funktion des NS1 Proteins der Influenza A Viren im nuklearen Export viraler mRNA unter der Beteiligung von zellulären Adapterproteinen. Es wurde gezeigt, dass NS1 mit den zellulären Exportfaktoren SF2/ASF und Aly interagieren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass NS1 und SF2/ASF direkt an virale mRNA binden oder mit dieser in einem Komplex vorliegen. Ferner konnte ein verstärkter Export viraler mRNA in einem Minigenom Assay detektiert werden, wenn NS1 und SF2/ASF koexprimiert wurde. Replikationsanalysen zeigten eine verringerte Virusreplikation, wenn das zelluläre Protein Aly durch siRNA Behandlung vermindert exprimiert wurde.



4 Diskussion

4.1 Übersicht der Ziele der Arbeit

Das pleiotrope NS1 Protein der Influenza A Viren ist vor allem für seine Interferon-antagonistische Wirkung bekannt und untersucht worden. Des Weiteren ist es für eine effiziente virale Replikation notwendig (A García-Sastre u. a. 1998; Hale, Randall, u. a. 2008). Zu den weiteren Funktionen des NS1 Proteins gehört unter anderem die Inhibition des Spleißens und des nukleo-zytoplasmatischen Exports zellulärer mRNAs (Fortes, Beloso, und Ortín 1994; Qiu und Krug 1994). Diese Funktionen des NS1 Proteins beruhen unter anderem auf Interaktionen mit zwei zellulären Proteinen, dem CPSF30 (cleavage and polyadenylation specificity factor [CPSF]-30 kDa Untereinheit) und dem PABP2 (nuclear poly(A)-binding protein) (M. E. Nemeroff u. a. 1998; Z Chen, Li, und Krug 1999; Garaigorta und Ortín 2007). Das Blockieren der zellulären mRNA Prozessierung dient dem Abschalten von Wirtszell-Funktionen, wie zum Beispiel der antiviralen Zellantwort. Virale mRNAs sind von dieser Blockade des Exports hingegen nicht betroffen.

Da Influenza Viren im Zellkern replizieren, sind sie auf den Export ihrer mRNAs ins Zytoplasma durch die zelluläre Exportmaschinerie angewiesen. Zwei der viralen Transkripte werden gespleißt und können eventuell auf diese Weise in den zellulären Exportweg eingeschleust werden, der eng an den Spleißvorgang gekoppelt ist. Die übrigen acht viralen mRNAs hingegen werden nicht gespleißt und haben aus diesem Grund keinen Zugang zu der zellulären Exportmaschinerie. Für andere Viren, die ebenfalls eine nukleare Replikationsstrategie besitzen, wurde beschrieben, dass ein viral kodiertes Protein als Adapterprotein fungiert um virale, intronlose mRNA in den zellulären Exportweg einzuschleusen. Diese Strategie wird beispielsweise von HSV1 verfolgt, dessen virales ICP27 Protein mit Aly und/oder TAP/NXF1 interagiert (L. A. Johnson und Sandri-Goldin 2009; I.-H. B. Chen u. a. 2005). Auch HIV exprimiert ein virales Protein, das durch Interaktion mit der viralen mRNA und einem zellulären Exportrezeptor den Export der RNA Transkripte sicherstellt (Bryan R Cullen 2003; Fischer u. a. 1995).

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Interaktionspartner des viralen NS1 Proteins im zellulären mRNA Exportweg zu identifizieren. Es wurde bereits gezeigt, dass das NS1 Protein der Influenza A Viren an virale mRNA binden kann (Wei Wang u. a. 2008). Das ist eine Voraussetzung, die das NS1 Protein befähigen könnte, als virales Adapterprotein zu fungieren. Die hier durchgeführten Versuche sollten eine solche Funktion untersuchen und aufklären, wie Influenza Viren die Wirtszell-Maschinerie manipulieren oder nutzen könnte, um einen effizienten viralen mRNA Export und damit eine schnelle Replikation sicherzustellen.

4.2 Charakterisierung der Interaktion von NS1 mit den Exportfaktoren SF2/ASF und Aly

Die Prozessierung zellulärer mRNA beinhaltet mehrere miteinander gekoppelte Einzelschritte, vom Spleißen über die Polyadenylierung bis hin zum Export reifer mRNAs. Während der einzelnen Prozesse werden Prozessierungsfaktoren wie der Spleißfaktor SF2/ASF oder die Exportfaktoren Aly und UAP56 an die mRNAs rekrutiert. Die einzelnen Faktoren interagieren funktionell miteinander, sodass eine enge Kopplung der einzelnen Prozesse entsteht (Tom Maniatis und Reed 2002; N. Proudfoot 2000; Iglesias und Stutz 2008). Reguliert wird diese Prozessabfolge und Kopplung durch die CTD der RNA Polymerase II. Sie dient zum einen als Bindungsplattform für Regulatoren der Transkription und Prozessierung (Tom Maniatis und Reed 2002), zum anderen dient sie der Regulation durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung der CTD (Iglesias und Stutz 2008; R. Luna u. a. 2008; Robin Reed und Hurt 2002). Virale mRNAs, die von der viralen Polymerase transkribiert werden, müssen für einen Export der zellulären Exportmaschinerie zugänglich gemacht werden. Nur zwei der zehn viralen mRNAs werden gespleißt und können eventuell auf diese Weise in den Exportweg eintreten. Intronlose und intronhaltige aber nicht-gespleißte mRNA Transkripte benötigen hingegen eine andere Strategie um den Export sicherzustellen. Bis heute ist nicht bekannt, wie die viralen mRNAs aus dem Zellkern exportiert werden. Wie bereits erwähnt eignet sich das virale NS1 Protein als potentielles Adapterprotein, das zelluläre Exportfaktoren an virale mRNA rekrutieren könnte, um diese dann dem zellulären Exportweg zugänglich zu machen. Um zu untersuchen, ob NS1 mit zellulären Exportfaktoren interagiert, wurden einige Faktoren ausgewählt und in einem BiFC Assay auf eine Interaktion hin untersucht. Dazu gehörten das Exportprotein Aly und der Exportrezeptor TAP/NXF1, beide Proteine konnten mit dem Export von HSV1 mRNA Export in Verbindung gebracht werden (I.-H. B. Chen u. a. 2005; Hernandez und Sandri-Goldin 2010; Tunnicliffe, Hautbergue, Kalra, Jackson, Whitehouse, Wilson, und Golovanov 2011b). Aly ist zudem am Export von HVS mRNA beteiligt (Tunnicliffe, Hautbergue, Kalra, Jackson, Whitehouse, Wilson, und Golovanov 2011a). Satterly und Kollegen zeigten, dass der Exportrezeptor TAP/NXF1 mit NS1 präzipitert, diese Interaktion wurde jedoch im Hinblick auf die Inhibition des zellulären mRNA Exports diskutiert (Satterly u. a. 2007), ein positiver Effekt auf den viralen mRNA Export wurde nicht untersucht. Als weiterer Faktor wurde UAP56 ausgewählt, der mit dem Export der HCMV mRNA in Verbindung gebracht wurde, wobei diese Funktion aktuell kontrovers diskutiert wird (Kronemann u. a. 2010; Zielke u. a. 2011). Zusätzlich konnte eine Interaktion von UAP56 mit dem NP Protein der Influenza Viren nachgewiesen und in diesem Zusammenhang ein positiver Effekt auf die virale Replikation gezeigt werden (Momose u. a. 2001; Wisskirchen, Ludersdorfer, Müller, Moritz, und Pavlovic 2011a). Der Export- und Spleißfaktor SF2/ASF wurde ausgewählt, da für diesen Faktor bereits eine Beteiligung am Spleißvorgang der viralen M1 mRNA nachgewiesen werden konnte (Shih und Krug 1996). Desweiteren wurde eine Beteiligung von SR Proteinen am Export intronloser mRNA postuliert (Y Huang und Steitz 2001; Hargous u. a. 2006), somit ist eine Beteiligung am

Export intronloser viraler mRNA vorstellbar. Als weiterer Faktor wurde Y14 ausgewählt, eine Komponente des EJC mit regulatorischen Funktionen in der Rekrutierung von Exportfaktoren. Eine Rekrutierung von Y14 würde eine Rekrutierung von Exportfaktoren ermöglichen (V. N. Kim und Dreyfuss 2001; Schmidt, Im, Benzing, Janjetovic, Rippe, Lichter, und Wachsmuth 2009b; Chuang, Peng, und Tarn 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

- 1) In den BiFC Assays konnte eine Interaktion des viralen NS1 Proteins mit den zellulären Exportfaktoren Aly und SF2/ASF detektiert werden (Abb. 3.7; Abb. 3.8). In *in vitro* Bindungsassays wurden diese Interaktionen bestätigt (Abb. 3.10; Abb. 3.12). Zudem konnte in diesen Assays gezeigt werden, dass die Interaktionen RNA-abhängig sind, da die Bindungseffizienz nach einer Behandlung der Proben mit RNase um die Hälfte abnahm.
- 2) In GST-Bindungsassays mit rekombinant exprimierten und aufgereinigtem NS1 Protein wurde eine direkte Protein-Protein Interaktion nachgewiesen (Abb. 3.14).
- 3) Anhand von NS1 Deletionsmutanten konnte in *in vitro* Bindungsassays gezeigt werden, dass der N-Terminus des NS1 Proteins (Aminosäuren 1-73) notwendig für die Interaktion mit Aly und SF2/ASF sind (Abb. 3.16).
- 4) Die Interaktionen der zellulären Exportfaktoren Aly und SF2/ASF mit dem viralen NS1 Protein konnten *in vivo* durch eine Koimmunpräzipitation gezeigt werden (Abb. 3.17).
- 5) BiFC Assays mit Deletionsmutanten von Aly und SF2/ASF ergaben, dass die RS-Domäne des SF2/ASF nicht an einer Interaktion mit NS1 beteiligt ist (Abb. 3.20). Für Aly konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus (Aminosäure 239-255) für eine Interaktion mit NS1 notwendig ist (Abb. 3.23; Abb. 3.25; Abb. 3.26).
- 6) Mit einem RNA-Immünpräzipitationsassay wurde die Bindung von NS1 und SF2/ASF an virale intronlose und nicht-gespleißte mRNAs gezeigt (Abb. 3.28).
- 7) Minigenom Assays zeigten eine verstärkte Expression viraler Transkripte bei Koexpression von NS1 und SF2/ASF (Abb. 3.30). Ein Fraktionierungsversuch konnte desweiteren einen vermehrten Export von HA, NA und M1 mRNA in Anwesenheit von NS1 und SF2/ASF nachweisen (Abb. 3.32).
- 8) In Replikationsanalysen wurde nach Knock-down des zellulären Aly Proteins mit siRNA eine signifikante Verminderung der Replikationsfähigkeit von Influenza Viren festgestellt (Abb. 3.34).
- 9) Die Interaktionen der zellulären Faktoren Aly und SF2/ASF konnten mit rekombinanten Viren (A/PR/8/34/YC-NS1 und A/PR/8/34/YN-NS1) bestätigt werden (Abb. 3.45; Abb. 3.46; Abb. 3.47).

Zu Beginn dieser Arbeit wurden BiFC Assays durchgeführt, um mehrere zelluläre Faktoren des mRNA Exportweges auf eine Interaktion mit dem viralen NS1 Protein zu untersuchen. BiFC

Assays werden von vielen Gruppen erfolgreich angewendet und konnten bereits Interaktionen zwischen nuklearen Faktoren charakterisieren (Schmidt, Im, Benzing, Janjetovic, Rippe, Lichter, und Wachsmuth 2009a; Schmidt u. a. 2006). Ebenfalls Interaktionen von Influenza Virus Proteinen konnten anhand des BiFC Assay nachgewiesen werden. Hemerka und Kollegen zeigten mit Hilfe dieses Assays eine Interaktion der viralen PA und PB2 Protein miteinander (Hemerka u. a. 2009). Aufgrund dieser Erkenntnisse und der relativ unkomplizierten Anwendung wurde auch in dieser Arbeit das BiFC Assay für Interaktionsstudien genutzt. Mit den zellulären Exportfaktoren Aly und SF2/ASF konnte in diesen Assays eine Interaktion mit dem NS1 Protein detektiert werden. Die Interaktion zwischen NS1 und SF2/ASF konnte in diesem Assay nur in infizierten Zellen nachgewiesen werden. Dies könnte zum einen daran liegen, dass ein zusätzlicher viraler Faktor – ein Protein oder virale RNA – für die Ausbildung oder Stabilisierung notwendig war. Eine andere Möglichkeit ist, dass es sich um eine transiente Interaktion handelt die in transfizierten Zellen nur kurzzeitig auftritt. In 2 von 10 Versuchsdurchführungen konnte eine Interaktion von NS1 mit SF2/ASF auch in transfizierten Zellen nachgewiesen werden, diese Ergebnisse konnten jedoch nicht reproduziert werden. Weitere Bindungsstudien unterstützen eine Komplexbildung von NS1 und SF2/ASF. So konnte in *in vitro* Bindungsstudien mit *in vitro* translatiertem, viral exprimierten oder bakteriell exprimierten und aufgereinigtem NS1 Protein die Interaktion mit Aly und SF2/ASF mit dem viralen Protein bestätigt werden, und ebenso in einem *in vivo* Ansatz mittels Koimmunpräzipitation. Es konnte gezeigt werden, dass es sich um direkte Protein-Protein Interaktionen handelt, die teilweise von RNA stabilisiert werden. Diese Daten lassen Vermutungen über einen eventuellen Ablauf der Reaktionen zu. In Abbildung 4.1 sind zwei Modelle dargestellt. In Modell A bindet das NS1 Protein zuerst an den zellulären Exportfaktor, durch diese Bindung könnte die Affinität zur RNA-Bindung der Proteine gesteigert werden und der Proteinkomplex interagiert infolge dessen mit der viralen mRNA. Der zelluläre Exportrezeptor TAP/NXF1 wird über einen ähnlichen Mechanismus an zelluläre mRNA rekrutiert. TAP/NXF1 besitzt vorerst nur eine geringe Affinität zu RNA, durch die Interaktion mit dem Adapterprotein Aly verändert der Exportrezeptor jedoch seine Konformation und wird affin für mRNA (Hautbergue u. a. 2008). Ein ähnlicher Mechanismus ist für das NS1 Protein möglich, nach Rekrutierung des zellulären Exportfaktors wird die Affinität zu viraler mRNA gesteigert und die Bindung an virale mRNA festigt den Komplex. Im Modell B bindet das NS1 Protein zuerst an virale mRNA und rekrutiert infolgedessen SF2/ASF oder Aly an die virale mRNA. NS1 formt eine Bindungsplattform auf der viralen mRNA für die zellulären Exportfaktoren. Ähnlich rekrutiert der EJC Prozessierungs- und Exportfaktoren an die mRNA. Zuerst formt sich ein Kernkomplex aus Y14, Magoh, eIF4A3 und MLN51, und danach werden weitere Faktoren wie Aly, RNPS1 und weitere rekrutiert (Schmidt, Im, Benzing, Janjetovic, Rippe, Lichter, und Wachsmuth 2009a).

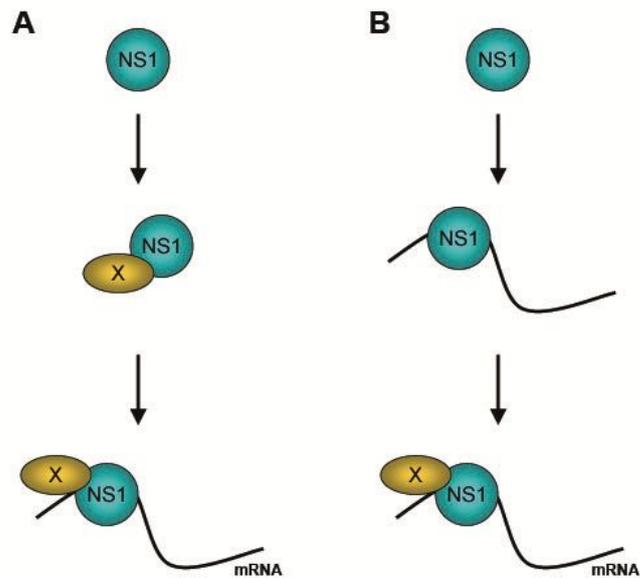


Abb.4.1: Schematische Darstellung der Rekrutierung von zellulären Exportfaktoren durch das virale NS1 Protein. Die Rekrutierung von Exportfaktoren kann auf zwei unterschiedliche Weisen geschehen, in Modell A rekrutiert freies NS1 Protein den Exportfaktor (X) und bindet erst danach als Komplex an virale mRNA. Modell B hingegen postuliert, dass das NS1 Protein erst an virale mRNA bindet und dann mit einem zellulären Exportfaktor interagiert. X: zellulärer Exportfaktor.

Anhand von NS1 Deletionsmutanten konnte in GST-Bindungsstudien nachgewiesen werden, dass der N-Terminus (AS 1-73) die Bindung mit den zellulären Proteinen vermittelt. Diese Domäne des viralen Proteins wird auch als RNA-Bindungsdomäne bezeichnet. Es konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die Aminosäuren R39 und K41 für die RNA-Bindung verantwortlich sind (Hale, Randall, u. a. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurden *in vitro* Bindungsstudien mit einer NS1 Mutante durchgeführt, die in der RNA-Bindung eingeschränkt ist. Diese Mutante trug an der AS Position 34, 35, 37, und 38 jeweils ein Alanin (Abb. 3.9), die AS 39 und 41 hingegen waren intakt. Die Bindungsassay in dieser Arbeit zeigten keine Interaktion zwischen der NS1 RNA mut Version und den zellulären Proteine Aly und SF2/ASF. Zur genaueren Kartierung der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren müssten weitere Experimente durchgeführt werden. Somit könnte geklärt werden, ob die an der RNA-Bindung notwendigen Aminosäuren auch an der Protein-Protein Interaktion mit den zellulären Faktoren beteiligt sind. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob die Interaktion zwischen NS1 und Aly oder SF2/ASF und der viralen mRNA parallel stattfinden kann, oder ob sie sich gegenseitig ausschließt und nacheinander erfolgen muss.

Gerade, weil das NS1 Protein unterschiedlichste Funktionen in der Wirtszelle übernimmt, ist ein Mechanismus vorstellbar, der bestimmte Interaktionen des Proteins reguliert. Solch ein Mechanismus kann durch post-translationale Modifikationen des Proteins geschehen – Phosphorylierung, Methylierung, Sumoylierung oder ähnliches. Bereits für Aly wurde postuliert, dass unterschiedliche Methylierungs-Zustände des Aly Proteins die Fähigkeit, RNA an den Exportrezeptor TAP/NXF1 zu übergeben, verändert (Hung u. a. 2010). Auch für das zelluläre

Protein SF2/ASF wurde beschrieben, dass die Aktivität anhand unterschiedlicher Phosphorylierungszustände und möglicherweise auch durch Methylierungen reguliert wird (Koizumi u. a. 1999; Bullock u. a. 2009; Sinha u. a. 2010). Es ist möglich, dass die Bindung des NS1 Proteins an virale mRNA eine Interaktion mit den Exportfaktoren stabilisiert, um eine vorzeitige Abdissoziation des Proteinkomplexes zu verhindern und den vollständigen Export zu gewährleisten. Ähnliche Mechanismen sind bereits in der Literatur beschrieben, so ist unter anderem eine Rolle der 5'-Kappe und des Poly(A)-Schwanz der zellulären mRNA die Stabilität dieser zu gewährleisten und Prozessierungsfaktoren wie beispielsweise Aly zu rekrutieren (Gallie 1991; Deo u. a. 1999; Keller und Minvielle-Sebastia 1997; H. Cheng u. a. 2006). In ähnlicher Weise könnte das NS1 Protein die Bildung eines Exportkomplexes auf der viralen mRNA katalysieren.

Um zu charakterisieren, welche Domänen der Proteine SF2/ASF und Aly an der Ausbildung der Interaktion beteiligt sind, wurden Mutationsanalysen durchgeführt. Für das SF2/ASF Protein konnte in BiFC Studien eine Beteiligung der RS-Domäne der Komplexbildung mit NS1 ausgeschlossen werden (Abb. 3.20). Dies deutet auf eine Interaktion von SF2/ASF und NS1 über die RNA-recognition-motif (RRM)-Domänen des zellulären Exportfaktors hin. Experimentelle Studien konnten zeigen, dass SF2/ASF durch die RRM-Domänen mit der Topoisomerase I interagiert (Kowalska-Loth u. a. 2005). Desweiteren demonstrierten Tintaru und Kollegen, dass SF2/ASF über die Linker-Domäne zwischen den RRM-Domänen den Export-Rezeptor TAP/NXF1 rekrutiert (Tintaru u. a. 2007). NS1 könnte durch Bindung an die RRM-Domänen die Bindung von SF2/ASF an virale mRNAs stabilisieren und einen funktionellen Exportkomplex formen. Möglicherweise könnte auch die Rekrutierung des Exportrezeptors TAP/NXF1, beispielsweise durch Exponierung der Bindungsdomäne, durch die Interaktion mit NS1 gefördert werden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die für eine Interaktion mit NS1 notwendigen Aminosäuren zu identifizieren.

Ebenfalls in BiFC Assay wurden nachgewiesen, dass der C-Terminus des Exportproteins für die Interaktion mit NS1 essentiell ist (Abb. 3.23; Abb. 3.25; Abb. 3.26). Luo und Kollegen berichteten, dass der C-Terminus (AS 239-255) von Aly nicht nur für eine Interaktion mit UAP56, sondern auch für die Rekrutierung von Aly an prozessierte mRNPs notwendig ist (M. L. Luo u. a. 2001). Abbildung 4.2 veranschaulicht die Rekrutierung von Aly über UAP56 bzw. NS1 an mRNA. Inwiefern NS1 und UAP56 um die Bindung an den C-Terminus (AS 239-255) von Aly konkurrieren, oder ob die Proteine parallel binden können wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht adressiert. In Abbildung 4.3 sind die Bindungsdomänen der einzelnen Proteine anhand der hier durchgeführten Ergebnisse kartiert.

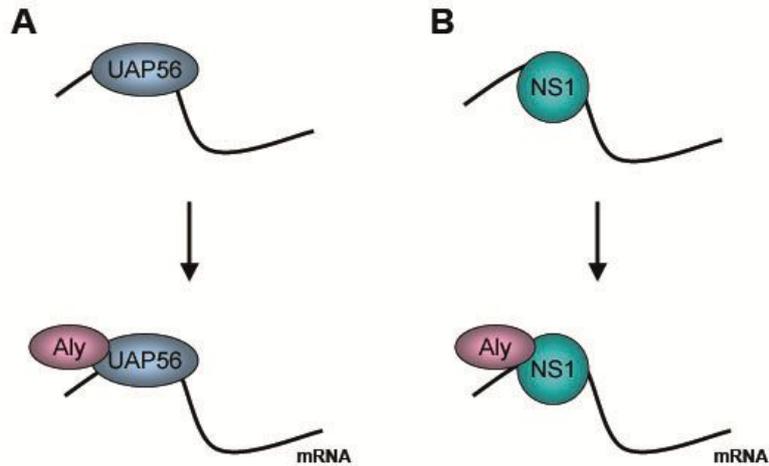


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Rekrutierung des Exportfaktors Aly. Der zelluläre Exportfaktor und Helikase UAP56 rekrutiert bindet den C-Terminus (AS 239-255) des Aly Proteins und rekrutiert auf diese Weise Aly an die zu exportierende mRNA. Ebenfalls NS1 bindet Aly in diesem Bereich und rekrutiert es vermutlich so an virale mRNAs.

Die hier zum erstenmal beschriebenen Interaktionen von NS1 mit den zellulären Exportfaktoren SF2/ASF und Aly unterstützt die Hypothese einer Adapterprotein-Funktion von NS1. Weil Influenza A/delNS1 Viren auf Interferon-kompetenten Zellen stark attenuiert sind – um 3-Log Stufen - und auf Verozellen, die kein Interferon bilden, immer noch um eine Log-Stufe in ihrer Replikation inhibiert sind (A García-Sastre u. a. 1998) handelt es sich vermutlich nicht um eine für das Virus essentielle Funktion. Dennoch zeigt gerade ein attenuiertes Wachstum auf Zellen, die nicht über ein Interferon-System verfügen, dass neben der antiviralen Wirkung des NS1 Proteins weitere Funktionen des Proteins eine virale Vermehrung unterstützen. Dies könnte beispielsweise die Förderung des viralen mRNA Exports sein. NS1 könnte im frühen Replikationszyklus mit dieser Funktion die Replikation signifikant vorantreiben. Die Rekrutierung von Exportfaktoren ermöglicht ein schnelles Voranschreiten, bzw. Abschließen des viralen Replikationszyklus. Für weitere Viren, wie beispielsweise HSV1 und HIV, konnte bereits eine Rekrutierung von Aly oder anderen Faktoren an virale mRNA nachgewiesen werden, um einen Export dieser zu gewährleisten (I.-H. B. Chen u. a. 2005; L. A. Johnson und Sandri-Goldin 2009; Bryan R Cullen 2003). Die Rekrutierung von Proteinen aus dem zellulären mRNA Exportweg konnte demnach als eine erfolgreiche Strategie von viralen Adapterproteinen betrachtet werden, um den Export der eigenen mRNAs zu gewährleisten. Dies unterstützt die Bedeutung der hier beobachteten Interaktionen des NS1 Proteins im viralen mRNA Export.

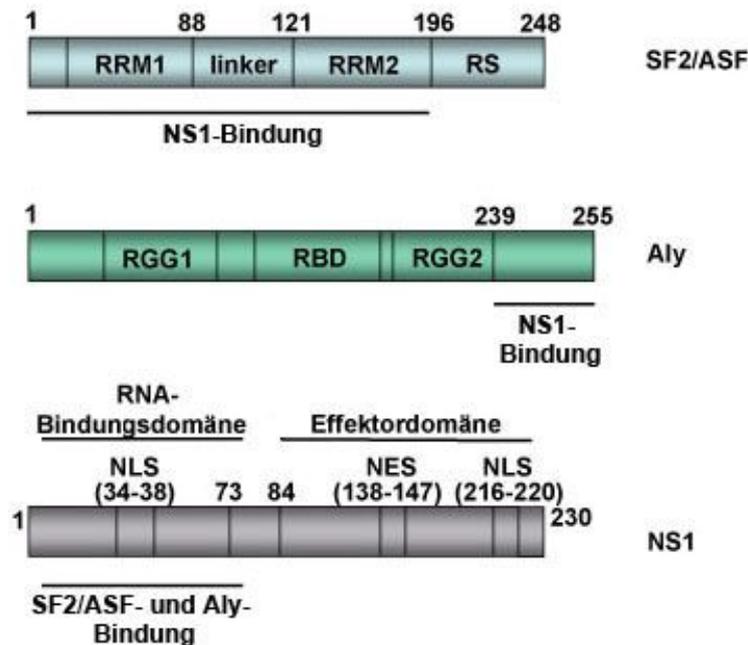


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Proteine SF2/ASF, Aly und NS1. Gekennzeichnet sind potentielle Interaktionsdomänen.

4.3 Stimulierender Effekt von NS1 und SF2/ASF auf den viralen mRNA Export

Essentielle Eigenschaften von Adapterproteinen sind auf der einen Seite eine Assoziation mit der zu exportierenden mRNA und zum anderen die Interaktion mit einem Exportprotein, um ein Hinausschleusen der RNA aus dem Zellkern zu gewährleisten. Für NS1 wurde in dieser Studie und von weiteren Gruppen eine Bindung an virale mRNA nachgewiesen (Wei Wang u. a. 2008; Bier, York, und Fodor 2011). Auch für das zelluläre Exportprotein Aly wurde experimentell eine Bindung an virale mRNA vorgeschlagen (Bier, York, und Fodor 2011). Für SF2/ASF konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass es virale mRNA präzipitiert (Abb. 3.28). Beide Exportproteine interagieren nicht nur direkt mit dem viralen NS1 Protein, sondern können somit auch virale mRNAs binden. In der Literatur ist beschrieben, dass sowohl Aly als auch SF2/ASF fähig sind den Exportrezeptor TAP/NXF1 an die zu exportierende mRNA zu rekrutieren (Taniguchi und Ohno 2008; Yingqun Huang u. a. 2003).

Das Zusammenspiel von NS1 und SF2/ASF wurde im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht. In Minigenom-Assays konnte gezeigt werden, dass eine Koexpression beider Proteine die Expression eines viralen Reporterkonstrukts bis zu sechsfach verstärkte (Abb. 3.29). Ob dieser Effekt auf einem verstärkten Export viraler mRNA oder aber auf einem positiven Effekt in der Proteintranslation beruhte, konnte anhand dieses Assays nicht aufgeschlüsselt werden. In einer weiteren Untersuchung wurde daher die mRNA Konzentration des viralen Reporterkonstrukts in der zytoplasmatischen und nukleoplasmatischen Fraktion bestimmt. Tatsächlich konnte ein

positiver Effekt auf den Export viraler mRNA detektiert werden (Abb. 3.30; Abb. 3.31). Es konnte eine Steigerung des Exports von intronloser und ungespleißter mRNA bei Koexpression von NS1 und SF2/ASF in diesem Assay erzielt werden. Weitere Untersuchungen sind notwendig um zu klären, ob dieser Effekt der einzige Grund einer erhöhten Expression ist, oder ob die Interaktion zwischen NS1 und SF2/ASF ebenfalls auf die Translation wirkt. Desweiteren wäre es interessant eine Beteiligung von Aly in diesem Kontext zu untersuchen und analysieren.

In dieser Arbeit wurde nur der Export der Segmente 4, 6 und 7 (HA, NA und M1) untersucht, das sind intronlose oder nicht-gespleißte virale mRNA. Die HA und NA mRNA zeigten dabei einen gesteigerten Export durch Koexpression von NS1 und SF2/ASF. Read und Kollegen haben gezeigt, dass scheinbar nicht alle virale mRNAs mit der gleichen Effizienz exportiert werden (Read und Digard 2010). Demnach zeigten die ungespleißten mRNAs der frühen Genprodukte, insbesondere NP und PB1 mRNAs, die geringste Abhängigkeit vom TAP/NXF1-vermittelten Exportweg. Die intronlosen und gespleißten mRNAs der späten Genprodukte hingegen, zeigten die größte Abhängigkeit von diesem zellulären Exportweg. Somit zeigten die Ergebnisse des HA mRNA Exports bei Read und Kollegen dieselbe Tendenz in der Abhängigkeit von zellulären Faktoren, wie die Ergebnisse dieser Arbeit. Eine weitere Untersuchung der gesamten viralen mRNAs ist notwendig, um einen Einfluss der NS1-SF2/ASF oder auch der NS1-Aly Interaktion auf den spezifischen Export von unterschiedlichen Spezies der mRNAs zu entschlüsseln.

4.4 Aly beeinflusst die effiziente Replikation von Influenza A Viren

Eine siRNA Behandlung gegen TAP/NXF1 führte in Replikationsstudien zu einer verminderten Replikation von Influenza A Viren (Hao u. a. 2008; Read und Digard 2010). Read und Kollegen beobachteten eine Abnahme der Replikationseffizienz um zwei Log-Stufen, wenn TAP/NXF1 nicht exprimiert wurde. Dies verstärkt die Bedeutung des Exportrezeptors TAP/NXF1 im viralen Replikationszyklus. In dieser Arbeit wurde die Rolle der zellulären Exportfaktoren, die über Interaktion mit NS1 und viraler mRNA den Exportrezeptor rekrutieren und so eine Verbindung zwischen viralen Transkripten und dem zellulären Exportweg schaffen untersucht. Wenn SF2/ASF und Aly im Export viraler mRNA beteiligt sind, dann sollte die Abwesenheit der Proteine eine negative Auswirkung auf die virale Replikation haben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass das Fehlen von Aly zu einer um eine Log-Stufe signifikant verminderten Replikation von Influenza A Viren führte (Abb. 3.34). Nach verminderter Expression von SF2/ASF hingegen, konnte kein Effekt auf die virale Replikation beobachtet werden. Die siRNA Behandlung von SF2/ASF war im Vergleich zu Aly weniger effizient. Die Expression von SF2/ASF war nach 24 Stunden um etwa 60% und nach 36 Stunden um 50% reduziert, Aly hingegen war nach 24 Stunden bereits um 90% reduziert und nach 36 Stunden konnte kein Protein detektiert werden (Abb. 3.35). Die Versuchsbedingungen für die siRNA

Behandlungen wurden stets in nicht infizierten Zellen durchgeführt. Es wäre denkbar, dass durch die Infektion der Gen-Knock-down für SF2/ASF beeinträchtigt wurde und die Behandlung daher nicht effizient verlief. Andererseits wäre es auch möglich, dass trotz der siRNA Behandlung noch ausreichende Mengen von SF2/ASF Proteine in der Zelle vorhanden waren. Desweiteren können Faktoren wie die Stabilität der mRNA Transkripte und ihre Abundanz einen Effekt auf die Qualität des Gen-Knock-down von SF2/ASF haben. Einen Effekt auf die virale Replikation konnte in diesem Assay nicht nachgewiesen werden. Zur Komplettierung dieser Studien, sollten diese mit einem effizienten SF2/ASF Knock-down wiederholt werden.

In anderen Studien wurde gezeigt, dass eine siRNA Behandlung gegen TAP/NXF1 zu einer 100-fach verminderten Replikation von Influenza A Viren führte (Hao u. a. 2008; Read und Digard 2010). Zusätzlich wurde eine 10-fach verminderte Replikation beobachtet, bei Inhibition der zellulären Expression von UAP56 durch siRNA (Read und Digard 2010). UAP56 ist ebenfalls ein Exportprotein, dessen unterstützende Funktion auf die virale Replikation postuliert wurde (Momose u. a. 2001). Es konnte eine Interaktion von UAP56 mit dem viralen Nukleoprotein nachgewiesen werden, jedoch wurde die Bedeutung von UAP56 auf die virale Replikation nicht weiter analysiert (Momose u. a. 2001). Eine aktuelle Studie hat dieses Thema wieder aufgegriffen und postuliert für UAP56 sowohl eine Funktion in der Unterdrückung einer antiviralen Immunantwort während einer Influenza Virus Infektion, als auch eine Rolle im Export viraler mRNAs (Wisskirchen, Ludersdorfer, Müller, Moritz, und Pavlovic 2011a; Wisskirchen, Ludersdorfer, Müller, Moritz, und Pavlovic 2011b). Nach Knock-down von UAP56 wurde ein verminderter Export viraler M1 und NP mRNA im Vergleich zu Kontroll-Zellen beobachtet, es wurde jedoch nicht untersucht inwiefern dieser Effekt spezifisch war. Ein Knock-down von UAP56 hat deutliche Auswirkungen auf die Zell-Vitalität und führt nach 72 Stunden zum Zelltod (Kapadia u. a. 2006). Die beobachteten Ergebnisse könnten durch Nebeneffekte der Behandlung hervorgerufen worden sein. Desweiteren wurde eine mögliche Assoziation von UAP56 mit den viralen mRNAs untersucht. Somit ist nicht sicher, ob und welche Rolle UAP56 in diesem Zusammenhang einnehmen könnte.

Einen signifikanten Effekt von Aly auf die virale Replikation, wie in dieser Arbeit gezeigt, konnte von Read und Kollegen nicht beobachtet werden, was an unterschiedlichen Versuchsbedingungen oder unterschiedlichen Qualitäten der verwendeten siRNAs liegen könnte. Bereits in früheren Studien wurde beobachtet, dass eine Inhibition der Aly Expression nur einen sehr geringen Effekt auf den Export von poly(A)RNAs hatte (L. A. Johnson, Li, und Sandri-Goldin 2009). Es ist bekannt, dass mehrere zelluläre Faktoren im mRNA Export als Adaptorproteine für TAP/NXF1 dienen. Die Abwesenheit nur eines dieser Proteine könnte ohne funktionellen Ausfall des zellulären mRNA Exports bleiben (H. Cheng u. a. 2006; Masuda u. a. 2005). Die Überexpression von Aly stimulierte den Export viraler HSV1 mRNAs, was den Einfluss auf virale Transkripte zeigte (I.-H. B. Chen, Sciabica, und Sandri-Goldin 2002; Koffa u. a. 2001). Eine genaue Rolle von Aly im Export viraler mRNAs ist aufgrund der unterschiedlichen Daten noch offen. Die in dieser Arbeit gezeigten Replikationsstudien nach Inhibition von Aly

zeigen einen signifikanten Effekt und bestärken die Theorie einer funktionellen Beteiligung von Aly im mRNA Export der Influenza Viren.

Für SF2/ASF zeigten frühere Studien, dass eine Inhibition der Expression durch siRNA den alternativen Spleißvorgang in der Zelle beeinflussen kann (de la Mata u. a. 2003). Zudem wurde gezeigt, dass eine solche Behandlung einen Einfluss auf das Verhältnis zwischen Kappen-abhängiger und interner ribosomaler Eintrittsstellen (IRES)-vermittelter Translation ausübt (Blaustein u. a. 2009). Neue Untersuchungen von Pelisch und Kollegen deuten ebenfalls auf einen Zusammenhang einer SF2/ASF Inhibition und der Inhibition der Sumylierung von Proteinen in der Zelle hin (Pelisch u. a. 2010). Diese Daten unterstreichen die vielfältigen Funktionen von SF2/ASF. Die Tatsache, dass in dieser Arbeit keine Effekte durch die siRNA-Behandlung gegen SF2/ASF nachgewiesen werden konnten, wurde als eine insuffiziente Effizienz der Inhibition interpretiert.

Neben den Replikationsstudien von Influenza A Viren wurde ebenfalls die Replikation von Vesikular Stomatitis Viren (VSV) nach dem Knock-down von zellulären Exportproteinen Aly, SF2/ASF und UAP56 analysiert. VSV replizieren nicht im Nukleus ihrer Wirtszelle und sind dadurch nicht von zellulären mRNA Exportfaktoren abhängig. Die hier durchgeführten Analysen zeigen, dass die siRNA Behandlung keinen Einfluss auf den Titer der VSV hat (Abb. 3.36). Diese Ergebnisse bestätigen zum einen, dass die siRNA-behandelten Zellen voll funktionsfähig waren um Virus zu replizieren, zum anderen, dass der beschriebene Effekt des Aly-Knock-downs auf die Influenza A Virus Replikation spezifisch war.

4.5 Rekombinante Influenza A Viren

Der Nachweis von Proteineninteraktionen mit *in vitro* und *in situ* Assays ermöglicht die Biochemie dieser Interaktionen zu untersuchen. Unerlässlich sind jedoch *in vivo* Untersuchungen, um eine Relevanz in einem biologischen System nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit Balaji Manicassamy und Adolfo Garcia-Sastre der Mount Sinai School of Medicine, New York, rekombinante Influenza A Reporterviren hergestellt. Eine Variante exprimierte ein YC-NS1 Protein, eine andere Variante das YN-NS1 Protein. Diese Viren konnten genutzt werden, um die Interaktionen zwischen NS1 und den Exportproteinen SF2/ASF und Aly in BiFC Assays zu bestätigen (Abb. 3.45; Abb. 3.46; Abb. 3.47). Das virale Protein wird in diesen Ansätzen in Konzentrationen entsprechend einer normalen Infektion exprimiert. Kürzlich wurde die erfolgreiche Konstruktion eines GFP-Reportervirus publiziert (B. Manicassamy u. a. 2010). Diese Viren, ebenso wie die in dieser Arbeit benutzten YC-NS1- und YN-NS1-Reporterviren, waren zum Teil leicht attenuiert, replizierten aber ähnlich effizient und teilweise zu vergleichbaren Titern wie die korrespondierenden Viren ohne eine Fusion (YC, YN oder GFP) am NS1 Protein. Die NS1-Fusionsproteine sind weiterhin fähig eine antivirale Immunantwort in der Zelle zu antagonisieren. Diese Erkenntnisse deuten auf ein funktionsfähiges rekombinantes Virus hin, ohne signifikante Einschränkungen in der

Replikation. Die Interaktionen der NS1-Fusionsproteine mit den Exportfaktoren SF2/ASF und Aly in diesem Assay beruhen daher nicht auf eine eventuelle Beeinträchtigung der Infektion. Die hier beschriebenen rekombinanten Viren können für weitere Untersuchungen von großer Bedeutung sein um unterschiedliche Fragestellungen *in vivo* zu adressieren (siehe Abschnitt 4.7).

4.6 Nuklearer Export der mRNA von Influenza A Viren – ein Modell

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Daten bezüglich des viralen mRNA Exports, wurden in Abbildung 4.4 in einem Modell dargestellt.

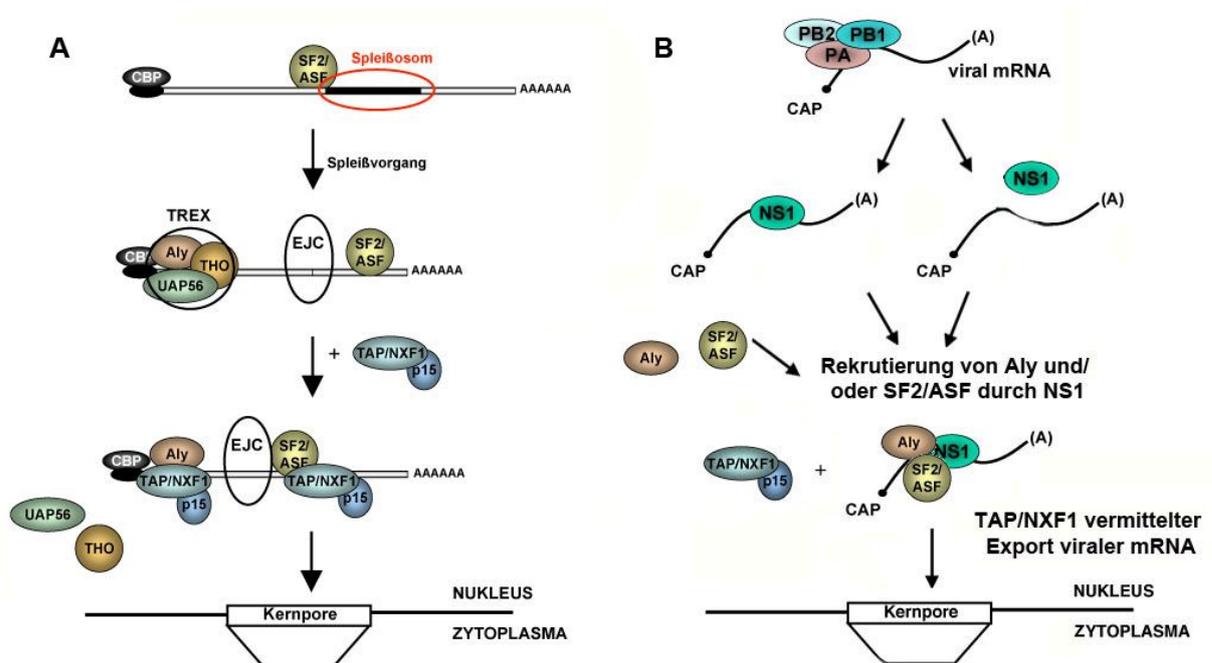


Abb. 4.4: Schematische Darstellung des nuklearen Export zellulärer mRNA und des Arbeitsmodells des viralen mRNA Export. A) Ko-transkriptionell wird neu gebildete prä-mRNA gespleißt und es formt sich der Exon-Junction Multiproteinkomplex (EJC) aufwärts der Verknüpfungsstelle zweier aufeinander folgender Exons auf der prä-mRNA. Der EJC dient als Bindungsplattform zur Rekrutierung notwendiger Faktoren der RNA-Qualitätskontrolle und des Exports. Die Exportfaktoren Aly und SF2/ASF sind transient mit dem EJC assoziiert. Neben dem EJC bildet der THO-Komplex zusammen mit den Proteinen Aly und UAP56 den Transkriptions/Export (TREX) Komplex. Dieser wird in Abhängigkeit von der Transkription und der 5'-Kappenstruktur zur mRNA rekrutiert. Sowohl Aly als auch SF2/ASF sind Adapterproteine und besitzen die Fähigkeit den Exportrezeptor TAP/NXF1 zu binden und an die exportbereite mRNA zu übergeben. Während diesem Schritt erfolgt eine Abdissoziation von UAP56. TAP/NXF1 vermittelt den Export der mRNAs durch eine Interaktion mit den FG-repeats bestimmter Nukleoporine durch die Kernpore hindurch. B) Virale mRNAs werden im Gegensatz zu zellulären mRNAs von der eigenen viralen Polymerase transkribiert, und hat aus diesem Grund keinen Zugang zu der zellulären Exportmaschinerie. Das NS1 Protein der Influenza A Viren rekrutiert entweder direkt einen zellulären Exportfaktor bevor es an virale mRNA bindet, oder aber es bindet zuerst an neu gebildete virale mRNAs und rekrutiert danach Aly und/ oder SF2/ASF. Somit formt sich ein Proteinkomplex auf viralen Transkripten. Durch die Funktion von Aly und SF2/ASF als Adapterproteine kann im Weiteren der Exportfaktor TAP/NXF1 an virale mRNPs rekrutiert werden und den Export durch die Kernpore ins Zytoplasma vermitteln.

Virale mRNA Transkripte werden vom viralen Polymerasekomplex transkribiert und haben aus diesem Grund keinen Zugang zum zellulären mRNA Exportweg. In dieser Studie wurde zum ersten Mal eine Verbindung dieser Transkripte zum zellulären mRNA Exportweg durch die Protein-Protein Interaktion des NS1 Proteins mit den Exportfaktoren SF2/ASF und Aly gezeigt. Sowohl für Aly, als auch für SF2/ASF wurde gezeigt, dass diese den Exportrezeptor TAP/NXF1 binden und so für den Export von mRNA Transkripten sorgen (Hautbergue u. a. 2008; Yingqun Huang u. a. 2003). Bindungsstudien demonstrieren, dass Aly und SF2/ASF im N-terminalen Bereich des NS1 Protein binden. Fraglich bleibt dabei, ob sich die Interaktionen gegenseitig ausschließen, oder ob NS1 parallel beide Exportfaktoren binden kann. Erste experimentelle Daten legen eine gleichzeitige Assoziation beider Exportfaktoren mit dem viralen NS1 Protein nahe (Daten nicht gezeigt). Hierbei könnten beide Proteine für die Formation eines stabilen Exportkomplexes rekrutiert werden, oder unterschiedliche mRNA Spezies könnten jeweils ein anderes Exportprotein benutzen. Weil Influenza Viren verschiedene mRNAs exprimieren, könnten unterschiedliche Exportfaktoren für diese verschiedenen intronlosen, intronhaltigen-ungespleißte und gespleißte Transkripte verantwortlich sein.

In dem hier postulierten Modell rekrutiert das NS1 entweder als freies Protein oder gebunden an virale mRNA die zellulären Exportfaktoren Aly und SF2/ASF. Die hier dargestellten Daten beschreiben eine Protein-Protein Interaktion zwischen viralem NS1 Protein mit den zellulären Exportfaktoren, die durch RNA stabilisiert wird. Die stabilisierende Interaktion mit RNA könnte eine vorzeitige Abdissoziation des Exportkomplexes verhindern. Die Faktoren ermöglichen eine Rekrutierung des Exportrezeptors TAP/NXF1 an virale mRNA und damit den Export.

Das NS1 Protein und der virale Polymerasekomplex der Influenza A Viren konnten bereits mit der zellulären Exportmaschinerie in Verbindung gebracht werden (Momose u. a. 2001; Engelhardt, Smith, und Fodor 2005). Der virale Polymerase Komplex kann an die C-terminale Domäne (CTD) der RNA Polymerase II binden (Engelhardt, Smith, und Fodor 2005). Durch die Interaktion der viralen Polymerase mit der CTD könnten virale Transkripte Zugang zu sonst nur während der Transkription durch die zelluläre RNA Polymerase vermittelte Faktoren erhalten (Amorim u. a. 2007). Allerdings legen aktuelle Untersuchungen die Vermutung nahe, dass die Interaktion der viralen Polymerase mit der CTD dem „host shut off“ dient und die Degradation der zellulären RNA Polymerase initiiert (Vreede und Fodor 2010). Zusätzlich konnte für das NS1 Protein eine Assoziation mit der viralen Polymerase gezeigt werden (Kuo und Krug 2009; Marión u. a. 1997). Eine Funktion dieser Interaktion für die virale Transkription ist aber bisher nicht geklärt. Die Interaktion der viralen Polymerase mit der CTD scheint anhand der publizierten Daten keine direkte Auswirkung auf den viralen mRNA Export zu haben, sondern dient eher dem Ausschalten der zellulären Transkriptionsmaschinerie.

Der hier postulierte Export viraler mRNAs über einen TAP/NXF1-vermittelten Weg wird durch publizierte Studien gestützt. Diese vermuten ebenfalls eine Rolle des Exportrezeptors TAP/NXF1 im viralen mRNA Export. So zeigten Wang und Kollegen, dass TAP/NXF1 virale mRNA kopräzipitiert. Weitere Gruppen zeigten, dass ein siRNA knockdown des Exportrezeptors

zu einer verminderten Replikation von Influenza A Viren führt (Hao u. a. 2008; E. K. C. Read und Digard 2010). Zusätzlich wurde der Inhibitor Leptomycin B eingesetzt, um einen Export viraler mRNA durch den Exportrezeptor Crm1 auszuschließen. Es zeigte sich, dass virale Transkripte durch diese Behandlung nicht beeinträchtigt wurden (Amorim u. a. 2007; Wei Wang u. a. 2008), was eine Beteiligung von TAP/NXF1 im viralen mRNA Export unterstreicht.

Eine effiziente Bindung des Exportrezeptors TAP/NXF1 an zu exportierende mRNA wird durch ein Adapterprotein, wie beispielsweise Aly oder SF2/ASF, vermittelt. Bei einer möglichen Beteiligung von TAP/NXF1 am viralen mRNA Export stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus virale Transkripte in diesen Exportweg eingeschleust werden. In den sehr frühen Schritten des viralen Replikationszyklus ist kein NS1 Protein anwesend, da es als virales Nichtstruktur-Protein in der infizierten Zelle erst synthetisiert werden muss. Das bedeutet, dass in auch Abwesenheit des NS1 Proteins die primären viralen mRNA Transkripte exportiert und translatiert werden (P. Palese und Shaw 2007). Allerdings wird eine unterstützende Funktion des NS1 Proteins im viralen mRNA Export diskutiert. Studien mit temperatur-sensitiven (ts) Influenza Viren zeigten, dass Mutationen im NS1-Gen Defekte in der Expression später viraler Gene, wie z.B. M1 und HA, nach sich zogen (Garaigorta, Falcón, und Ortín 2005; S Ludwig, Vogel, und Scholtissek 1995). Eine direkte Verbindung des NS1 Proteins mit der zellulären Exportmaschinerie konnte von Satterly und Kollegen gezeigt werden. In ihren Versuchen wurde eine Interaktion mit den zellulären Exportproteinen TAP/NXF1, p15, Rae1 und dem Nukleoporin Nup98 nachgewiesen (Satterly u. a. 2007). Es wurde anhand dieser Ergebnisse jedoch vermutet, dass die Interaktion von NS1 mit Exportfaktoren eine inhibitorische Funktion besitzt und so den zellulären mRNA Export blockiert. Die neuesten Untersuchungen, welche hingegen einen TAP/NXF1-vermittelten Export viraler Transkripte postulieren, lassen diese Eigenschaften des NS1 Proteins wieder in einem anderen Licht erscheinen. Wang und Kollegen beschrieben eine Verbindung zwischen TAP/NXF1 und NS1 Protein mit viraler mRNA (Wei Wang u. a. 2008), ohne jedoch eine weitere Verbindung zum zellulären Exportweg schaffen können. In dieser Arbeit wurde zum einen gezeigt, dass das NS1 Protein und das zelluläre SF2/ASF virale mRNA präzipitieren, zum anderen wurde die direkte Interaktion mit den Exportfaktoren SF2/ASF und Aly nachgewiesen, wodurch eine aktive Rolle des NS1 Proteins am viralen mRNA Export vorgeschlagen wird.

Andere Forschungsergebnisse sehen das NS1 Protein hingegen nicht beteiligt und vermuten einzig eine Rolle zellulärer Adapterproteine. So zeigten Read und Kollegen, dass nicht nur ein Knock-down des Exportrezeptors TAP/NXF1 den Export viraler Transkripte negativ beeinflusst, sondern, dass auch ein Knock-down der Helicase UAP56 einen Einfluss auf den Export hat. Während in Abwesenheit von TAP/NXF1 vor allem spätere Transkripte beeinträchtigt wurden, wie HA und M2, zeigten in Abwesenheit von UAP56 Transkripte der M1, M2 und NS1 Gene die größte Beeinträchtigung (E. K. C. Read und Digard 2010). In einer weiteren Studie wurde zusätzlich gezeigt, dass der Exportfaktor Aly, das PolyA-bindende Protein (PABP)1, die 20kDa

Untereinheit NCBP1 des nuklearen Cap-binding Komplex (CBC) und der eukaryotische Translations-Initiationsfaktor eIF4E mit viraler mRNA assoziieren (Bier, York, und Fodor 2011).

Die bisher veröffentlichten Daten unterstützen die Abhängigkeit des viralen mRNA Exports von TAP/NXF1 und vermutlich von weiteren zellulären Exportfaktoren. Ein klares Bild ergeben die Daten bisher jedoch nicht. Die Ergebnisse in dieser vorliegenden Arbeit ermöglichen eine Verbindung zwischen dem viralen NS1 Protein und der zellulären Exportmaschinerie.

Aufgrund der Assoziation von weiteren zellulären Faktoren mit viraler mRNA, wie von Bier und Kollegen berichtet (Bier, York, und Fodor 2011), liegt die Vermutung nahe, dass sich ein gesamter Exportkomplex auf der viralen mRNA formiert. Es ist durchaus denkbar, dass SF2/ASF und/oder Aly dabei helfen, solch ein Exportkomplex zu bilden, da für beide Proteine nicht nur eine Assoziation mit viraler mRNA gezeigt wurde, sondern auch die direkte Protein-Interaktion mit NS1 nachgewiesen werden konnte.

Das ICP27 Protein des Herpes Simplex Virus 1 (HSV1) rekrutiert Aly und/oder TAP/NXF1 um virale Transkripte zu exportieren (I.-H. B. Chen u. a. 2005; Hernandez und Sandri-Goldin 2010). Möglicherweise verfolgen Influenza A Viren eine ähnliche Strategie zum Export ihrer Transkripte. Das HIV exportiert seine viralen mRNAs ebenfalls anhand eines viralen Faktors, dem Rev Protein. Es bindet an ein Strukturelement der viralen mRNA und interagiert parallel mit dem zellulären Exportrezeptor Crm1, um den Export zu ermöglichen.

Eine Beteiligung von UAP56 am mRNA Export wird kontrovers diskutiert. Eine unterstützende Funktion von UAP56 an der viralen Replikation durch eine Interaktion mit dem viralen NP Protein wurde bereits 2001 beschrieben (Momose u. a. 2001), jedoch nicht im Hinblick auf einen Einfluss im mRNA Export. Neue Untersuchungen von Read und Kollegen hingegen zeigten, dass ein Knock-down von UAP56 zu einem verminderten Export einiger viraler Transkripte führt (E. K. C. Read und Digard 2010). Auch in anderen Gruppen wurde gezeigt, dass eine Inhibition von UAP56 einen Effekt auf den Transport einiger viraler mRNAs hatte, und dass UAP56 die Entstehung von dsRNA Molekülen unterbindet um einer antiviralen Reaktion der Zelle entgegen zu wirken (Wisskirchen, Ludersdorfer, Müller, Moritz, und Pavlovic 2011a). Studien mit den antiviral-wirkenden Mx-Proteinen postulieren eine Interaktion von Mx-Proteinen mit UAP56 und vermuten dadurch eine Funktion in der antiviralen Aktivität (Wisskirchen, Ludersdorfer, Müller, Moritz, und Pavlovic 2011b). Im zellulären Export von mRNA fungiert UAP56 als Chaperon, welches die mRNA mit Faktoren wie Aly belädt (Taniguchi und Ohno 2008). In diesem Zusammenhang kann eine direkte oder indirekte Beteiligung von UAP56 an der Replikation oder dem Export viraler Transkripte nicht ausgeschlossen werden. Neueste Studien weisen auf eine Crm1- und Rae1-unabhängige Shuttle-Aktivität von UAP56 hin (Thomas u. a. 2011). Rae1 fungiert als Adapterprotein um TAP/NXF1 an mRNA zu rekrutieren. Weiterführende Analysen sind notwendig, um eine Beteiligung von UAP56 am Export viraler mRNAs zu konkretisieren.

4.7 Ausblick

Die Erkenntnisse, die im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der nuklearen Funktion von NS1 erworben wurden, unterstützen die Hypothese einer Beteiligung des NS1 Protein am viralen mRNA Export. Dennoch sind nicht alle Fragen geklärt, die zum Verständnis des mRNA Exports beitragen.

1) Durch Minigenom Assays konnte ein vermehrter Export intronloser und intronhaltiger, nicht-gespleißter viraler mRNA gemessen werden, wenn NS1 und SF2/ASF koexprimiert wurden. Für eine genauere und tiefergehende Analyse des viralen mRNA Exports wäre es von großem Interesse, diese Ergebnisse *in vivo* während einer Infektion zu wiederholen und in einem quantitativen Maßstab durchzuführen. Nur auf diese Weise kann die Bedeutung einer Interaktion von NS1 und SF2/ASF verstanden werden.

2) In Replikationsstudien konnte bereits eine signifikant verminderte Replikation von Influenza A Viren nach siRNA Behandlung gegen das zelluläre Aly Protein nachgewiesen werden. Es wäre notwendig in einem Minigenom Assay auch für Aly zu untersuchen, welche viralen Transkripte möglicherweise vermehrt durch NS1 und Aly exportiert werden. Es wäre vorstellbar, dass unterschiedliche Adapterproteine für unterschiedliche mRNA Spezies - wie intronlose, intronhaltig aber ungespleißt, gespleißt – genutzt werden.

3) Die Untersuchungen dieser Arbeit fanden ausschließlich mit Influenza A Viren statt. Die NS1 Proteine von A und B viren sind nur zu etwa 25% identisch, weisen aber beispielsweise einen ähnlichen N-Terminus auf (A/NS1 1-73; B/NS1 1-93). Erste Hinweise aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Wolff deuten auch auf eine mögliche Beteiligung des B/NS1 Proteins am Export viraler mRNA hin. Weitere Studien sind nötig um zu verstehen, ob Influenza B Viren eventuell eine vergleichbare Strategie wie Influenza A Viren benutzen um ihre virale mRNA zu exportieren.

4) Die Etablierung der YC-NS1 und YN-NS1 exprimierenden Influenza Viren können für intensive Untersuchungen in unterschiedlichen Kontexten genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit dienten die Viren, um die beobachteten Interaktionen in einem *in vivo* Kontext zu untersuchen. Eine Ausweitung eines derartigen Ansatzes in einem life cell imaging Experiment wäre denkbar und könnte zusätzliche Informationen der Interaktionen liefern – beispielsweise über Mobilität und Lokalisation zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion. Desweiteren kann eine Untersuchung des Interaktoms durch massenspektrometische Untersuchungen in Betracht gezogen werden. Dabei wird beispielsweise eine Koimmunpräzipitation durchgeführt und analysiert, welche Proteine spezifisch präzipitierten. Der Vorteil der rekombinanten Viren ist die virale Expression und eben keine Überexpression durch eine Transfektion, welche die Analyse verfälschen könnte.

Weitere Aufschlüsse würden rekombinante Viren geben, die NS1 Proteine exprimieren die durch gezielte Mutagenese nicht mehr mit zellulären Exportproteinen interagieren können. Dazu ist es erst notwendig, die für die Interaktionen verantwortlichen Aminosäuren durch Mutationsanalysen genau zu kartieren. Ist dies geschehen, so können anhand eines reversen

genetischen Systems Viren hergestellt werden, die diese mutierten NS1 Proteine exprimieren. Solche rekombinanten Viren könnten daraufhin auf ihre Replikationsfähigkeit im Vergleich zu Wildtyp Viren untersucht werden um Rückschlüsse auf die Bedeutung der Interaktionen auf den viralen Replikationszyklus zu ziehen. Die Herstellung solcher Viren ist aufgrund der pleiotropen Natur des NS1 Proteins sehr schwierig, da sichergestellt sein muss, dass das mutierte NS1 Protein weiterhin seine anderen Fähigkeiten uneingeschränkt beibehält. Nur dann ist eine spezifische Aussage bezüglich der Interaktion mit den zellulären Exportfaktoren möglich.

5) Die Interaktion der Influenza Viren mit der Wirtszelle sind komplex und bei weitem noch nicht vollständig verstanden. Kürzlich wurde gezeigt, dass die virale Proteine PB1, NP und M1 sumyoliert werden können (Pal u. a. 2011). Bisher gibt es nur Spekulationen, wie sich die Sumyolierung auf die Funktion der Proteine auswirkt. Eines der Proteine, die von der zellulären Sumyolierungsmaschinerie erkannt wird, ist das NS1 Protein (Xu u. a. 2011; Pal u. a. 2011). Interessanterweise wurde ebenfalls für SF2/ASF eine Verbindung zum Sumyolierung-Apparat gezeigt (Pelisch u. a. 2010). Durch die Interaktion von SF2/ASF und dem zellulären Ubc9 wird die Sumoylierung von spezifischen Substraten verstärkt. Desweiteren wird die allgemeine Protein-Sumoylierung durch Interaktion mit der SUMO E3 Ligase PIAS1 (protein inhibitor of activated STAT-1) unterstützt (Pelisch u. a. 2010). Es wäre interessant zu untersuchen, ob SF2/ASF auch im Rahmen einer Influenza Infektion eine Rolle in der Regulation der Sumoylierung übernimmt, und ob diese für den Infektionsverlauf von Bedeutung ist.

Auch mikroRNAs rücken ebenfalls weiter in den Fokus. Die Zielstruktur der mikroRNA-10a und der mikroRNA-10b ist das SF2/ASF Protein, und sie haben somit vermutlich einen Einfluss auf das alternative Spleißen und die Translation (Meseguer u. a. 2011). Desweiteren wurde gezeigt, dass SF2/ASF die Reifung der mikroRNA-7 fördert, und möglicherweise weitere mikroRNAs, wie mikroRNA-221 und mikroRNA-222, kontrollieren kann (H. Wu u. a. 2010). mikroRNAs haben das Interesse vieler Gruppen geweckt und gelangen immer weiter in das Interesse der neuesten Forschung, sei es als Mittel der antiviralen Abwehr (Haasnoot und Berkhout 2011; David 2010), oder als Möglichkeit der Viren die zelluläre Mechanismen zu beeinflussen (Yu Li u. a. 2010). Zelluläre mikroRNAs konnten die Replikation von Influenza Viren negativ beeinträchtigen (Song u. a. 2010; Perez u. a. 2009). Interessanterweise konnte kürzlich ebenfalls gezeigt werden, dass auch Influenza Viren so genannte small viral RNAs (svRNAs) exprimieren (Perez u. a. 2010). Dieses Forschungsgebiet weist jedoch noch viele Fragen auf, und die genauen Interaktionen und Bedeutungen von zellulären und viralen mikroRNAs sind bisher nicht vollständig verstanden. Die Bedeutung von Proteinfaktoren, wie beispielsweise SF2/ASF, wurde in diesen Kontexten bisher nicht adressiert. Durch die Detektion der Interaktion von SF2/ASF mit NS1 ist eine weiterführende Untersuchung auch in dieser Richtung durchaus interessant und kann helfen die komplexen Virus-Wirt Interaktionen weiter aufzuklären.

Weil die NS Proteine für die Replikation der Influenza Viren essentiell sind, stehen sie im Fokus der Entwicklung von lebend-attenuierten Impfstoffen, bzw. antiviralen Medikamenten. Aus einer Sammlung chemischer Stoffe haben Basu und Kollegen in einem Hefe-basierten Assay potentielle Antagonisten identifiziert, die die NS1 Funktion und Influenza Virus Replikation inhibieren (Basu u. a. 2009). Ausgehend von dieser Studie wurde der Inhibitor JJ3297 von Walkiewicz und Kollegen näher charakterisiert. Sie beschreiben, dass die biologische Funktion des Antagonisten auf der Inhibition der Influenza Virus Replikation indem eine Virus-Ausbreitung verhindert wird und ein antiviraler Zustand in der Zelle etabliert wird (Walkiewicz u. a. 2011). Um solche Medikamente herzustellen ist ein tiefgreifendes Verständnis der Funktion der Proteine von großer Bedeutung. Eine umfassende Beschreibung der Funktionen und Biologie beider Proteine, sowie die Aufklärung ihrer mechanistischen Grundlage sind notwendig zum besseren Verständnis und hilfreich für die Entwicklung entsprechender Medikamente. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine aktive Rolle des NS1 Protein im viralen mRNA Export hin. Diese Daten geben profunde und richtungsweisende Grundlagen für eine weitergehende Charakterisierung des Proteins.

5 Zusammenfassung

Influenza Viren verfolgen eine nukleare Replikationsstrategie und benötigen für ihre Vermehrung Komponenten der zellulären RNA-Prozessierungsmaschinerie. Die Transkription viraler mRNAs erfolgt durch den viralen Polymerase Komplex. Nur zwei der zehn viralen Transkripte werden gespleißt und könnten durch eine Assoziation mit dem zellulären Spleißapparat auf gleiche Weise Zugang zu Exportfaktoren erhalten, wie die zumeist intronhaltigen zellulären mRNAs. Die meisten viralen mRNAs hingegen werden nicht gespleißt und werden daher *per se* nur ineffizient von der nuklearen Exportmaschinerie erkannt. Das pleiotrope virale NS1 Protein ist für die Replikation der Influenza Viren von großer Bedeutung. Neben der Funktion als Interferon-Antagonist sind für NS1 in der Literatur auch Wechselwirkungen mit Faktoren der zellulären Exportmaschinerie beschrieben worden, die Bedeutung dieser Aktivitäten ist bisher jedoch nicht verstanden. Fest steht aber, dass Influenza Viren eine Strategie benötigen, um ihre viralen Transkripte in den nuklearen Exportweg der Zelle zu integrieren und eine effiziente Replikation zu gewähren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine potentielle Funktion des viralen NS1 Proteins im Export viraler mRNAs untersucht. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass NS1 mit den Proteinen SF2/ASF und Aly interagiert, die Faktoren des nuklearen TAP/NXF1-mRNA Exportweges sind. Verantwortlich für die Interaktion ist der N-terminale Bereich des NS1 Proteins. Die Untersuchungen zeigten, dass es sich höchstwahrscheinlich um direkte Protein-Protein Interaktionen handelt, die durch Bindung an gleiche RNA Moleküle unterstützt werden. RNA könnte demnach eine stabilisierende Funktion auf diese Virus-Wirts-Interaktionen haben, um den effizienten Ablauf des viralen mRNA Exports zu gewährleisten. Diese Schlussfolgerung wurde durch den Befund gestützt, dass sowohl NS1, als auch SF2/ASF an virale Transkripte binden können. Für Aly wurde diese Fähigkeit vor kurzem von anderen Autoren publiziert. Neben neuesten Ergebnissen, die eine Rolle des TAP/NXF1-vermittelten Exportweges für den viralen mRNA Export vorschlagen, deuten die Daten dieser Arbeit ergänzend auf die aktive Rolle des viralen NS1 Proteins am viralen mRNA Export hin. In dem vorgestellten Modell agiert das NS1 Protein als virales Adapterprotein, um den Export viraler mRNA durch die zelluläre Exportmaschinerie zu ermöglichen. Eine vergleichbare Strategie wird ebenfalls von anderen Viren benutzt, beispielsweise HSV-1 Viren. Mit dieser Arbeit mag die Basis dafür gegeben sein aufbauende und weiterführende Analysen durchzuführen, um mögliche Angriffspunkte einer umfassenden medikamentösen antiviralen Strategie zu erforschen.

6 Summary

Influenza viruses replicate their viral genome in the nucleus of the host cell and therefore depend on functions of the cellular mRNA processing and export machinery for an efficient replication. Transcription of viral mRNAs occurs by the viral polymerase complex, and only two out of ten viral transcripts are spliced and may enter the export pathway via the association with the cellular spliceosome, as it occurs for intron-containing cellular mRNAs. However, most of the viral mRNAs are not spliced and thus are only inefficiently recognized by the cellular export machinery. The pleiotropic viral NS1 protein is a very important replication factor, especially due to its function as interferon antagonist. However, a link to the cellular export pathway has been described in the literature, but the impact of this function has not been revealed in detail. No doubt, influenza viruses are in need of a strategy to integrate viral mRNAs into the cellular export pathway to guarantee an efficient viral replication.

The aim of this study was to investigate a potential role of the NS1 protein in the export of viral mRNAs. The experimental data presented in this study depict for the first time an interaction of the viral NS1 protein and the cellular proteins SF2/ASF and Aly, two components of the nuclear TAP/NXF1-mRNA export pathway. Most likely, this interaction occurs via direct protein-protein binding, which is supported by association to the same RNA molecule. Due to this finding, RNA molecules might have a stabilising function in this virus-host interaction to ensure complete and efficient viral mRNA export. This deductive reasoning was encouraged by data revealing that NS1 and SF2/ASF are able to bind viral mRNAs. In the case of Aly this ability has been published recently. Apart from recently published data that favour the involvement of the TAP/NXF1-mediated export pathway for Influenza Virus mRNA, the results of this study furthermore support an active role of the viral NS1 protein for the export of viral mRNA export. The NS1 protein acts in the proposed model as viral adapter protein to achieve export of viral mRNA via the cellular export pathway. A comparable strategy is also used by other viruses, for example HSV-1. The herewith presented work forms the basis for further constructive and continuative analyses, to investigate potential points of action for a medicinal, antiviral strategy.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
5´-m7G	7-Methylguanindin-Kappe am 5´-Ende der mRNA
A	Adenin
α	Antikörper
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin 5´-triphosphat
BA	Bovines Albumin
bp	Basenpaar
BiFC	bimolekulare Fluoreszenz Komplementation
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
ca.	circa
C-terminal	Carboxyterminal
CTD	C-terminale Domäne
cDNA	kopierte (copy/complementary) DNA
Ci	Curie (1Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Bq)
CIAP	alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (engl.: calf intestine alkaline phosphatase)
CLSM	Konfokales Laser Scan Mikroskop (engl.: confocal laser scanning microscopy)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPSF	cleavage and polyadenylation Faktor 30
Crm1	Exportin-1 (chromosome region maintenance 1)
cRNA	kopierte (copy/complementary) RNA
d	Tag/Tage
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyklo-[2,2,2]-oktan
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DNA	2´-Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxyribonukleotid-triphosphat
ds	Doppelstrang (engl.: double strand)
dsRNA	doppelsträngige RNA

DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EJC	Exon Junction Komplex
engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
G	Guanin
g	Gramm
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (engl.: green fluorescent protein)
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
H ₂ O	Wasser
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSV 1	Humanes Herpes Simplex Virus 1
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.: horseradish peroxidase)
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
ivt	<i>in-vitro</i> -Translation
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalactopyranidose
IRF3	Interferon regulierender Faktor 3
k	Kilo
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
l	Liter
LB	Luria Bertani(-Medium)
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar (mol/l)
M1 und 2	Matrixproteine 1 und 2
mA	Milliampere
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MEM	Minimal Essential Medium

min	Minute
Mock	Blindwert, Negativkontrolle
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	messenger RNA
NA	Neuraminidase
NCR	nicht kodierende Region (engl.: non-coding region)
NEP	nukleares Exportprotein
NES	Kernexportsignal (engl.: nuclear export signal)
NLS	Kernlokalisierungssignal (engl.: nuclear localization signal)
nm	Nanometer
NMD	nonsense mediated decay
NP	Nucleoprotein
NPC	nuklearer Kernporenkomplex (engl.: nuclear pore complex)
NS1 und 2	Nichtstrukturproteine 1 und 2
nt	Nukleotide
N-terminal	Aminoterminal
NXF	nukleare Export Familie
OD	optische Dichte
PA	Polymeraseuntereinheit, azidisch
PABP	Poly(A)-Bindeprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	Polymeraseuntereinheit, basisch
PB1-F2	Produkt des 2. Leserahmens (frame) im PB1-Segment
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PFU	Plaque-bildende Einheit (engl.: plaque forming units)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration (lateinisch: <i>potentia hydrogenii</i>)
<i>p.i.</i>	nach der Infektion (lateinisch: <i>post infectionem</i>)
PKR	dsRNA-abhängige Proteinkinase R
PP	Probenpuffer
RBD	RNA binding domain
RGG	RNA recognition motif
RIG I	Retinoic acid inducible gene I
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRE	Rev recognition motif

rRNA	ribosomale RNA
RS	Arginin/Serin reiche Domäne
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecylsulfat)
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
snRNA	small nuclear RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
Std.	Stunde
ssRNA	einzelsträngige RNA (single stranded RNA)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAP	Tip associated protein
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TBST	Tris Buffered Saline mit Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPCK	(Tosylamido-2-Phenyl)Ethylchloromethylketon
TREX	Transkription/Export Komplex
Trim25	Ring-, Zinkfinger- und coiled-coil (<i>tripartite</i>)-Motiv enthaltendes Protein 25
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxyethoxyethanol
U	Enzymeinheit (engl.: unit)
U	Uracil
ÜN	über Nacht
∞	unendlich
UV	Ultraviolett
V	Volt
vRNA	virale RNA
vRNA	virale Ribonukleoproteine
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein (engl.: yellow fluorescent protein)
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Gln	Glutmaninsäure
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

8 Literaturverzeichnis

- Aguilera, Andrés. 2005. „mRNA processing and genomic instability“. *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (9) (September): 737-738. doi:10.1038/nsmb0905-737.
- Alonso-Caplen, F V, und R M Krug. 1991. „Regulation of the extent of splicing of influenza virus NS1 mRNA: role of the rates of splicing and of the nucleocytoplasmic transport of NS1 mRNA“. *Molecular and Cellular Biology* 11 (2) (Februar): 1092-1098.
- Amorim, Maria-Joao, Eliot K Read, Rosa M Dalton, Liz Medcalf, und Paul Digard. 2007. „Nuclear export of influenza A virus mRNAs requires ongoing RNA polymerase II activity“. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8 (1) (Januar): 1-11. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00507.x.
- Bartkowiak, Bartłomiej, und Arno L Greenleaf. 2011. „Phosphorylation of RNAPII: To P-TEFb or not to P-TEFb?“ *Transcription* 2 (3): 115-119. doi:10.4161/trns.2.3.15004.
- Basu, Dipanwita, Marcin P Walkiewicz, Matthew Frieman, Ralph S Baric, David T Auble, und Daniel A Engel. 2009. „Novel influenza virus NS1 antagonists block replication and restore innate immune function“. *Journal of Virology* 83 (4) (Februar): 1881-1891. doi:10.1128/JVI.01805-08.
- Baudin, F, C Bach, S Cusack, und R W Ruigrok. 1994. „Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent“. *The EMBO Journal* 13 (13) (Juli 1): 3158-3165.
- Bertram, Stephanie, Ilona Glowacka, Paulina Blazejewska, Elizabeth Soilleux, Paul Allen, Simon Danisch, Imke Steffen, u. a. 2010. „TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells“. *Journal of Virology* 84 (19) (Oktober): 10016-10025. doi:10.1128/JVI.00239-10.
- Bertram, Stephanie, Ilona Glowacka, Imke Steffen, Annika Kühn, und Stefan Pöhlmann. 2010. „Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin“. *Reviews in Medical Virology* 20 (5) (September): 298-310. doi:10.1002/rmv.657.
- Bier, Katja, Ashley York, und Ervin Fodor. 2011. „Cellular cap-binding proteins associate with influenza virus mRNAs“. *The Journal of General Virology* 92 (Pt 7) (Juli): 1627-1634. doi:10.1099/vir.0.029231-0.
- Biswas, S K, und D P Nayak. 1994. „Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1“. *Journal of Virology* 68 (3) (März): 1819-1826.
- Blaustein, Matías, Leandro Quadrana, Guillermo Risso, Manuel de la Mata, Federico Pelisch, und Anabella Srebrow. 2009. „SF2/ASF regulates proteomic diversity by affecting the balance between translation initiation mechanisms“. *Journal of Cellular Biochemistry* 107 (4) (Juli 1): 826-833. doi:10.1002/jcb.22181.
- Bourgeois, Cyril F, Fabrice Lejeune, und James Stévenin. 2004. „Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA“. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 78: 37-88. doi:10.1016/S0079-6603(04)78002-2.
- Boyne, James R, und Adrian Whitehouse. 2006. „Nucleolar trafficking is essential for nuclear export of intronless herpesvirus mRNA“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (41) (Oktober 10): 15190-15195. doi:10.1073/pnas.0604890103.
- Bray, M, S Prasad, J W Dubay, E Hunter, K T Jeang, D Rekosh, und M L Hammariskjöld. 1994. „A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (4) (Februar 15): 1256-1260.
- Brede, Gaute, Jorun Solheim, und Hans Prydz. 2002. „PSKH1, a novel splice factor compartment-associated serine kinase“. *Nucleic Acids Research* 30 (23) (Dezember 1): 5301-5309.
- Brown, Jill M, Joanne Green, Ricardo Pires das Neves, Helen A C Wallace, Andrew J H Smith, Jim Hughes, Nicki Gray, u. a. 2008. „Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment“. *The Journal of Cell Biology* 182 (6) (September 22): 1083-1097. doi:10.1083/jcb.200803174.
- Bruce, Emily A, Liz Medcalf, Colin M Crump, Sarah L Noton, Amanda D Stuart, Helen M Wise, Debra Elton, Katherine Bowers, und Paul Digard. 2009. „Budding of filamentous and non-filamentous influenza A virus occurs via a VPS4 and VPS28-independent pathway“. *Virology* 390 (2) (August 1): 268-278. doi:10.1016/j.virol.2009.05.016.

-
- Bullock, Alex N, Sanjan Das, Judit E Debreczeni, Peter Rellos, Oleg Fedorov, Frank H Niesen, Kunde Guo, u. a. 2009. „Kinase domain insertions define distinct roles of CLK kinases in SR protein phosphorylation“. *Structure (London, England: 1993)* 17 (3) (März 11): 352-362. doi:10.1016/j.str.2008.12.023.
- Bullough, P A, F M Hughson, J J Skehel, und D C Wiley. 1994. „Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion“. *Nature* 371 (6492) (September 1): 37-43. doi:10.1038/371037a0.
- Buratowski, Stephen. 2009. „Progression through the RNA polymerase II CTD cycle“. *Molecular Cell* 36 (4) (November 25): 541-546. doi:10.1016/j.molcel.2009.10.019.
- Bussey, Kendra A, Tatiana L Bousse, Emily A Desmet, Baek Kim, und Toru Takimoto. 2010. „PB2 residue 271 plays a key role in enhanced polymerase activity of influenza A viruses in mammalian host cells“. *Journal of Virology* 84 (9) (Mai): 4395-4406. doi:10.1128/JVI.02642-09.
- Cáceres, J F, T Misteli, G R Sreaton, D L Spector, und A R Krainer. 1997. „Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity“. *The Journal of Cell Biology* 138 (2) (Juli 28): 225-238.
- Cao, W, S F Jamison, und M A Garcia-Blanco. 1997. „Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro“. *RNA (New York, N.Y.)* 3 (12) (Dezember): 1456-1467.
- Carmo-Fonseca, M, R Pepperkok, B S Sproat, W Ansorge, M S Swanson, und A I Lamond. 1991. „In vivo detection of snRNP-rich organelles in the nuclei of mammalian cells“. *The EMBO Journal* 10 (7) (Juli): 1863-1873.
- Cazalla, Demian, Jun Zhu, Lisa Manche, Elisabeth Huber, Adrian R Krainer, und Javier F Cáceres. 2002. „Nuclear export and retention signals in the RS domain of SR proteins“. *Molecular and Cellular Biology* 22 (19) (Oktober): 6871-6882.
- Chang, Lynne, William J Godinez, Il-Han Kim, Marco Tektonidis, Primal de Lanerolle, Roland Eils, Karl Rohr, und David M Knipe. 2011. „Herpesviral replication compartments move and coalesce at nuclear speckles to enhance export of viral late mRNA“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (21) (Mai 24): E136-144. doi:10.1073/pnas.1103411108.
- Chen, Benjamin J, George P Leser, David Jackson, und Robert A Lamb. 2008. „The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding“. *Journal of Virology* 82 (20) (Oktober): 10059-10070. doi:10.1128/JVI.01184-08.
- Chen, Benjamin J, George P Leser, Eiji Morita, und Robert A Lamb. 2007. „Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles“. *Journal of Virology* 81 (13) (Juli): 7111-7123. doi:10.1128/JVI.00361-07.
- Chen, I-Hsiung Brandon, Ling Li, Lindsey Silva, und Rozanne M Sandri-Goldin. 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“. *Journal of Virology* 79 (7) (April): 3949-3961. doi:10.1128/JVI.79.7.3949-3961.2005.
- Chen, I-Hsiung Brandon, Kathryn S Sciabica, und Rozanne M Sandri-Goldin. 2002. „ICP27 interacts with the RNA export factor Aly/REF to direct herpes simplex virus type 1 intronless mRNAs to the TAP export pathway“. *Journal of Virology* 76 (24) (Dezember): 12877-12889.
- Chen, W, P A Calvo, D Malide, J Gibbs, U Schubert, I Bacik, S Basta, u. a. 2001. „A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death“. *Nature Medicine* 7 (12) (Dezember): 1306-1312. doi:10.1038/nm1201-1306.
- Chen, Z, Y Li, und R M Krug. 1999. „Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery“. *The EMBO Journal* 18 (8) (April 15): 2273-2283. doi:10.1093/emboj/18.8.2273.
- Cheng, Hong, Kobina Dufu, Chung-Sheng Lee, Jeanne L Hsu, Anusha Dias, und Robin Reed. 2006. „Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA“. *Cell* 127 (7) (Dezember 29): 1389-1400. doi:10.1016/j.cell.2006.10.044.
- Choi, So-Young, Stephanie Bertram, Ilona Glowacka, Young Woo Park, und Stefan Pöhlmann. 2009. „Type II transmembrane serine proteases in cancer and viral infections“. *Trends in Molecular Medicine* 15 (7) (Juli): 303-312. doi:10.1016/j.molmed.2009.05.003.

-
- CHOPPIN, P W, J S MURPHY, und I TAMM. 1960. „Studies of two kinds of virus particles which comprise influenza A2 virus strains. III. Morphological characteristics: independence to morphological and functional traits“. *The Journal of Experimental Medicine* 112 (November 1): 945-952.
- Chuang, Tzu-Wei, Pey-Jey Peng, und Woan-Yuh Tarn. 2011. „The exon junction complex component Y14 modulates the activity of the methylosome in biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins“. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (11) (März 18): 8722-8728. doi:10.1074/jbc.M110.190587.
- Colwill, K, T Pawson, B Andrews, J Prasad, J L Manley, J C Bell, und P I Duncan. 1996. „The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution“. *The EMBO Journal* 15 (2) (Januar 15): 265-275.
- Compans, R W, J Content, und P H Duesberg. 1972. „Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus“. *Journal of Virology* 10 (4) (Oktober): 795-800.
- Conenello, Gina M, und Peter Palese. 2007. „Influenza A virus PB1-F2: a small protein with a big punch“. *Cell Host & Microbe* 2 (4) (Oktober 11): 207-209. doi:10.1016/j.chom.2007.09.010.
- Conenello, Gina M, Dmitriy Zamarin, Lucy A Perrone, Terrence Tumpey, und Peter Palese. 2007. „A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence“. *PLoS Pathogens* 3 (10) (Oktober 5): 1414-1421. doi:10.1371/journal.ppat.0030141.
- Connor, R J, Y Kawaoka, R G Webster, und J C Paulson. 1994. „Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates“. *Virology* 205 (1) (November 15): 17-23. doi:10.1006/viro.1994.1615.
- Cullen, Bryan R. 2003. „Nuclear mRNA export: insights from virology“. *Trends in Biochemical Sciences* 28 (8) (August): 419-424.
- David, Michael. 2010. „Interferons and microRNAs“. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 30 (11) (November): 825-828. doi:10.1089/jir.2010.0080.
- DAVIES, W L, R R GRUNERT, R F HAFF, J W MCGAHEN, E M NEUMAYER, M PAULSHOCK, J C WATTS, T R WOOD, E C HERMANN, und C E HOFFMANN. 1964. „ANTIVIRAL ACTIVITY OF 1-ADAMANTANAMINE (AMANTADINE)“. *Science (New York, N.Y.)* 144 (Mai 15): 862-863.
- Degot, Sébastien, Hervé Le Hir, Fabien Alpy, Valérie Kedinger, Isabelle Stoll, Corinne Wendling, Bertrand Seraphin, Marie-Christine Rio, und Catherine Tomasetto. 2004. „Association of the breast cancer protein MLN51 with the exon junction complex via its speckle localizer and RNA binding module“. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (32) (August 6): 33702-33715. doi:10.1074/jbc.M402754200.
- Deo, R C, J B Bonanno, N Sonenberg, und S K Burley. 1999. „Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein“. *Cell* 98 (6) (September 17): 835-845.
- Desselberger, U, V R Racaniello, J J Zazra, und P Palese. 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 (3) (Februar): 315-328.
- Dias, Alexandre, Denis Bouvier, Thibaut Crépin, Andrew A McCarthy, Darren J Hart, Florence Baudin, Stephen Cusack, und Rob W H Ruigrok. 2009. „The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit“. *Nature* 458 (7240) (April 16): 914-918. doi:10.1038/nature07745.
- Dias, Anusha P, Kobina Dufu, Haixin Lei, und Robin Reed. 2010. „A role for TREX components in the release of spliced mRNA from nuclear speckle domains“. *Nature Communications* 1: 97. doi:10.1038/ncomms1103.
- Digard, P, V C Blok, und S C Inglis. 1989. „Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes“. *Virology* 171 (1) (Juli): 162-169.
- Egorov, A, S Brandt, S Sereinig, J Romanova, B Ferko, D Katinger, A Grassauer, G Alexandrova, H Katinger, und T Muster. 1998. „Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells“. *Journal of Virology* 72 (8) (August): 6437-6441.
- Elton, D, M Simpson-Holley, K Archer, L Medcalf, R Hallam, J McCauley, und P Digard. 2001. „Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway“. *Journal of Virology* 75 (1) (Januar): 408-419. doi:10.1128/JVI.75.1.408-419.2001.

-
- Engelhardt, Othmar G, Matt Smith, und Ervin Fodor. 2005. „Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II“. *Journal of Virology* 79 (9) (Mai): 5812-5818. doi:10.1128/JVI.79.9.5812-5818.2005.
- Fagerlund, Riku, Leena Kinnunen, Matthias Köhler, Ilkka Julkunen, und Krister Melén. 2005. „NF- κ B is transported into the nucleus by importin α 3 and importin α 4“. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (16) (April 22): 15942-15951. doi:10.1074/jbc.M500814200.
- Fechter, Pierre, Louise Mingay, Jane Sharps, Anna Chambers, Ervin Fodor, und George G Brownlee. 2003. „Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding“. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (22) (Mai 30): 20381-20388. doi:10.1074/jbc.M300130200.
- Fischer, U, J Huber, W C Boelens, I W Mattaj, und R Lührmann. 1995. „The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs“. *Cell* 82 (3) (August 11): 475-483.
- Flick, R, G Neumann, E Hoffmann, E Neumeier, und G Hobom. 1996. „Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure“. *RNA (New York, N. Y.)* 2 (10) (Oktober): 1046-1057.
- Fodor, Ervin, und Matt Smith. 2004. „The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex“. *Journal of Virology* 78 (17) (September): 9144-9153. doi:10.1128/JVI.78.17.9144-9153.2004.
- Fortes, P, A Beloso, und J Ortín. 1994. „Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport“. *The EMBO Journal* 13 (3) (Februar 1): 704-712.
- Gack, Michaela Ulrike, Randy Allen Albrecht, Tomohiko Urano, Kyung-Soo Inn, I-Chueh Huang, Elena Carnero, Michael Farzan, Satoshi Inoue, Jae Ung Jung, und Adolfo García-Sastre. 2009. „Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I“. *Cell Host & Microbe* 5 (5) (Mai 8): 439-449. doi:10.1016/j.chom.2009.04.006.
- Gallie, D R. 1991. „The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency“. *Genes & Development* 5 (11) (November): 2108-2116.
- Gao, Yuwei, Ying Zhang, Kyoko Shinya, Guohua Deng, Yongping Jiang, Zejun Li, Yuntao Guan, u. a. 2009. „Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host“. *PLoS Pathogens* 5 (12) (Dezember): e1000709. doi:10.1371/journal.ppat.1000709.
- Garaigorta, Urtzi, Ana M Falcón, und Juan Ortín. 2005. „Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles“. *Journal of Virology* 79 (24) (Dezember): 15246-15257. doi:10.1128/JVI.79.24.15246-15257.2005.
- Garaigorta, Urtzi, und Juan Ortín. 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 Research* 35 (14): 4573-4582. doi:10.1093/nar/gkm230.
- García-Sastre, A, A Egorov, D Matassov, S Brandt, D E Levy, J E Durbin, P Palese, und T Muster. 1998. „Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems“. *Virology* 252 (2) (Dezember 20): 324-330.
- Gatfield, D, H Le Hir, C Schmitt, I C Braun, T Köcher, M Wilm, und E Izaurralde. 2001. „The DEXH/D box protein HEL/UAP56 is essential for mRNA nuclear export in Drosophila“. *Current Biology: CB* 11 (21) (Oktober 30): 1716-1721.
- Ghosh, Indraneel, Andrew D. Hamilton, und Lynne Regan. 2000. „Antiparallel Leucine Zipper-Directed Protein Reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein“. *Journal of the American Chemical Society* 122 (23) (Juni 1): 5658-5659. doi:10.1021/ja994421w.
- Gibbs, James S, Daniela Malide, Felicita Hornung, Jack R Bennis, und Jonathan W Yewdell. 2003. „The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function“. *Journal of Virology* 77 (13) (Juli): 7214-7224.
- Gómez-Puertas, P, C Albo, E Pérez-Pastrana, A Vivo, und A Portela. 2000. „Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding“. *Journal of Virology* 74 (24) (Dezember): 11538-11547.
- Greenspan, D, P Palese, und M Krystal. 1988. „Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein“. *Journal of Virology* 62 (8) (August): 3020-3026.

-
- Grüter, P, C Tabernero, C von Kobbe, C Schmitt, C Saavedra, A Bachi, M Wilm, B K Felber, und E Izaurralde. 1998. „TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus“. *Molecular Cell* 1 (5) (April): 649-659.
- Haasnoot, Joost, und Ben Berkhout. 2011. „RNAi and cellular miRNAs in infections by mammalian viruses“. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 721: 23-41. doi:10.1007/978-1-61779-037-9_2.
- Hagopian, Jonathan C, Chen-Ting Ma, Bryan R Meade, Claudio P Albuquerque, Jacky Chi Ki Ngo, Gourisankar Ghosh, Patricia A Jennings, Xiang-Dong Fu, und Joseph A Adams. 2008. „Adaptable molecular interactions guide phosphorylation of the SR protein ASF/SF2 by SRPK1“. *Journal of Molecular Biology* 382 (4) (Oktober 17): 894-909. doi:10.1016/j.jmb.2008.07.055.
- Hale, Benjamin G, Ian H Batty, C Peter Downes, und Richard E Randall. 2008. „Binding of influenza A virus NS1 protein to the inter-SH2 domain of p85 suggests a novel mechanism for phosphoinositide 3-kinase activation“. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (3) (Januar 18): 1372-1380. doi:10.1074/jbc.M708862200.
- Hale, Benjamin G, Richard E Randall, Juan Ortín, und David Jackson. 2008. „The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses“. *The Journal of General Virology* 89 (Pt 10) (Oktober): 2359-2376. doi:10.1099/vir.0.2008/004606-0.
- Hall, Lisa L, Kelly P Smith, Meg Byron, und Jeanne B Lawrence. 2006. „Molecular anatomy of a speckle“. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 288 (7) (Juli): 664-675. doi:10.1002/ar.a.20336.
- Handwerker, Korie E, und Joseph G Gall. 2006. „Subnuclear organelles: new insights into form and function“. *Trends in Cell Biology* 16 (1) (Januar): 19-26. doi:10.1016/j.tcb.2005.11.005.
- Hao, Linhui, Akira Sakurai, Tokiko Watanabe, Ericka Sorensen, Chairul A Nidom, Michael A Newton, Paul Ahlquist, und Yoshihiro Kawaoka. 2008. „Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication“. *Nature* 454 (7206) (August 14): 890-893. doi:10.1038/nature07151.
- Hargous, Yann, Guillaume M Hautbergue, Aura M Tintaru, Lenka Skrisovska, Alexander P Golovanov, James Stevenin, Lu-Yun Lian, Stuart A Wilson, und Frédéric H-T Allain. 2006. „Molecular basis of RNA recognition and TAP binding by the SR proteins SRp20 and 9G8“. *The EMBO Journal* 25 (21) (November 1): 5126-5137. doi:10.1038/sj.emboj.7601385.
- Hatada, E, T Takizawa, und R Fukuda. 1992. „Specific binding of influenza A virus NS1 protein to the virus minus-sense RNA in vitro“. *The Journal of General Virology* 73 (Pt 1) (Januar): 17-25.
- Hatada, E, und R Fukuda. 1992. „Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro“. *The Journal of General Virology* 73 (Pt 12) (Dezember): 3325-3329.
- Hatta, M, P Gao, P Halfmann, und Y Kawaoka. 2001. „Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses“. *Science (New York, N.Y.)* 293 (5536) (September 7): 1840-1842. doi:10.1126/science.1062882.
- Hautbergue, Guillaume M, Ming-Lung Hung, Alexander P Golovanov, Lu-Yun Lian, und Stuart A Wilson. 2008. „Mutually exclusive interactions drive handover of mRNA from export adaptors to TAP“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (13) (April 1): 5154-5159. doi:10.1073/pnas.0709167105.
- Hay, A J, A J Wolstenholme, J J Skehel, und M H Smith. 1985. „The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine“. *The EMBO Journal* 4 (11) (November): 3021-3024.
- Helenius, A. 1992a. „Unpacking the incoming influenza virus“. *Cell* 69 (4) (Mai 15): 577-578.
- . 1992b. „Unpacking the incoming influenza virus“. *Cell* 69 (4) (Mai 15): 577-578.
- Hemerka, Joseph N, Dan Wang, Yuejin Weng, Wuxun Lu, Radhey S Kaushik, Jing Jin, Aaron F Harmon, und Feng Li. 2009. „Detection and characterization of influenza A virus PA-PB2 interaction through a bimolecular fluorescence complementation assay“. *Journal of Virology* 83 (8) (April): 3944-3955. doi:10.1128/JVI.02300-08.
- Hernandez, Felicia P, und Rozanne M Sandri-Goldin. 2010. „Head-to-tail intramolecular interaction of herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 is important for its interaction with cellular mRNA export receptor TAP/NXF1“. *mBio* 1 (5). doi:10.1128/mBio.00268-10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21060739>.
- Le Hir, Hervé, und Gregers Rom Andersen. 2008. „Structural insights into the exon junction complex“. *Current Opinion in Structural Biology* 18 (1) (Februar): 112-119. doi:10.1016/j.sbi.2007.11.002.

-
- Hirst, G K. 1941. „THE AGGLUTINATION OF RED CELLS BY ALLANTOIC FLUID OF CHICK EMBRYOS INFECTED WITH INFLUENZA VIRUS“. *Science (New York, N.Y.)* 94 (2427) (Juli 4): 22-23. doi:10.1126/science.94.2427.22.
- Holland, J, K Spindler, F Horodyski, E Grabau, S Nichol, und S VandePol. 1982. „Rapid evolution of RNA genomes“. *Science (New York, N.Y.)* 215 (4540) (März 26): 1577-1585.
- Holt, Ian, Saloni Mittal, Denis Furling, Gillian S Butler-Browne, J David Brook, und Glenn E Morris. 2007. „Defective mRNA in myotonic dystrophy accumulates at the periphery of nuclear splicing speckles“. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 12 (9) (September): 1035-1048. doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01112.x.
- Honda, A, K Ueda, K Nagata, und A Ishihama. 1988. „RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation“. *Journal of Biochemistry* 104 (6) (Dezember): 1021-1026.
- Hu, Chang-Deng, Yurii Chinenov, und Tom K Kerppola. 2002. „Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation“. *Molecular Cell* 9 (4) (April): 789-798.
- Huang, S, T J Deerinck, M H Ellisman, und D L Spector. 1994. „In vivo analysis of the stability and transport of nuclear poly(A)⁺ RNA“. *The Journal of Cell Biology* 126 (4) (August): 877-899.
- Huang, X, T Liu, J Muller, R A Levandowski, und Z Ye. 2001. „Effect of influenza virus matrix protein and viral RNA on ribonucleoprotein formation and nuclear export“. *Virology* 287 (2) (September 1): 405-416. doi:10.1006/viro.2001.1067.
- Huang, Y, und J A Steitz. 2001. „Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA“. *Molecular Cell* 7 (4) (April): 899-905.
- Huang, Yingqun, Renata Gattoni, James Stévenin, und Joan A Steitz. 2003. „SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export“. *Molecular Cell* 11 (3) (März): 837-843.
- Huang, Yingqun, Therese A Yario, und Joan A Steitz. 2004. „A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (26) (Juni 29): 9666-9670. doi:10.1073/pnas.0403533101.
- Huarte, Maite, Ana Falcón, Yuri Nakaya, Juan Ortín, Adolfo García-Sastre, und Amelia Nieto. 2003. „Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses“. *Journal of Virology* 77 (10) (Mai): 6007-6013.
- Hung, Ming-Lung, Guillaume M Hautbergue, Ambrosius P L Snijders, Mark J Dickman, und Stuart A Wilson. 2010. „Arginine methylation of REF/ALY promotes efficient handover of mRNA to TAP/NXF1“. *Nucleic Acids Research* 38 (10) (Juni): 3351-3361. doi:10.1093/nar/gkq033.
- Iglesias, Nahid, und Françoise Stutz. 2008. „Regulation of mRNP dynamics along the export pathway“. *FEBS Letters* 582 (14) (Juni 18): 1987-1996. doi:10.1016/j.febslet.2008.03.038.
- Johnson, C, D Primorac, M McKinsty, J McNeil, D Rowe, und J B Lawrence. 2000. „Tracking COL1A1 RNA in osteogenesis imperfecta. splice-defective transcripts initiate transport from the gene but are retained within the SC35 domain“. *The Journal of Cell Biology* 150 (3) (August 7): 417-432.
- Johnson, Lisa A, und Rozanne M Sandri-Goldin. 2009. „Efficient nuclear export of herpes simplex virus 1 transcripts requires both RNA binding by ICP27 and ICP27 interaction with TAP/NXF1“. *Journal of Virology* 83 (3) (Februar): 1184-1192. doi:10.1128/JVI.02010-08.
- Johnson, Lisa A., Ling Li, und Rozanne M. Sandri-Goldin. 2009. „The Cellular RNA Export Receptor TAP/NXF1 Is Required for ICP27-Mediated Export of Herpes Simplex Virus 1 RNA, but the TREX Complex Adaptor Protein Aly/REF Appears To Be Dispensable“. *Journal of Virology* 83 (13) (Juli): 6335-6346. doi:10.1128/JVI.00375-09.
- Jung, Tanis E, und George G Brownlee. 2006. „A new promoter-binding site in the PB1 subunit of the influenza A virus polymerase“. *The Journal of General Virology* 87 (Pt 3) (März): 679-688. doi:10.1099/vir.0.81453-0.
- Kapadia, Fehmida, Anne Pryor, Tien-Hsien Chang, und Lee F Johnson. 2006. „Nuclear localization of poly(A)⁺ mRNA following siRNA reduction of expression of the mammalian RNA helicases UAP56 and URH49“. *Gene* 384 (Dezember 15): 37-44. doi:10.1016/j.gene.2006.07.010.
- Katahira, J, K Strässer, A Podtelejnikov, M Mann, J U Jung, und E Hurt. 1999. „The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human“. *The EMBO Journal* 18 (9) (Mai 4): 2593-2609. doi:10.1093/emboj/18.9.2593.

-
- Katahira, Jun, Hitomi Inoue, Ed Hurt, und Yoshihiro Yoneda. 2009. „Adaptor Aly and co-adaptor Thoc5 function in the Tap-p15-mediated nuclear export of HSP70 mRNA“. *The EMBO Journal* 28 (5) (März 4): 556-567. doi:10.1038/emboj.2009.5.
- Kataoka, N, M D Diem, V N Kim, J Yong, und G Dreyfuss. 2001. „Magoh, a human homolog of *Drosophila mago nashi* protein, is a component of the splicing-dependent exon-exon junction complex“. *The EMBO Journal* 20 (22) (November 15): 6424-6433. doi:10.1093/emboj/20.22.6424.
- KATES, M, A C ALLISON, D A TYRELL, und A T JAMES. 1962. „Origin of lipids in influenza virus“. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 27: 293-301.
- Kawaguchi, Atsushi, Tadasuke Naito, und Kyosuke Nagata. 2005. „Involvement of influenza virus PA subunit in assembly of functional RNA polymerase complexes“. *Journal of Virology* 79 (2) (Januar): 732-744. doi:10.1128/JVI.79.2.732-744.2005.
- Keller, W, und L Minvielle-Sebastia. 1997. „A comparison of mammalian and yeast pre-mRNA 3'-end processing“. *Current Opinion in Cell Biology* 9 (3) (Juni): 329-336.
- Kerppola, Tom K. 2006. „Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells“. *Nature Protocols* 1 (3): 1278-1286. doi:10.1038/nprot.2006.201.
- Kim, Dong-Joon, Bermseok Oh, und Young-Youl Kim. 2009. „Splicing factor ASF/SF2 and transcription factor PPAR-gamma cooperate to directly regulate transcription of uncoupling protein-3“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378 (4) (Januar 23): 877-882. doi:10.1016/j.bbrc.2008.12.009.
- Kim, Hyunmin, Benjamin Erickson, Weifei Luo, David Seward, Joel H Graber, David D Pollock, Paul C Megee, und David L Bentley. 2010. „Gene-specific RNA polymerase II phosphorylation and the CTD code“. *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (10) (Oktober): 1279-1286. doi:10.1038/nsmb.1913.
- Kim, V N, und G Dreyfuss. 2001. „Nuclear mRNA binding proteins couple pre-mRNA splicing and post-splicing events“. *Molecules and Cells* 12 (1) (August 31): 1-10.
- Kimura, Tominori, Iwao Hashimoto, Masao Nishikawa, und Hisao Yamada. 2009. „Nucleocytoplasmic transport of luciferase gene mRNA requires CRM1/Exportin1 and RanGTPase“. *Medical Molecular Morphology* 42 (2) (Juni): 70-81. doi:10.1007/s00795-009-0441-3.
- Kimura, Tominori, Iwao Hashimoto, Mikio Nishizawa, Seiji Ito, und Hisao Yamada. 2010. „Novel cis-active structures in the coding region mediate CRM1-dependent nuclear export of IFN- α 1 mRNA“. *Medical Molecular Morphology* 43 (3) (September): 145-157. doi:10.1007/s00795-010-0492-5.
- Klumpp, K, R W Ruigrok, und F Baudin. 1997. „Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure“. *The EMBO Journal* 16 (6) (März 17): 1248-1257. doi:10.1093/emboj/16.6.1248.
- Ko, T K, E Kelly, und J Pines. 2001. „CrkRS: a novel conserved Cdc2-related protein kinase that colocalises with SC35 speckles“. *Journal of Cell Science* 114 (Pt 14) (Juli): 2591-2603.
- Kochs, Georg, Adolfo García-Sastre, und Luis Martínez-Sobrido. 2007. „Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein“. *Journal of Virology* 81 (13) (Juli): 7011-7021. doi:10.1128/JVI.02581-06.
- Koffa, Maria D., J.Barklie Clements, Elisa Izaurralde, Sarah Wadd, Stuart A. Wilson, Iain W. Mattaj, und Scott Kuersten. 2001. „Herpes simplex virus ICP27 protein provides viral mRNAs with access to the cellular mRNA export pathway“. *The EMBO Journal* 20 (20) (Oktober 15): 5769-5778. doi:10.1093/emboj/20.20.5769.
- Köhler, Alwin, und Ed Hurt. 2007. „Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm“. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (10) (Oktober): 761-773. doi:10.1038/nrm2255.
- Koizumi, J, Y Okamoto, H Onogi, A Mayeda, A R Krainer, und M Hagiwara. 1999. „The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs)“. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (16) (April 16): 11125-11131.
- Koroleva, O A, G Calder, A F Pendle, S H Kim, D Lewandowska, C G Simpson, I M Jones, J W S Brown, und P J Shaw. 2009. „Dynamic behavior of Arabidopsis eIF4A-III, putative core protein of exon junction complex: fast relocation to nucleolus and splicing speckles under hypoxia“. *The Plant Cell* 21 (5) (Mai): 1592-1606. doi:10.1105/tpc.108.060434.

-
- Kota, Krishna P, Stefan R Wagner, Elvira Huerta, Jean M Underwood, und Jeffrey A Nickerson. 2008. „Binding of ATP to UAP56 is necessary for mRNA export“. *Journal of Cell Science* 121 (Pt 9) (Mai 1): 1526-1537. doi:10.1242/jcs.021055.
- Kowalska-Loth, Barbara, Agnieszka Girstun, Agata M Trzcińska, Agnieszka Piekietko-Witkowska, und Krzysztof Staroń. 2005. „SF2/ASF protein binds to the cap region of human topoisomerase I through two RRM domains“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331 (2) (Juni 3): 398-403. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.180.
- Kronemann, Daniel, Stacy R Hagemeyer, Dan Cygnar, Stacia Phillips, und Wade A Bresnahan. 2010. „Binding of the human cytomegalovirus (HCMV) tegument protein UL69 to UAP56/URH49 is not required for efficient replication of HCMV“. *Journal of Virology* 84 (18) (September): 9649-9654. doi:10.1128/JVI.00669-10.
- Kuo, Rei-Lin, und Robert M Krug. 2009. „Influenza A virus polymerase is an integral component of the CPSF30-NS1A protein complex in infected cells“. *Journal of Virology* 83 (4) (Februar): 1611-1616. doi:10.1128/JVI.01491-08.
- Kutay, Ulrike, und Vikram Govind Panse. 2008. „Gle1 does double duty“. *Cell* 134 (4) (August 22): 564-566. doi:10.1016/j.cell.2008.08.009.
- Lai, Ming-Chih, und Woan-Yuh Tarn. 2004. „Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins“. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (30) (Juli 23): 31745-31749. doi:10.1074/jbc.C400173200.
- Lamb, R A, P W Choppin, R M Chanock, und C J Lai. 1980. „Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (4) (April): 1857-1861.
- Lamb, R A, und P W Choppin. 1983. „The gene structure and replication of influenza virus“. *Annual Review of Biochemistry* 52: 467-506. doi:10.1146/annurev.bi.52.070183.002343.
- Lamb, R A, und C J Lai. 1980. „Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus“. *Cell* 21 (2) (September): 475-485.
- Lamb, R A, S L Zebedee, und C D Richardson. 1985. „Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface“. *Cell* 40 (3) (März): 627-633.
- Lamond, Angus I, und David L Spector. 2003. „Nuclear speckles: a model for nuclear organelles“. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (8) (August): 605-612. doi:10.1038/nrm1172.
- Li, Xialu, und James L Manley. 2005. „Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability“. *Cell* 122 (3) (August 12): 365-378. doi:10.1016/j.cell.2005.06.008.
- Li, Yu, Eric Y Chan, Jiangning Li, Chester Ni, Xinxia Peng, Elizabeth Rosenzweig, Terrence M Tumpey, und Michael G Katze. 2010. „MicroRNA expression and virulence in pandemic influenza virus-infected mice“. *Journal of Virology* 84 (6) (März): 3023-3032. doi:10.1128/JVI.02203-09.
- Lin, Dongzi, Jingfang Lan, und Zhizhen Zhang. 2007. „Structure and function of the NS1 protein of influenza A virus“. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 39 (3) (März): 155-162.
- Lischka, Peter, Zsolt Toth, Marco Thomas, Regina Mueller, und Thomas Stamminger. 2006. „The UL69 transactivator protein of human cytomegalovirus interacts with DEXD/H-Box RNA helicase UAP56 to promote cytoplasmic accumulation of unspliced RNA“. *Molecular and Cellular Biology* 26 (5) (März): 1631-1643. doi:10.1128/MCB.26.5.1631-1643.2006.
- Ludwig, S, U Vogel, und C Scholtissek. 1995. „Amino acid replacements leading to temperature-sensitive defects of the NS1 protein of influenza A virus“. *Archives of Virology* 140 (5): 945-950.
- Ludwig, Stephan, Xiuyan Wang, Christina Ehrhardt, Hongyong Zheng, Nicola Donelan, Oliver Planz, Stephan Pleschka, Adolfo García-Sastre, Gudrun Heins, und Thorsten Wolff. 2002. „The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors“. *Journal of Virology* 76 (21) (November): 11166-11171.
- Luna, Rosa, Hélène Gaillard, Cristina González-Aguilera, und Andrés Aguilera. 2008. „Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus“. *Chromosoma* 117 (4) (August): 319-331. doi:10.1007/s00412-008-0158-4.
- Luo, G X, W Luytjes, M Enami, und P Palese. 1991. „The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure“. *Journal of Virology* 65 (6) (Juni): 2861-2867.

-
- Luo, M L, Z Zhou, K Magni, C Christoforides, J Rappsilber, M Mann, und R Reed. 2001. „Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly“. *Nature* 413 (6856) (Oktober 11): 644-647. doi:10.1038/35098106.
- Ma, Chen-Ting, Adolfo Velazquez-Dones, Jonathan C Hagopian, Gourisankar Ghosh, Xiang-Dong Fu, und Joseph A Adams. 2008. „Ordered multi-site phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 by SRPK1“. *Journal of Molecular Biology* 376 (1) (Februar 8): 55-68. doi:10.1016/j.jmb.2007.08.029.
- Ma, K, A M Roy, und G R Whittaker. 2001. „Nuclear export of influenza virus ribonucleoproteins: identification of an export intermediate at the nuclear periphery“. *Virology* 282 (2) (April 10): 215-220. doi:10.1006/viro.2001.0833.
- Malim, M H, J Hauber, S Y Le, J V Maizel, und B R Cullen. 1989. „The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA“. *Nature* 338 (6212) (März 16): 254-257. doi:10.1038/338254a0.
- Maniatis, Tom, und Robin Reed. 2002. „An extensive network of coupling among gene expression machines“. *Nature* 416 (6880) (April 4): 499-506. doi:10.1038/416499a.
- Manicassamy, Balaji, Santhakumar Manicassamy, Alan Belicha-Villanueva, Giuseppe Pisanelli, Bali Pulendran, und Adolfo García-Sastre. 2010. „Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (25) (Juni 22): 11531-11536. doi:10.1073/pnas.0914994107.
- Marión, R M, T Zürcher, S de la Luna, und J Ortín. 1997. „Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo“. *The Journal of General Virology* 78 (Pt 10) (Oktober): 2447-2451.
- Martin, K, und A Helenius. 1991. „Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import“. *Cell* 67 (1) (Oktober 4): 117-130.
- Martín-Benito, J, E Area, J Ortega, O Llorca, J M Valpuesta, J L Carrascosa, und J Ortín. 2001. „Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle“. *EMBO Reports* 2 (4) (April): 313-317. doi:10.1093/embo-reports/kve063.
- Masuda, Seiji, Rita Das, Hong Cheng, Ed Hurt, Nijsje Dorman, und Robin Reed. 2005. „Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing“. *Genes & Development* 19 (13) (Juli 1): 1512-1517. doi:10.1101/gad.1302205.
- Masuyama, Kaoru, Ichiro Taniguchi, Katsuya Okawa, und Mutsuhito Ohno. 2007. „Factors associated with a purine-rich exonic splicing enhancer sequence in *Xenopus* oocyte nucleus“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 359 (3) (August 3): 580-585. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.144.
- de la Mata, Manuel, Claudio R Alonso, Sebastián Kadener, Juan P Fededa, Matías Blaustein, Federico Pelisch, Paula Cramer, David Bentley, und Alberto R Kornblihtt. 2003. „A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo“. *Molecular Cell* 12 (2) (August): 525-532.
- Matera, A Gregory, und Karl B Shpargel. 2006. „Pumping RNA: nuclear bodybuilding along the RNP pipeline“. *Current Opinion in Cell Biology* 18 (3) (Juni): 317-324. doi:10.1016/j.ceb.2006.03.005.
- Matlin, K S, H Reggio, A Helenius, und K Simons. 1981. „Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line“. *The Journal of Cell Biology* 91 (3 Pt 1) (Dezember): 601-613.
- McAuley, Julie L, Felicita Hornung, Kelli L Boyd, Amber M Smith, Raelene McKeon, Jack Bennink, Jonathan W Yewdell, und Jonathan A McCullers. 2007. „Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia“. *Cell Host & Microbe* 2 (4) (Oktober 11): 240-249. doi:10.1016/j.chom.2007.09.001.
- Meinhart, Anton, Tomislav Kamenski, Sabine Hoepfner, Sonja Baumli, und Patrick Cramer. 2005. „A structural perspective of CTD function“. *Genes & Development* 19 (12) (Juni 15): 1401-1415. doi:10.1101/gad.1318105.
- Melén, Krister, Leena Kinnunen, Riku Fagerlund, Niina Ikonen, Karen Y Twu, Robert M Krug, und Ilkka Julkunen. 2007. „Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes“. *Journal of Virology* 81 (11) (Juni): 5995-6006. doi:10.1128/JVI.01714-06.
- Meseguer, Salvador, Giridhar Mudduluru, Juan Manuel Escamilla, Heike Allgayer, und Domingo Baretino. 2011. „MicroRNAs-10a and -10b contribute to retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells and target the alternative splicing regulatory factor SFRS1 (SF2/ASF)“. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (6) (Februar 11): 4150-4164. doi:10.1074/jbc.M110.167817.

-
- Mibayashi, Masaki, Luis Martínez-Sobrido, Yueh-Ming Loo, Washington B Cárdenas, Michael Gale Jr, und Adolfo García-Sastre. 2007. „Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus“. *Journal of Virology* 81 (2) (Januar): 514-524. doi:10.1128/JVI.01265-06.
- Michlewski, Gracjan, Jeremy R Sanford, und Javier F Cáceres. 2008. „The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1“. *Molecular Cell* 30 (2) (April 25): 179-189. doi:10.1016/j.molcel.2008.03.013.
- Midoux, Patrick, Chantal Pichon, Jean-Jacques Yaouanc, und Paul-Alain Jaffrès. 2009. „Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers“. *British Journal of Pharmacology* 157 (2) (Mai): 166-178. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00288.x.
- Min, Ji-Young, Shoudong Li, Ganes C Sen, und Robert M Krug. 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 (1) (Juni 20): 236-243. doi:10.1016/j.virol.2007.01.038.
- Mintz, P J, und D L Spector. 2000. „Compartmentalization of RNA processing factors within nuclear speckles“. *Journal of Structural Biology* 129 (2-3) (April): 241-251. doi:10.1006/jsbi.2000.4213.
- Momose, F, C F Basler, R E O'Neill, A Iwamatsu, P Palese, und K Nagata. 2001. „Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis“. *Journal of Virology* 75 (4) (Februar): 1899-1908. doi:10.1128/JVI.75.4.1899-1908.2001.
- Moore, Melissa J, und Nick J Proudfoot. 2009. „Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation“. *Cell* 136 (4) (Februar 20): 688-700. doi:10.1016/j.cell.2009.02.001.
- Mukaigawa, J, und D P Nayak. 1991. „Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2“. *Journal of Virology* 65 (1) (Januar): 245-253.
- Nakagawa, Y, N Kimura, T Toyoda, K Mizumoto, A Ishihama, K Oda, und S Nakada. 1995. „The RNA polymerase PB2 subunit is not required for replication of the influenza virus genome but is involved in capped mRNA synthesis“. *Journal of Virology* 69 (2) (Februar): 728-733.
- Nath, S T, und D P Nayak. 1990. „Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1 N1)“. *Molecular and Cellular Biology* 10 (8) (August): 4139-4145.
- Nemeroff, M E, S M Barabino, Y Li, W Keller, und R M Krug. 1998. „Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs“. *Molecular Cell* 1 (7) (Juni): 991-1000.
- Neumann, G, G G Brownlee, E Fodor, und Y Kawaoka. 2004. „Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation“. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 283: 121-143.
- Neumann, G, M T Hughes, und Y Kawaoka. 2000. „Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1“. *The EMBO Journal* 19 (24) (Dezember 15): 6751-6758. doi:10.1093/emboj/19.24.6751.
- Newby, Celeste M, Leah Sabin, und Andrew Pekosz. 2007. „The RNA binding domain of influenza A virus NS1 protein affects secretion of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interferon in primary murine tracheal epithelial cells“. *Journal of Virology* 81 (17) (September): 9469-9480. doi:10.1128/JVI.00989-07.
- Ngo, Jacky Chi Ki, Kayla Giang, Sutapa Chakrabarti, Chen-Ting Ma, Nhat Huynh, Jonathan C Hagopian, Pieter C Dorrestein, Xiang-Dong Fu, Joseph A Adams, und Gourisankar Ghosh. 2008. „A sliding docking interaction is essential for sequential and processive phosphorylation of an SR protein by SRPK1“. *Molecular Cell* 29 (5) (März 14): 563-576. doi:10.1016/j.molcel.2007.12.017.
- Nieto, A, S de la Luna, J Bárcena, A Portela, J Valcárcel, J A Melero, und J Ortín. 1992. „Nuclear transport of influenza virus polymerase PA protein“. *Virus Research* 24 (1) (Juni): 65-75.
- Noda, Takeshi, Hiroshi Sagara, Albert Yen, Ayato Takada, Hiroshi Kida, R Holland Cheng, und Yoshihiro Kawaoka. 2006. „Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles“. *Nature* 439 (7075) (Januar 26): 490-492. doi:10.1038/nature04378.
- Nojima, Takayuki, Tetsuro Hirose, Hiroshi Kimura, und Masatoshi Hagiwara. 2007. „The interaction between cap-binding complex and RNA export factor is required for intronless mRNA export“. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (21) (Mai 25): 15645-15651. doi:10.1074/jbc.M700629200.

-
- O'Keefe, R T, A Mayeda, C L Sadowski, A R Krainer, und D L Spector. 1994. „Disruption of pre-mRNA splicing in vivo results in reorganization of splicing factors“. *The Journal of Cell Biology* 124 (3) (Februar): 249-260.
- O'Neill, Robert E., Julie Talon, und Peter Palese. 1998. „The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins“. *EMBO J* 17 (1) (Januar 1): 288-296. doi:10.1093/emboj/17.1.288.
- Ogg, Stephen C, und Angus I Lamond. 2002. „Cajal bodies and coilin--moving towards function“. *The Journal of Cell Biology* 159 (1) (Oktober 14): 17-21. doi:10.1083/jcb.200206111.
- Opitz, Bastian, Amira Rejaibi, Bianca Dauber, Jamina Eckhard, Maya Vinzing, Bernd Schmeck, Stefan Hippenstiel, Norbert Suttrop, und Thorsten Wolff. 2007. „IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein“. *Cellular Microbiology* 9 (4) (April): 930-938. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00841.x.
- Ortega, J, J Martín-Benito, T Zürcher, J M Valpuesta, J L Carrascosa, und J Ortín. 2000. „Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification“. *Journal of Virology* 74 (1) (Januar): 156-163.
- Pal, Sangita, Andres Santos, Juan M Rosas, Joshua Ortiz-Guzman, und Germán Rosas-Acosta. 2011. „Influenza A virus interacts extensively with the cellular SUMOylation system during infection“. *Virus Research* 158 (1-2) (Juni): 12-27. doi:10.1016/j.virusres.2011.02.017.
- Palancade, Benoît, und Olivier Bensaude. 2003. „Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation“. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 270 (19) (Oktober): 3859-3870.
- Palese, P, K Tobita, M Ueda, und R W Compans. 1974. „Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase“. *Virology* 61 (2) (Oktober): 397-410.
- Palese, P, und J F Young. 1982. „Variation of influenza A, B, and C viruses“. *Science (New York, N. Y.)* 215 (4539) (März 19): 1468-1474.
- Palese, P., und M. Shaw. 2007. *Fields Virology*. 5. Aufl. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Pelisch, Federico, Juan Gerez, Jimena Druker, Ignacio E Schor, Manuel J Muñoz, Guillermo Risso, Ezequiel Petrillo, u. a. 2010. „The serine/arginine-rich protein SF2/ASF regulates protein sumoylation“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (37) (September 14): 16119-16124. doi:10.1073/pnas.1004653107.
- Perez, Jasmine T, Alissa M Pham, Maria H Lorini, Mark A Chua, John Steel, und Benjamin R tenOever. 2009. „MicroRNA-mediated species-specific attenuation of influenza A virus“. *Nature Biotechnology* 27 (6) (Juni): 572-576. doi:10.1038/nbt.1542.
- Perez, Jasmine T, Andrew Varble, Ravi Sachidanandam, Ivan Zlatev, Muthiah Manoharan, Adolfo García-Sastre, und Benjamin R tenOever. 2010. „Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (25) (Juni 22): 11525-11530. doi:10.1073/pnas.1001984107.
- Pichlmair, Andreas, Oliver Schulz, Choon Ping Tan, Tanja I Näslund, Peter Liljeström, Friedemann Weber, und Caetano Reis e Sousa. 2006. „RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates“. *Science (New York, N. Y.)* 314 (5801) (November 10): 997-1001. doi:10.1126/science.1132998.
- Pinto, L H, L J Holsinger, und R A Lamb. 1992. „Influenza virus M2 protein has ion channel activity“. *Cell* 69 (3) (Mai 1): 517-528.
- Portela, Agustín, und Paul Digard. 2002. „The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication“. *The Journal of General Virology* 83 (Pt 4) (April): 723-734.
- Proudfoot, N. 2000. „Connecting transcription to messenger RNA processing“. *Trends in Biochemical Sciences* 25 (6) (Juni): 290-293.
- Qiu, Y, M Nemeroff, und R M Krug. 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 (New York, N. Y.)* 1 (3) (Mai): 304-316.
- Qiu, Y, und R M Krug. 1994. „The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A)“. *Journal of Virology* 68 (4) (April): 2425-2432.

-
- Read, Eliot K C, und Paul Digard. 2010. „Individual influenza A virus mRNAs show differential dependence on cellular NXF1/TAP for their nuclear export“. *The Journal of General Virology* 91 (Pt 5) (Mai): 1290-1301. doi:10.1099/vir.0.018564-0.
- Reed, Robin, und Ed Hurt. 2002. „A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing“. *Cell* 108 (4) (Februar 22): 523-531.
- Richardson, J C, und R K Akkina. 1991. „NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells“. *Archives of Virology* 116 (1-4): 69-80.
- Robb, Nicole C, David Jackson, Frank T Vreede, und Ervin Fodor. 2010. „Splicing of influenza A virus NS1 mRNA is independent of the viral NS1 protein“. *The Journal of General Virology* 91 (Pt 9) (September): 2331-2340. doi:10.1099/vir.0.022004-0.
- Robb, Nicole C, Matt Smith, Frank T Vreede, und Ervin Fodor. 2009. „NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome“. *The Journal of General Virology* 90 (Pt 6) (Juni): 1398-1407. doi:10.1099/vir.0.009639-0.
- Rodriguez, A, A Pérez-González, und A Nieto. 2007. „Influenza virus infection causes specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II“. *Journal of Virology* 81 (10) (Mai): 5315-5324. doi:10.1128/JVI.02129-06.
- Rondón, Ana G, Sonia Jimeno, und Andrés Aguilera. 2010. „The interface between transcription and mRNP export: from THO to THSC/TREX-2“. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1799 (8) (August): 533-538. doi:10.1016/j.bbagr.2010.06.002.
- Rougemaille, Mathieu, Tommaso Villa, Rajani Kanth Gudipati, und Domenico Libri. 2008. „mRNA journey to the cytoplasm: attire required“. *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 100 (6) (Juni): 327-342. doi:10.1042/BC20070143.
- Ruigrok, R W, A Barge, P Durrer, J Brunner, K Ma, und G R Whittaker. 2000. „Membrane interaction of influenza virus M1 protein“. *Virology* 267 (2) (Februar 15): 289-298. doi:10.1006/viro.1999.0134.
- Sacco-Bubulya, Paula, und David L Spector. 2002. „Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing“. *The Journal of Cell Biology* 156 (3) (Februar 4): 425-436. doi:10.1083/jcb.200107017.
- Saitoh, Noriko, Chris S Spahr, Scott D Patterson, Paula Bubulya, Andrew F Neuwald, und David L Spector. 2004. „Proteomic analysis of interchromatin granule clusters“. *Molecular Biology of the Cell* 15 (8) (August): 3876-3890. doi:10.1091/mbc.E04-03-0253.
- Sandri-Goldin, Rozanne M. 2008. „The many roles of the regulatory protein ICP27 during herpes simplex virus infection“. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13: 5241-5256.
- Sanford, Jeremy R, Jonathan D Ellis, Demian Cazalla, und Javier F Cáceres. 2005. „Reversible phosphorylation differentially affects nuclear and cytoplasmic functions of splicing factor 2/alternative splicing factor“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (42) (Oktober 18): 15042-15047. doi:10.1073/pnas.0507827102.
- Sanger, F, S Nicklen, und A R Coulson. 1977. „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12) (Dezember): 5463-5467.
- Sato, Hanae, Nao Hosoda, und Lynne E Maquat. 2008. „Efficiency of the pioneer round of translation affects the cellular site of nonsense-mediated mRNA decay“. *Molecular Cell* 29 (2) (Februar 1): 255-262. doi:10.1016/j.molcel.2007.12.009.
- Satterly, Neal, Pei-Ling Tsai, Jan van Deursen, Daniel R Nussenzveig, Yaming Wang, Paula A Faria, Agata Levay, David E Levy, und Beatriz M A Fontoura. 2007. „Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (6) (Februar 6): 1853-1858. doi:10.1073/pnas.0610977104.
- Schmidt, Ute, Kang-Bin Im, Carola Benzing, Snjezana Janjetovic, Karsten Rippe, Peter Lichter, und Malte Wachsmuth. 2009a. „Assembly and mobility of exon-exon junction complexes in living cells“. *RNA (New York, N.Y.)* 15 (5) (Mai): 862-876. doi:10.1261/rna.1387009.
- . 2009b. „Assembly and mobility of exon-exon junction complexes in living cells“. *RNA (New York, N.Y.)* 15 (5) (Mai): 862-876. doi:10.1261/rna.1387009.
- Schmidt, Ute, Karsten Richter, Axel Bernhard Berger, und Peter Lichter. 2006. „In vivo BiFC analysis of Y14 and NXF1 mRNA export complexes: preferential localization within and around SC35 domains“. *The Journal of Cell Biology* 172 (3) (Januar 30): 373-381. doi:10.1083/jcb.200503061.

-
- Schneider, Jana, und Thorsten Wolff. 2009. „Nuclear functions of the influenza A and B viruses NS1 proteins: do they play a role in viral mRNA export?“ *Vaccine* 27 (45) (Oktober 23): 6312-6316. doi:10.1016/j.vaccine.2009.01.015.
- Schnell, Jason R, und James J Chou. 2008. „Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus“. *Nature* 451 (7178) (Januar 31): 591-595. doi:10.1038/nature06531.
- Shih, S R, und R M Krug. 1996. „Novel exploitation of a nuclear function by influenza virus: the cellular SF2/ASF splicing factor controls the amount of the essential viral M2 ion channel protein in infected cells“. *The EMBO Journal* 15 (19) (Oktober 1): 5415-5427.
- Shopland, Lindsay S, Carol V Johnson, Meg Byron, John McNeil, und Jeanne B Lawrence. 2003. „Clustering of multiple specific genes and gene-rich R-bands around SC-35 domains: evidence for local euchromatic neighborhoods“. *The Journal of Cell Biology* 162 (6) (September 15): 981-990. doi:10.1083/jcb.200303131.
- Sinha, Rahul, Eric Allemand, Zuo Zhang, Rotem Karni, Michael P Myers, und Adrian R Krainer. 2010. „Arginine methylation controls the subcellular localization and functions of the oncoprotein splicing factor SF2/ASF“. *Molecular and Cellular Biology* 30 (11) (Juni): 2762-2774. doi:10.1128/MCB.01270.09.
- Skehel, J J, und D C Wiley. 2000. „Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin“. *Annual Review of Biochemistry* 69: 531-569. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.531.
- Skorko, R, D F Summers, und J M Galarza. 1991. „Influenza A virus in vitro transcription: roles of NS1 and NP proteins in regulating RNA synthesis“. *Virology* 180 (2) (Februar): 668-677.
- Sleeman, J, C E Lyon, M Platani, J P Kreivi, und A I Lamond. 1998. „Dynamic interactions between splicing snRNPs, coiled bodies and nucleoli revealed using snRNP protein fusions to the green fluorescent protein“. *Experimental Cell Research* 243 (2) (September 15): 290-304. doi:10.1006/excr.1998.4135.
- Smith, Kelly P, Meg Byron, Carol Johnson, Yigong Xing, und Jeanne B Lawrence. 2007. „Defining early steps in mRNA transport: mutant mRNA in myotonic dystrophy type I is blocked at entry into SC-35 domains“. *The Journal of Cell Biology* 178 (6) (September 10): 951-964. doi:10.1083/jcb.200706048.
- Song, Liping, He Liu, Shijuan Gao, Wei Jiang, und Wenlin Huang. 2010. „Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells“. *Journal of Virology* 84 (17) (September): 8849-8860. doi:10.1128/JVI.00456-10.
- Spector, D L, X D Fu, und T Maniatis. 1991. „Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus“. *The EMBO Journal* 10 (11) (November): 3467-3481.
- Spector, David L, und Angus I Lamond. 2011. „Nuclear speckles“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (2) (Februar). doi:10.1101/cshperspect.a000646. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20926517>.
- Steel, John, Anice C Lowen, Samira Mubareka, und Peter Palese. 2009. „Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N“. *PLoS Pathogens* 5 (1) (Januar): e1000252. doi:10.1371/journal.ppat.1000252.
- Steinhauer, D A, und J J Holland. 1987. „Rapid evolution of RNA viruses“. *Annual Review of Microbiology* 41: 409-433. doi:10.1146/annurev.mi.41.100187.002205.
- Stewart, Murray. 2010. „Nuclear export of mRNA“. *Trends in Biochemical Sciences* 35 (11) (November): 609-617. doi:10.1016/j.tibs.2010.07.001.
- Strässer, Katja, Seiji Masuda, Paul Mason, Jens Pfannstiel, Marisa Oppizzi, Susana Rodriguez-Navarro, Ana G Rondón, u. a. 2002. „TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export“. *Nature* 417 (6886) (Mai 16): 304-308. doi:10.1038/nature746.
- Stutz, F, A Bachi, T Doerks, I C Braun, B Séraphin, M Wilm, P Bork, und E Izaurralde. 2000. „REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export“. *RNA (New York, N. Y.)* 6 (4) (April): 638-650.
- Subbarao, E K, W London, und B R Murphy. 1993. „A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range“. *Journal of Virology* 67 (4) (April): 1761-1764.
- Sugrue, R J, und A J Hay. 1991. „Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel“. *Virology* 180 (2) (Februar): 617-624.

-
- Takizawa, Takumi, Karen J Meaburn, und Tom Misteli. 2008. „The meaning of gene positioning“. *Cell* 135 (1) (Oktober 3): 9-13. doi:10.1016/j.cell.2008.09.026.
- Taniguchi, Ichiro, und Mutsuhito Ohno. 2008. „ATP-dependent recruitment of export factor Aly/REF onto intronless mRNAs by RNA helicase UAP56“. *Molecular and Cellular Biology* 28 (2) (Januar): 601-608. doi:10.1128/MCB.01341-07.
- Thomas, Marco, Peter Lischka, Regina Müller, und Thomas Stamminger. 2011. „The cellular DExD/H-box RNA-helicases UAP56 and URH49 exhibit a CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling activity“. *PloS One* 6 (7): e22671. doi:10.1371/journal.pone.0022671.
- Tintaru, Aura M, Guillaume M Hautbergue, Andrea M Hounslow, Ming-Lung Hung, Lu-Yun Lian, C Jeremy Craven, und Stuart A Wilson. 2007. „Structural and functional analysis of RNA and TAP binding to SF2/ASF“. *EMBO Reports* 8 (8) (August): 756-762. doi:10.1038/sj.embor.7401031.
- Toth, Zsolt, und Thomas Stamminger. 2008. „The human cytomegalovirus regulatory protein UL69 and its effect on mRNA export“. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13: 2939-2949.
- Trinkle-Mulcahy, L, P Ajuh, A Prescott, F Claverie-Martin, S Cohen, A I Lamond, und P Cohen. 1999. „Nuclear organisation of NIPP1, a regulatory subunit of protein phosphatase 1 that associates with pre-mRNA splicing factors“. *Journal of Cell Science* 112 (Pt 2) (Januar): 157-168.
- Trinkle-Mulcahy, L, J E Sleeman, und A I Lamond. 2001. „Dynamic targeting of protein phosphatase 1 within the nuclei of living mammalian cells“. *Journal of Cell Science* 114 (Pt 23) (Dezember): 4219-4228.
- Tunncliffe, Richard B, Guillaume M Hautbergue, Priti Kalra, Brian R Jackson, Adrian Whitehouse, Stuart A Wilson, und Alexander P Golovanov. 2011a. „Structural basis for the recognition of cellular mRNA export factor REF by herpes viral proteins HSV-1 ICP27 and HVS ORF57“. *PLoS Pathogens* 7 (1): e1001244. doi:10.1371/journal.ppat.1001244.
- . 2011b. „Structural basis for the recognition of cellular mRNA export factor REF by herpes viral proteins HSV-1 ICP27 and HVS ORF57“. *PLoS Pathogens* 7 (1): e1001244. doi:10.1371/journal.ppat.1001244.
- Uhrig, Joachim F, Tomas Canto, David Marshall, und Stuart A MacFarlane. 2004. „Relocalization of nuclear ALY proteins to the cytoplasm by the tomato bushy stunt virus P19 pathogenicity protein“. *Plant Physiology* 135 (4) (August): 2411-2423. doi:10.1104/pp.104.046086.
- Valencia, Patricia, Anusha P Dias, und Robin Reed. 2008. „Splicing promotes rapid and efficient mRNA export in mammalian cells“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (9) (März 4): 3386-3391. doi:10.1073/pnas.0800250105.
- Vreede, Frank T, und Ervin Fodor. 2010. „The role of the influenza virus RNA polymerase in host shut-off“ 1 (5): 436-439. doi:10.4161/viru.1.5.12967.
- Walkiewicz, Marcin P, Dipanwita Basu, Joseph J Jablonski, H Mario Geysen, und Daniel A Engel. 2011. „Novel inhibitor of influenza non-structural protein 1 blocks multi-cycle replication in an RNase L-dependent manner“. *The Journal of General Virology* 92 (Pt 1) (Januar): 60-70. doi:10.1099/vir.0.025015-0.
- Wang, W, K Riedel, P Lynch, C Y Chien, G T Montelione, und R M Krug. 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 (New York, N.Y.)* 5 (2) (Februar): 195-205.
- Wang, Wei, Zong-Qiang Cui, Han Han, Zhi-Ping Zhang, Hong-Ping Wei, Ya-Feng Zhou, Ze Chen, und Xian-En Zhang. 2008. „Imaging and characterizing influenza A virus mRNA transport in living cells“. *Nucleic Acids Research* 36 (15) (September): 4913-4928. doi:10.1093/nar/gkn475.
- Wang, Xiuyan, Christopher F Basler, Bryan R G Williams, Robert H Silverman, Peter Palese, und Adolfo Garcia-Sastre. 2002. „Functional replacement of the carboxy-terminal two-thirds of the influenza A virus NS1 protein with short heterologous dimerization domains“. *Journal of Virology* 76 (24) (Dezember): 12951-12962.
- Wang, Zefeng, Xinshu Xiao, Eric Van Nostrand, und Christopher B Burge. 2006. „General and specific functions of exonic splicing silencers in splicing control“. *Molecular Cell* 23 (1) (Juli 7): 61-70. doi:10.1016/j.molcel.2006.05.018.
- Ward, A C, L A Castelli, A C Lucantoni, J F White, A A Azad, und I G Macreadie. 1995. „Expression and analysis of the NS2 protein of influenza A virus“. *Archives of Virology* 140 (11): 2067-2073.

-
- Watanabe, K, N Takizawa, M Katoh, K Hoshida, N Kobayashi, und K Nagata. 2001. „Inhibition of nuclear export of ribonucleoprotein complexes of influenza virus by leptomycin B“. *Virus Research* 77 (1) (September): 31-42.
- Watanabe, M, M Fukuda, M Yoshida, M Yanagida, und E Nishida. 1999. „Involvement of CRM1, a nuclear export receptor, in mRNA export in mammalian cells and fission yeast“. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 4 (5) (Mai): 291-297.
- Whittaker, G R, M Kann, und A Helenius. 2000. „Viral entry into the nucleus“. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16: 627-651. doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.627.
- Wise, Helen M, Agnes Foeglein, Jiechao Sun, Rosa Maria Dalton, Sheetal Patel, Wendy Howard, Emma C Anderson, Wendy S Barclay, und Paul Digard. 2009. „A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA“. *Journal of Virology* 83 (16) (August): 8021-8031. doi:10.1128/JVI.00826-09.
- Wisskirchen, Christian, Thomas H Ludersdorfer, Dominik A Müller, Eva Moritz, und Jovan Pavlovic. 2011a. „The Cellular RNA Helicase UAP56 Is Required for Prevention of Double-Stranded RNA Formation during Influenza A Virus Infection“. *Journal of Virology* 85 (17) (September): 8646-8655. doi:10.1128/JVI.02559-10.
- . 2011b. „Interferon-induced Antiviral Protein MxA Interacts with the Cellular RNA Helicases UAP56 and URH49“. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (40) (Oktober 7): 34743-34751. doi:10.1074/jbc.M111.251843.
- Wolff, Thorsten, Florian Zielecki, Marion Abt, Daniel Voss, Ilia Semmler, und Markus Matthaei. 2008. „Sabotage of antiviral signaling and effectors by influenza viruses“. *Biological Chemistry* 389 (10) (Oktober): 1299-1305. doi:10.1515/BC.2008.146.
- Wright, P.F., und R.G. Webster. 2007. *Fields Virology*. 5. Aufl. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Wu, Han, Shuying Sun, Kang Tu, Yuan Gao, Bin Xie, Adrian R Krainer, und Jun Zhu. 2010. „A splicing-independent function of SF2/ASF in microRNA processing“. *Molecular Cell* 38 (1) (April 9): 67-77. doi:10.1016/j.molcel.2010.02.021.
- Wu, Winco W H, Ying-Hua B Sun, und Nelly Panté. 2007. „Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein“. *Virology Journal* 4: 49. doi:10.1186/1743-422X-4-49.
- Xu, Ke, Christoph Klenk, Bin Liu, Bjoern Keiner, Jinke Cheng, Bo-Jian Zheng, Li Li, u. a. 2011. „Modification of nonstructural protein 1 of influenza A virus by SUMO1“. *Journal of Virology* 85 (2) (Januar): 1086-1098. doi:10.1128/JVI.00877-10.
- Yasuda, J, S Nakada, A Kato, T Toyoda, und A Ishihama. 1993. „Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix“. *Virology* 196 (1) (September): 249-255. doi:10.1006/viro.1993.1473.
- Yatherajam, Gayatri, Wenying Huang, und S J Flint. 2011. „Export of adenoviral late mRNA from the nucleus requires the Nxf1/Tap export receptor“. *Journal of Virology* 85 (4) (Februar): 1429-1438. doi:10.1128/JVI.02108-10.
- Ye, Qiaozhen, Robert M Krug, und Yizhi Jane Tao. 2006. „The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA“. *Nature* 444 (7122) (Dezember 21): 1078-1082. doi:10.1038/nature05379.
- Yeakley, J M, H Tronchère, J Olesen, J A Dyck, H Y Wang, und X D Fu. 1999. „Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors“. *The Journal of Cell Biology* 145 (3) (Mai 3): 447-455.
- Yuan, Puwei, Mark Bartlam, Zhiyong Lou, Shoudeng Chen, Jie Zhou, Xiaojing He, Zongyang Lv, u. a. 2009. „Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site“. *Nature* 458 (7240) (April 16): 909-913. doi:10.1038/nature07720.
- Zamarin, Dmitriy, Adolfo García-Sastre, Xiaoyao Xiao, Rong Wang, und Peter Palese. 2005. „Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1“. *PLoS Pathogens* 1 (1) (September): e4. doi:10.1371/journal.ppat.0010004.
- Zamarin, Dmitriy, Mila B Ortigoza, und Peter Palese. 2006. „Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice“. *Journal of Virology* 80 (16) (August): 7976-7983. doi:10.1128/JVI.00415-06.

-
- Zeng, C, E Kim, S L Warren, und S M Berget. 1997. „Dynamic relocation of transcription and splicing factors dependent upon transcriptional activity“. *The EMBO Journal* 16 (6) (März 17): 1401-1412. doi:10.1093/emboj/16.6.1401.
- Zenklusen, D, P Vinciguerra, Y Strahm, und F Stutz. 2001. „The yeast hnRNP-Like proteins Yra1p and Yra2p participate in mRNA export through interaction with Mex67p“. *Molecular and Cellular Biology* 21 (13) (Juli): 4219-4232. doi:10.1128/MCB.21.13.4219-4232.2001.
- Zhang, J, und R A Lamb. 1996. „Characterization of the membrane association of the influenza virus matrix protein in living cells“. *Virology* 225 (2) (November 15): 255-266. doi:10.1006/viro.1996.0599.
- Zhang, Xiaohui, Kathleen A Merkler, und Mark P McLean. 2008. „Characterization of regulatory intronic and exonic sequences involved in alternative splicing of scavenger receptor class B gene“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 372 (1) (Juli 18): 173-178. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.007.
- Zhao, Rui, Megan S Bodnar, und David L Spector. 2009. „Nuclear neighborhoods and gene expression“. *Current Opinion in Genetics & Development* 19 (2) (April): 172-179. doi:10.1016/j.gde.2009.02.007.
- Zhong, Xiang-Yang, Pingping Wang, Joonhee Han, Michael G Rosenfeld, und Xiang-Dong Fu. 2009. „SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation“. *Molecular Cell* 35 (1) (Juli 10): 1-10. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.016.
- Zhou, Z, M J Luo, K Straesser, J Katahira, E Hurt, und R Reed. 2000. „The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans“. *Nature* 407 (6802) (September 21): 401-405. doi:10.1038/35030160.
- Zielke, Barbara, Marco Thomas, Antje Giede-Jeppe, Regina Müller, und Thomas Stamminger. 2011. „Characterization of the betaherpesviral pUL69 protein family reveals binding of the cellular mRNA export factor UAP56 as a prerequisite for stimulation of nuclear mRNA export and for efficient viral replication“. *Journal of Virology* 85 (4) (Februar): 1804-1819. doi:10.1128/JVI.01347-10.
- Zuo, P, und J L Manley. 1993. „Functional domains of the human splicing factor ASF/SF2“. *The EMBO Journal* 12 (12) (Dezember): 4727-4737.



Anhang

Veröffentlichungen

Publikationen

Franz, M, Wolff, T. Novel interactions of Influenza A Virus non-structural protein 1 (NS1) and a potential role in viral mRNA export.

in preparation

Skalska, L. *, White, R.E. *, Franz, M., Ruhmann, M., Allday, M.J. (2010) Epigenetic repression of *p16/INK4A* by latent Epstein-Barr virus requires the interaction of EBNA3A and EBNA3C with CtBP. PLOS Pathogens, 6(6).

*contributed equally

Vorträge

Franz, M and Wolff, T.: Getting it out: Potential role of influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) in viral mRNA export. Annual Retreat of ZIBI Graduate School (GRK 1121); Potsdam, Germany: 2011

Franz, M and Wolff, T.: Getting it out: Potential role of influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) in viral mRNA export. National Symposium on Zoonoses Research; Berlin, Germany: 2010

Franz, M and Wolff, T.: A Role of influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) in viral mRNA export? 4th European Congress of Virology; Cernobbio, Como Lake, Italy: 2010

Franz, M and Wolff, T.: A role for influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) in viral mRNA export? Annual Retreat of ZIBI Graduate School (GRK 1121); Berlin-Woltersdorf, Germany: 2010

Franz, M and Wolff, T.: A role for influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) in viral mRNA export? 8th Workshop of the Study Group "Cell Biology of Viral Infections" of the German Society for Virology; Deidesheim, Germany: 2009

Franz, M and Wolff, T.: Analysis of influenza virus interactions with cellular transport proteins using bimolecular fluorescence complementation (BiFC); Annual Retreat of ZIBI Graduate School (GRK 1121); Dresden, Germany: 2008

Poster

Ayllon, J., Manicassamy, B., Hale, B.G., Sánchez-Aparicio, M.T., Franz, M., Wolff, T. and García-Sastre, A.: A bimolecular fluorescence complementation assay to study specific influenza virus NS1 interactions. Influenza Congress USA; Washington, D.C., USA: 2010

Franz, M and Wolff, T.: Getting it out: Potential role of influenza A virus non-structural protein1 (NS1) in viral mRNA export. 2nd International Influenza Meeting; Münster, Germany: 2010

Franz, M and Wolff, T.: Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with the mRNA export factors Aly and SF2/ASF. 14th International Conference on Negative Strand Viruses; Bruges, Belgium: 2010

Franz, M and Wolff, T.: A role for influenza virus A non-structural protein (NS) 1 in viral mRNA export? 5th Orthomyxovirus Research Conference; Freiburg: 2009

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht
enthalten.



Eidesstattliche Erklärung

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

„Charakterisierung einer potentiellen Rolle des Nicht-Strukturproteins (NS) 1 der Influenza A Viren im viralen mRNA Export“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die Arbeit wurde bisher noch nicht anderweitig als Dissertation eingereicht oder veröffentlicht.

Berlin, den 20.01.2012

Melanie Franz

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben. In erster Linie bedanke ich mich bei PD Dr. Thorsten Wolff für die Betreuung dieser Arbeit, die wissenschaftlich interessanten Diskussionen und seine Unterstützung während der Arbeit.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe FG17: Andrea und Gu für die Unterstützung und Hilfestellungen zu jeder Zeit, sowohl fachlich als auch persönlich. Anne, Jessica, Katharina, Matthias, Rocio, Sandra, Tina und Viola, sowie die ehemaligen Mitglieder Daniel, Florian, Jana, Marion und Markus für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, hilfreiche Diskussionen und immer ein offenes Ohr für Probleme.

Mein Dank geht an Adolfo Garcia-Sastré und Balaji Manicassamy von der Mount Sinai School of Medicine für die hervorragende Zusammenarbeit und Entwicklung der rekombinanten Influenza Viren.

Ich danke Martina Sick, Susanne Pocai und Susann Beetz aus dem Organisationsteam des Graduiertenkollegs 1121 der Humboldt Universität Berlin für die Koordination und Hilfe und eine produktive und familiäre Atmosphäre im Graduiertenkolleg.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Rupert Mutzel für seine Bereitschaft diese Arbeit von Seiten der Freien Universität Berlin zu betreuen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die sowohl an mich geglaubt, mir Mut gemacht und mir durch die gesamte Zeit geholfen haben. Für das Korrekturlesen bedanke ich mich bei Axel, Eva, Matthias und Kaweh.

Ein besonderer Dank geht an Kaweh...für seine Liebe und Motivation.

