

**Translations-Reinitiation bei Caliciviren
– Struktur-/Funktionsbeziehungen
im relevanten RNA Motiv**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl. Biochem. René Wennesz
aus Bad Hersfeld

Tübingen
2014

Tag der mündlichen Qualifikation:

19.09.2014

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gregor Meyers

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Stevanovic

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung	8
Summary	9
Einleitung	10
1 <i>Caliciviridae</i>	10
1.1 RHDV	11
2 Molekularbiologie	11
3 Translation.....	12
3.1 Eukaryotische Translation	12
3.2 Virale Wege der Translationsinitiation	12
4 RNA-Strukturaufklärung	13
4.1 Warum ist die RNA-Struktur wichtig?.....	13
4.2 Einführung in die RNA-Strukturaufklärung	14
5 Zielsetzung.....	15
Material und Methoden	16
Material.....	16
Spezielle Chemikalien	16
Synthetische Oligonukleotide (Fa. Metabion, München)	16
Puffer und Lösungen	19
Vorgefertigt Systeme (Kits).....	24
Zellkulturmedien	24
Methoden	24
1 Bakterien	24
2 Zellkultur	25
3 DNA basierte Methoden.....	26
4 RNA basierte Methoden	28
5 Methoden zur Proteinanalyse	33
Ergebnisse	34
1. Methodik.....	34
1.1 Konstrukte	34
1.2 Transiente Expression.....	35
1.3 Strukturaufklärungsexperiment mit 5' markierter RNA.....	35
1.4 Strukturaufklärungsexperimente mit nicht markierter RNA.....	36
2. Enzymatische Strukturaufklärung der TURBS	36

2.1 Optimierung der Technik.....	36
2.2 Ergebnisse der Strukturaufklärung für die Wildtyp-TURBS.....	39
3. Primer-Extension Experimente zur Strukturanalyse.....	42
3.1 Etablierung der Technik.....	43
4. Einfluss von Mutationen auf die TURBS-Struktur	47
4.1 Einfluss von Deletionen nahe <i>Motiv 1</i> auf die Effizienz der Reinitiation.....	48
4.2 Untersuchung des dsRNA-Bereiches in der Start/Stop-Region.....	49
4.3 Substitutionen, die dsRNA-Strukturen verhindern	51
4.4 Komplementäre Substitutionen.....	57
4.5 Weitergehende Charakterisierung der dsRNA Basen 58-61	63
5 Varianten der TURBS mit synthetischer hergestellten Sequenzen	68
5.1 Varianten der TURBS zur Blockierung unentdeckter Interaktionen.....	68
5.2 TURBS-Varianten mit tiefgreifenden Veränderungen der Sequenz	73
Diskussion	78
1 Analyse der TURBS-Sekundärstruktur mittels 5' markierter RNA.....	81
1.1 Die Wildtyp-TURBS	81
1.2 Mutageneseexperimente	82
1.3 Weitergehende Untersuchungen der Interaktion der Basen 58-61 mit der Start/Stop-Region	84
1.4 Konstrukte mit synthetischer DNA	84
2 Analyse der TURBS-Sekundärstruktur mittels Primer Extension	86
3 Strukturmodelle	87
4 Struktur-Funktionsbeziehungen der RHDV-TURBS.....	92
4.1 Potentielle Aufgaben der gefundenen Interaktionen	94
4.2 Publierte TURBS-Strukturen anderer Viren.....	95
5. Bedeutung der TURBS im RHDV Lebenszyklus.....	96
6. Die Termination-Reinitiation als potentieller Expressionsmechanismus in eukaryotischen Zellen	97
Literaturverzeichnis.....	98
Danksagung.....	103

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMK	Natriumborat-Magnesiumchlorid-Kaliumchlorid-Puffer
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA („complementary DNA“)
cm	Zentimeter
CMCT	N-Cyclohexyl-N'-(morpholinoethyl)carbodiimid metho-p-toluene-sulfonat
cps	Zerfälle pro Sekunde („counts per second“)
C-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton
(d)dATP	(Di-)Desoxyadenosintriphosphat
(d)dCTP	(Di-)Desoxycytosintriphosphat
(d)dGTP	(Di-)Desoxyguanintriphosphat
(d)dTTP	(Di-)Desoxythymidintriphosphat
(d)dNTP	(Di-)Desoxyribonukleotidtriphosphat
DMS	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig („double stranded“)
DTT	Dithiothreitol

E.coli	Escherischia coli
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Et al.	Und andere („et aliter“)
FCV	Felines Calicivirus
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
HCV	Hepatitis C Virus
HPLC	„high performance liquid chromatography“
IRES	Interne Ribosomenbindungsstelle („Internal Ribosome Entry Site“)
k	kilo-
kDA	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	Meter
M	Molar (mol/l)
min	Minute
mRNA	messenger RNA
M.O.I	multiplicity of infection
NMR	Kernspinresonanz („nuclear magnetic resonance“)
NS	Nicht-Strukturprotein
NTR	nicht translatierte Region („non translated region“)
ORF	offense Leseraster („open reading frame“)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
RHDV	Rabbit hemorrhagic disease virus
rRNA	Ribosomale RNA
s	Sekunde
S	Svedberg (Maßeinheit für Sedimentationskoeffizient)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sg mRNA	Subgenomische RNA
SMSV	San Miguel Sea Lion Virus
ss	einzelsträngig
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tricin	N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TURBS	Termination Upstream Ribosome Binding Site
U	Unit (Aktivitätseinheit von Enzymen)
U	Uracil
V	Volt
VESV	Vesicular Exanthema of Swine Virus
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
γ	Gamma-
μ	Mikro-

Zusammenfassung

Die Familie der *Caliciviridae* umfasst eine Reihe tier- und humanpathogener Krankheitserreger. Die Virionen sind nicht umhüllt und das virale Genom besteht aus einzelsträngiger RNA positiver Polarität. Die Expression des minoren Capsidprotein VP2 erfolgt über einen ungewöhnlichen Weg. VP2 wird zumindest hauptsächlich von einer subgenomischen RNA (sg mRNA) exprimiert, die kollinear mit dem 3' Drittel der genomischen RNA ist. Diese sg mRNA enthält zwei getrennte offene Leseraster (ORF) und ist besonders, weil sie damit bicistronisch ist, während in eukaryotischen Zellen mRNAs monocistronisch sind. Das offene Leseraster, das für VP2 kodiert, liegt im 3' Bereich der RNA. Eukaryotische Zellen sind im Normalfall nicht in der Lage, einen solchen 3' ORF zu exprimieren, denn die Translationsinitiation erfolgt hier aus mechanistischen Gründen in der Regel nahe am 5' Ende, meist am 1. AUG. Die Translation des 5' terminal gelegenen ORF der Caliciviren wird über ein Protein namens VPg initiiert. Dieses Protein ersetzt funktionell das bei eukaryotischen mRNAs vorhandene 5' Cap, das für die Assemblierung des Initiationskomplexes wichtig ist. In der sgmRNA kodiert der 5' seitige ORF für das Hauptcapsidprotein VP1. Der 3' ORF der sgmRNA kann nur exprimiert werden, nachdem der 5' gelegene ORF bis zum regulären Ende translatiert wurde. Die Expression des VP2 läuft also über eine Termination-Reinitiation ab. Das RNA-Element, das diese Termination-Reinitiation ermöglicht, wird als Termination Upstream Ribosome Binding Site (TURBS) bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die TURBS des Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) weitergehend charakterisiert. Der Fokus lag auf der Sekundärstrukturanalyse dieses RNA-Elements. Dazu wurde die in der Literatur beschriebene minimale TURBS-Region mit je ca. 30 Basen 3' und 5' flankierender Sequenzen mit einem SP6 RNA-Polymerasepromotor fusioniert, diese Promotor-Sequenzkombination beidseitig mit *EcoRV*-Schnittstellen versehen und in ein Vektorrückgrat kloniert, welches die Vermehrung in Bakterienzellen ermöglichte. Durch Spaltung mit *EcoRV* konnte die DNA gewonnen werden, welche als Vorlage für die *in-vitro* Transkription definierter RNAs diente. Diese RNAs wurden in Puffermedien, die die Ausbildung von RNA-Strukturen ermöglichten, einer partiellen Nukleasespaltung bzw. partieller Spaltung/Modifikation mit Chemikalien unterzogen. Die Produkte dieser Reaktionen konnten über direkte 5' ³²P Markierung der untersuchten RNAs bzw. indirekte Markierung über cDNA Synthese mit 5' ³²P markierten Primern detektiert werden, nachdem sie ihrer Größe entsprechend in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt worden waren. Nach der Identifizierung der gepaarten und ungepaarten Basen der TURBS mit diesem System wurde ein Arbeitsmodell der Sekundärstruktur erstellt. Dieses Modell wurde anschließend durch Herstellen und Analyse von Substitutionsvarianten der TURBS weiter untersucht. Dabei kamen Substitutionen zum Einsatz, welche die Ausbildung der potentiellen Basenpaare verhindern sollten. Die Varianten mit den genannten Substitutionen wurden anschließend sowohl in transienten Expressionssystemen in Zellkultur auf ihre VP2-Expressionsrate als auch im Strukturaufklärungssystem auf Sekundärstrukturänderungen untersucht. Der nächste Schritt war die Einführung von zu den ersten Substitutionen reziproke Austausch, welche ebenfalls in Expressions- und Strukturaufklärungssystem auf Komplementation der primären Austausch getestet wurden. Mit diesem System konnte eine der neu gefundenen Interaktionen bestätigt werden. Bei einer zweiten konnten nur Hinweise auf die Interaktion gefunden werden, weil Änderungen auf einer Seite des vorgeschlagenen Duplex die TURBS Gesamtstruktur beeinträchtigten. Bei einer dritten Region waren die Einflüsse zu schwach, um grundsätzliche Aussagen zu treffen. Aus der Kombination der Daten für die Wildtyp-TURBS und denen für die der verschiedenen Varianten wurden synthetische Minimal-

TURBS Konstrukte erstellt, bei denen nur die essentiellen Strukturen unverändert gelassen wurden. Diese wurden ebenfalls strukturell und funktionell charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die gefundenen Sekundärstrukturelemente zusammen mit einem bekannten Primärsequenzmotiv und der Start/Stopp-Sequenz ausreichten, um die Reinitiation zu ermöglichen. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde ein Modell der Sekundärstruktur der RHDV-TURBS sowie ein hypothetisches Modell für die TURBS-Funktion erstellt.

Summary

The Family of *Caliciviridae* contains species which infect different animals and also humans. The virions are non-enveloped and contain the single stranded viral RNA-genome of positive polarity. The expression of the caliciviral minor capsid protein VP2 is achieved in an unusual way. The main source of VP2 is the subgenomic RNA (sg mRNA), which is colinear with the 3' third of the genomic RNA. Special property, this sg mRNA contains two separate open reading frames (ORF), and this is bicistronic in contrast to eukaryotic mRNAs which usually are monocistronic. The open reading frame coding for VP2 is located in the 3' region of the viral genomic and also the sg mRNA. Eukaryotic cells are usually unable to express 3' ORFs of an mRNA, because translation usually starts at the first AUG due to the mechanism of initiation. The translation of the 5' ORF of the *Caliciviridae* is initiated through a protein named VPg, which is linked to the RNA 5' end and is able to substitute for the cap-structure of regular mRNAs in assembling the initiation complex. ORF1 translation leads to the expression of VP1, the major capsidprotein. The expression of the 3' ORF requires the translation of the 5' ORF down to its regular end. The VP2 is expressed exclusively through a termination-reinitiation process. This process is governed by a RNA-element which is termed Termination Upstream Ribosome Binding Site (TURBS).

The aim of this PhD thesis was to further characterize the secondary structure of the TURBS of the Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV). To examine the structure of the region, a cDNA fragment of roughly 120 bases that contains the TURBS and some 30 flanking nucleotides on both sides together with a *SP6-RNA-polymerase* promoter was used. *EcoRV* restriction sites were inserted on both sides of the cDNA and inserted into a vector backbone, which allowed propagating this construct in bacteria. The resulting product was restricted using *EcoRV*, and then the purified plasmid was used as template for *in-vitro* transcription. The restriction was found to be important for the generation of RNAs with homogenous ends. The structure probing experiments were carried out in buffer media which allowed the RNA to form secondary structures. For the experiments, partial nuclease restriction and chemical restriction/modification were used. To detect the products of the reactions the RNA had to be labeled, this was managed through direct 5' ³²P-labeling of the RNA or indirect labeling via primers which were 5' labeled and used to generate cDNA of the modified RNA. The labeled fragments were separated by polyacrylamide-gel electrophoresis. After the identification of the paired and unpaired nucleotides of the RNA, the data was used to construct a first secondary structure model of the TURBS. This model was investigated further with constructs containing base substitutions which inhibited the formation of the proposed base pairs. These mutants were functionally tested using a transient expression system in cell culture for their ability to express VP2. In addition the same mutations were tested in structure probing experiments for changes in the RNA structure. As a next step complementary substitutions were introduced into those mutants, which

restored the ability to form base pairs. The new constructs were also tested in expression and structure probing experiments for their ability to compensate the effect of the first mutations. The system allowed proving one of the newly identified interactions. For a second one only hints for the interaction could be obtained, because substitutions on one side of the proposed interaction caused changes in the overall TURBS-structure. A third interaction had minor effects, which were too weak to provide valuable information. The data generated by the above described experiments were used to establish synthetic TURBS-regions, which contained only the essential features of the TURBS. These constructs were again characterized on both functional and structural level and showed that the identified structural features, together with a known primary structure motif, were sufficient to enable reinitiation. In the end a model of the TURBS secondary structure and a hypothetical model for the TURBS-function were established.

Einleitung

1 *Caliciviridae*

In der vorliegenden Arbeit wurde ein interessanter Aspekt der Genexpression beim Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) untersucht. RHDV gehört zur Familie der *Caliciviridae* und wird innerhalb der Familie in das Genus *Lagovirus* eingeordnet. Neben dem Genus der Lagoviren umfasst die Familie vier weitere Genera, *Nebovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus* und *Vesivirus*. Vertretern der Familie der *Caliciviridae* stehen viele verschiedene Wirte zur Verfügung. So gibt es Caliciviren welche Katzen (Bsp. Felines Calicivirus), Kaninchen (Bsp. RHDV) oder Menschen (Bsp. Humanes Norovirus) infizieren. Auch verschiedene im Meer lebende Tierarten werden von Caliciviren infiziert.

Die Caliciviruscapside sind nicht umhüllt und haben einen Durchmesser von ungefähr 30-40 nm. Sie sind aus dem Hauptcapsidprotein VP1 und dem minoren Capsidprotein VP2 aufgebaut (Peterson and Studdert 1970, Prasad, Rothnagel et al. 1994, Wirblich, Thiel et al. 1996). Im Inneren des Capsids befindet sich das Virusgenom, welches ca. 7,3-8,4 kB groß ist und aus RNA positiver Polarität [(+)-Strang RNA] besteht. Das virale Genom ist 5' seitig kovalent mit einem Protein namens VPg verknüpft und 3' seitig polyadenyliert (Ehresmann and Schaffer 1977). Die verschiedenen Caliciviren unterscheiden sich unter anderem in der Anzahl der Offenen Leseraster (ORF). Es gibt Caliciviren mit 2 ORFs, wie das RHDV, mit drei, wie das Feline Calicivirus oder sogar mit vier Leserastern, wie kürzlich für das Murine Norovirus entdeckt (McFadden, Bailey et al. 2011). Die Abb. 1 zeigt schematisch die Genomorganisation des RHDV.

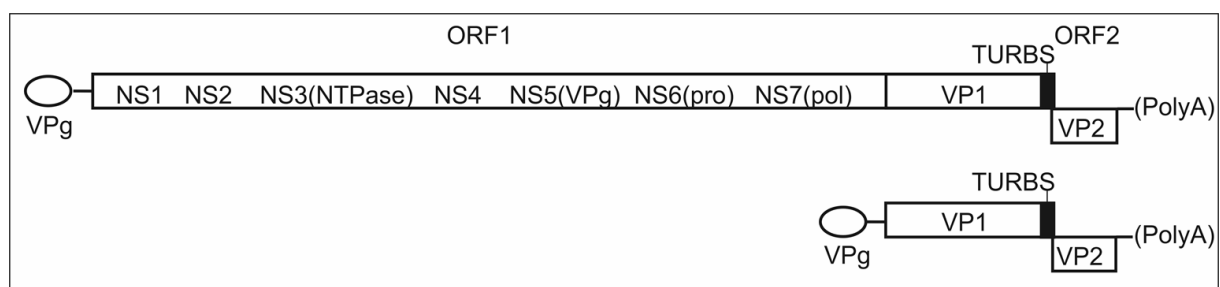


Abb. 1 zeigt schematisch die Genomorganisation des RHDV. Sowohl die genomische als auch die subgenomische RNA sind gezeigt. Im Bereich der „Termination Upstream Ribosome Binding Site“ (TURBS) überlappen die Leseraster (ORFs) 1 und 2 um acht Basen [modifiziert nach (Wirblich, Thiel et al. 1996)] .

1.1 RHDV

Das RHDV ist ein Virus, das Kaninchen infiziert. Die Infektion führt zu schwerwiegenden Symptomen und endet für den überwiegenden Teil der Tiere tödlich. Nachdem RHDV 1984 erstmals in China beschrieben worden war, hat es sich in vielen Ländern ausgebreitet. Es befällt sowohl domestizierte als auch wildlebende Kaninchen. Besonders die wirtschaftlichen Schäden durch die Auslöschung von Kaninchenbeständen in der Zucht machten RHDV bekannt. Die Symptome sind hämorrhagische Sepsis und nekrotisierende Hepatitis (Ohlinger, Haas et al. 1990). Es sind inzwischen auch niederpathogene bzw. apathogene RHDV-ähnliche Stämme aufgetreten (Capucci, Fusi et al. 1996, Strive, Wright et al. 2010).

Die RHD-Viruspartikel enthalten das virale Genom. Dieses ist etwa 7,5 kB groß und enthält 2 ORFs. Die genomische RNA ist 5' seitig mit dem Protein VPg verbunden und 3' seitig polyadenyliert (Meyers, Wirblich et al. 1991). Im 5' Bereich des Genoms liegen die Gene, welche für die Nichtstrukturproteine codieren. Im 3' Bereich folgen die Sequenzen, die für die Strukturproteine VP1 und VP2 codieren. Der ORF 1 umfasst fast das gesamte Genom und codiert für die Nichtstrukturproteine des Virus sowie für das Hauptstrukturprotein VP1. ORF 2 enthält die genetische Information für das minore Strukturprotein VP2 (Wirblich, Thiel et al. 1996). Die beiden Leseraster überlappen in acht Basen. Das VP2 Protein wird exklusiv über einen Terminations-Reinitiations-Mechanismus exprimiert (Meyers 2003), welcher die vorherige Translation des VP1 voraussetzt. Die „Termination Upstream Ribosome Binding Site“ (TURBS) ermöglicht dann mit einer Rate von ca. 15 % eine Reinitiation im ORF 2. Somit wird die VP2 Expression in Abhängigkeit von der VP1-Expression gesteuert. Der Grund für die Verwendung dieses komplizierten Systems ist derzeit noch nicht bekannt.

2 Molekularbiologie

Das Genom der Caliciviren ist 5' seitig kovalent mit einem Protein namens VPg verknüpft (Schaffer, Ehresmann et al. 1980, Meyers, Wirblich et al. 1991, Herbert, Brierley et al. 1997), welches im Zusammenspiel mit der ebenfalls vorhandenen Polyadenylierung die Translation der viralen RNA ermöglicht (Wirblich, Thiel et al. 1996, Herbert, Brierley et al. 1997). Diese werden mit Ausnahme des VP2 als Polyprotein translatiert und posttranslational in die einzelnen Proteine gespalten (König, Thiel et al. 1998, Meyers, Wirblich et al. 2000, Thumfart and Meyers 2002). Für die Prozessierung eines Großteils des Polyproteins des RHDV ist eine 3C-like Protease (Abb.1 NS6) verantwortlich (Boniotti, Wirblich et al. 1994). Diese liegt im Genom 5'seitig der RNA-abhängigen-RNA-Polymerase (Abb.1 NS 7), deren Funktionalität nach Expression in *E.coli* nachgewiesen werden konnte (Vazquez, Martin Alonso et al. 1998). Während der Infektion kann in den Zellen eine weitere virale RNA-Spezies nachgewiesen werden (Ohlinger, Haas et al. 1990, Meyers, Wirblich et al. 1991). Diese subgenomische RNA (sg mRNA) ist kolinear mit dem 3' Bereich des viralen Genoms und codiert für die Strukturproteine VP1 und VP2. Die sg mRNA wird durch interne Initiation in der negativ-Strang Kopie des viralen Genoms generiert (Morales, Barcena et al. 2004). Sie ist ebenfalls VPg verlinkt und polyadenyliert (Meyers, Wirblich et al. 1991). Die Hauptmenge der Strukturproteine wird von dieser RNA translatiert. Die Translation des VP2 erfolgt von derselben sg mRNA, die auch für das VP1 codiert und wird über die bereits erwähnte Reinitiation der Translation ermöglicht (Meyers 2003).

Die meisten Caliciviren lassen sich nicht in Gewebekulturrkultur vermehren. Ausnahmen bilden das Feline Calicivirus (FCV), das Murine Norovirus (MNV), das San Miguel Sea Lion Virus (SMSV) und das Vesicular Exanthema of Swine Virus (VESV) (Studdert 1978). Für RHDV gelang die nur in primären Hepatocyten (König, Thiel et al. 1998). Es ist zwar ein System publiziert, welches es ermöglichen soll RHDV in Zellkultur zu vermehren (Liu, Zhang et al. 2006), aber Nachfragen blieben bisher unbeantwortet und daher wurden die Zellkulturarbeiten in der vorliegenden Dissertation mit einem Vektorsystem durchgeführt. Dieses erlaubt es die sg mRNA unter zu Hilfenahme von Vaccinia MVA-T7 in Zellkultur zu exprimieren. Für die Untersuchung der Termination-Reinitiation ist dieses System sogar von Vorteil, weil die Proteinexpression unabhängig von der Virusreplikation ist.

3 Translation

3.1 Eukaryotische Translation

Die Translation stellt einen der wesentlichen Schritte der Genexpression dar. Dieser Prozess stellt die Verbindung zwischen der genetischen Information und den Proteinen her. In eukaryotischen Zellen ist die translation von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. Damit die mRNA überhaupt translatierbar ist, muss ein Mindestmaß an Modifikationen vorhanden sein. Die mRNA muss ein 5' G Cap tragen und polyadenyliert sein, damit das Translationssystem sie als Substrat akzeptiert. Diese Modifikationen finden zusammen mit anderen Reifungsprozessen von eukaryotischen prä-mRNAs bereits im Zellkern statt. Nach dem Export der mRNA ins Cytoplasma muss die mRNA zum Translationsapparat gelangen. Die mRNA wird über ihr G-Cap und das am PolyA-Schwanz gebundene PolyA-Bindeprotein vom eIF4F-Komplex (bestehend aus eIF4A, eIF4E und eIF4G) erkannt. Die Bindung dieses Komplexes an die RNA führt zu einer pseudo-zirkulären Struktur der mRNA und vermittelt eine Interaktion mit dem 43 S Präinitiationskomplex [bestehend aus der 40 S ribosomalen Untereinheit, den eIFs 1, 1A, 2, 3 und 5, sowie der Initiator transfer RNA (tRNA)] am 5' Ende der RNA. Der entstandene Komplex scannt unter ATP Verbrauch die mRNA entlang in 3' Richtung bis das Startcodon erreicht wird, woraufhin sich der 48 S Initiationskomplex bildet. Wird das Startcodon erkannt wird unter GTP-Hydrolyse die Freisetzung von eIF2 und möglicherweise einiger weiterer Initiationsfaktoren vermittelt. Zurück bleibt die 40 S ribosomale Untereinheit zusammen mit der Initiator tRNA und zumindest eIF1A am Startcodon gebunden. Als nächstes lagert sich die 60 S Untereinheit, unter Mitwirkung von eIF5B an und der 80 S Initiationskomplex wird gebildet. Unter GTP Hydrolyse erfolgt die Freisetzung von eIF5B und eIF1A sowie einiger anderer möglicherweise noch vorhandenen eIFs. Die Translation kann nach diesen Reaktionen beginnen [Review (Sonenberg and Hinnebusch 2009)] und läuft prozessiv bis zum Erreichen eines Stoppcodons im Leseraster.

3.2 Virale Wege der Translationsinitiation

Viren nehmen in der Natur eine Sonderstellung ein. Sie sind keine Lebewesen und können sich nur innerhalb von infizierten Zellen vermehren. Dabei benutzen sie die zelluläre Maschinerie ihres Wirts, um ihre genetische Information zu vervielfältigen und die Proteine zu synthetisieren, welche sie für ihren Lebenszyklus und den Aufbau ihrer Capside benötigen. In gewisser Weise stellen Viren parasitierende Erbinformation dar. Der Zugang zu den Systemen, die RNA so modifizieren, dass sie als mRNA akzeptiert wird, ist RNA-Viren, welche im Cytoplasma replizieren, verwehrt. Viren haben aber andere Möglichkeiten entwickelt, ihre mRNAs translatierbar zu machen. Beim RHDV z.B. ersetzt das VPg funktionell das 5' Cap. Es interagiert mit eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIF) und sorgt so

für die Anlagerung der kleinen ribosomalen Untereinheit (Daughenbaugh, Fraser et al. 2003, Goodfellow, Chaudhry et al. 2005, Chaudhry, Nayak et al. 2006). Andere Viren verwenden Interne Ribosomenbindungsstellen [IRES (Jang, Krausslich et al. 1988)] um ihre Erbinformation translatieren zu lassen, ohne dass die zellulären Modifikationssysteme benötigt werden [Review (Pestova, Kolupaeva et al. 2001)]. Es gibt auch Viren, welche das 5' G-Cap von zellulären mRNAs abtrennen und dieses Cap auf ihre eigene RNA übertragen [„cap-snatching“ (Bouloy, Plotch et al. 1978)].

Verschiedene von Viren genutzte alternative Mechanismen der Translationsinitiation ermöglichen zudem einen Translationsstart unabhängig und weit entfernt vom 5' Ende der RNA. Die von der zellulären Translationsinitiation abweichenden Mechanismen bieten einer Reihe von Viren weiterhin die Grundlage für Unterdrückung der zellulären Translation [„host-shutoff“ Review (Walsh and Mohr 2011)]. Diese Strategie hat den Vorteil, dass zum einen die Konkurrenz mit zellulären mRNAs um die begrenzten Komponenten des Translationsystems wegfällt und zum anderen die Reaktion der Zelle auf die virale Infektion behindert wird.

Die eukaryotischen mRNAs sind im Gegensatz zu den prokaryotischen monocystronisch und deren Translation startet nahe des 5' Endes, meist am ersten AUG. Im Regelfall codiert also eine mRNA für ein Protein. Besonders bei (+)-Strang RNA-Viren dient oftmals das gesamte Genom als mRNA und codiert für mehrere Proteine. Damit diese in isolierter Form erhalten werden können haben die Viren verschiedene Systeme entwickelt. Zum einen gibt es die Strategie, dass die Proteine in einem durchgehenden Leseraster liegen und damit ein Polyprotein synthetisiert wird. Dieses Polyprotein kann anschließend über zelluläre und Virusproteasen in die einzelnen Proteine gespalten werden [Review (Yost and Marcotrigiano 2013)]. Die Initiation über eine IRES ist eine Möglichkeit, Translation weit vom 5' Ende der RNA zu initiieren und eine mRNA mit mehr als einem ORF in eukaryotischen Zellen zu nutzen [Review (Pestova, Kolupaeva et al. 2001)]. Des Weiteren gibt es die Möglichkeit sg mRNAs zu erstellen, welche für die Expression weiter 3' gelegener Raster sorgen, bzw. bestimmte Genprodukte vermehrt zu bilden erlauben, wie dies mit den Strukturproteinen des RHDVs geschieht (Ohlinger, Haas et al. 1990, Meyers, Wirblich et al. 1991). Caliciviren verwenden auch noch eine weitere Strategie mehr als ein Protein von einer mRNA zu generieren. Auch hier sei die sg mRNA des RHDV als Beispiel hervorgehoben. Die TURBS ermöglicht es, ausgehend von der sg mRNA zwei Strukturproteine zu translatieren, indem ein Teil der Ribosomen, nachdem das VP1 translatiert wurde, eine erneute Translationsinitiation im 3' gelegenen VP2-Raster durchführen (Meyers 2003). Durch die Abhängigkeit der Initiation am 3' ORF von der Translation des stromaufwärts gelegenen VP1-ORFs ergibt sich zusätzlich eine Regulation der VP2-Expression. Die TURBS-Region erfüllt dabei zwei Funktionen, weil sie sowohl proteinkodierend, als auch als cis-agierendes funktionales RNA-Element aktiv ist.

4 RNA-Strukturaufklärung

4.1 Warum ist die RNA-Struktur wichtig?

Zunächst wurde die Rolle der RNA vor allem im Bereich der Informationsübermittlung gesehen. Mit der mRNA werden Informationen aus dem Genom kopiert und zum Translationsapparat transportiert. Für diese Funktion ist die Primärstruktur der RNA, also die Basenfolge, entscheidend. Allerdings wurden auch schon früh funktionelle RNAs entdeckt. Zu nennen sind hier die tRNAs. Bei diesen RNAs ist die räumliche Faltung der RNA mitentscheidend für ihre Funktionalität. Die

Primärstruktur gibt zwar über ihre Basenfolge einen Rahmen für die Sekundärstruktur vor, weil die Basenfolge die Grundvoraussetzung schafft, dass Paarungen der Basen untereinander nach Vorbild der von Watson und Crick beschriebenen DNA Basenpaare entstehen können. Aber das Vorliegen komplementärer Bereiche ist nicht der einzige Parameter, der über die Ausbildung der Sekundärstruktur entscheidet. So gelingt es bis heute nicht, mit Computermodellen die Sekundärstrukturen korrekt vorherzusagen (Deigan, Li et al. 2009). Die nächste Ebene der RNA-Struktur stellt die Tertiärstruktur dar. Diese beschreibt die Anordnung der einzelnen Basen im dreidimensionalen Raum, außerdem die Interaktionen der Basen miteinander, welche nicht den Watson-Crick Interaktionen entsprechen, wie beispielsweise Interaktionen über das N7-Atom der Purinbasen [Review (Ehresmann, Baudin et al. 1987)].

Es liegen vielfältige Daten vor, die die Bedeutung der dreidimensionalen Struktur bestimmter RNAs bzw. RNA-Elemente für ihre biochemische Funktion belegen. Es sind also viele grundlegende Funktionen in Zellen mit der Struktur der RNA verknüpft und auch für die TURBS-Region gibt es Ergebnisse, die sich nicht allein auf der Basis der Primärsequenz erklären lassen (Meyers 2003, Meyers 2007, Kreher 2009). Zusätzlich sind sowohl für RHDV als auch andere Viren bereits Strukturdaten publiziert worden, die zumindest in Teilbereichen der TURBS funktionell wichtige Strukturelemente nachgewiesen haben (Michael L. Powell 2008, Kreher 2009, Luttermann and Meyers 2009, Naphthine, Lever et al. 2009). Ein klares Bild der Struktur-Funktionsbeziehungen dieses RNA-Elements fehlt aber bisher.

4.2 Einführung in die RNA-Strukturaufklärung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten RNA-Strukturen zu bestimmen. Dazu zählen Methoden wie NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallstrukturanalysen, die es erlauben, 3D Strukturmodelle zu erstellen und auch für die Aufklärung von Proteinstrukturen angewandt werden. Im Falle von RNA können Aussagen zur Sekundärstruktur auch durch Behandlung mit bestimmten Enzymen oder Chemikalien erhalten werden. Der Nachteil dieser Ansätze ist, dass nur die Sekundärstrukturen bestimmt werden können. Als Vorteile sind die geringere Anforderung an das Equipment und die Möglichkeit des Arbeitens im physiologischen Bereich zu nennen. Es kann mit Enzymen oder Chemikalien gearbeitet werden, welche die RNA modifizieren oder spalten können [Review (Jaeger, Santalucia et al. 1993)]. Damit Enzyme und Chemikalien für die Sekundärstrukturanalyse verwendet werden können müssen sie bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Zunächst muss eine Spezifität entweder für ungepaarte Basen, also einzelsträngige RNA (ssRNA) oder aber für gepaarte Basen, also doppelsträngige RNA (dsRNA), bestehen [Review (Ehresmann, Baudin et al. 1987)]. Zusätzlich kann es hilfreich sein, wenn ein Enzym oder eine Chemikalie nur eine oder zwei verschiedene Basen spaltet bzw. modifiziert. Dies hilft, die Spaltprodukte bei der Auswertung in die Primärsequenz einzuordnen. Als Enzyme kommen RNasen oder Nukleasen in Frage. Diese spalten die RNA abhängig davon, ob die betreffende Base in ssRNA oder dsRNA Bereichen liegt. Zusätzlich können noch Spezifitäten für die Art der Base bestehen. So spaltet beispielsweise RNase T1 nur Guanin in ssRNA. Wichtig ist, dass die Reaktion so verläuft, dass statistisch ein RNA Molekül nur einmal gespalten wird („single hit“). Die Spaltfrequenz lässt sich über die Inkubationszeit und die eingesetzte Enzymmenge steuern. Wird für die Enzymreaktion terminal 5' oder 3' markierte RNA eingesetzt kann man die Spaltprodukte, welche die markierte Stelle enthalten, direkt detektieren. Dazu kann die gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte über ein Acrylamid-Harnstoff Gel erfolgen und im Falle von radioaktiv markierter RNA die Visualisierung über Autoradiographie. Im Falle von Chemikalien wäre die Vorgehensweise analog z.B.

bei Bleiionen als Reagenz möglich, denn auch Blei spaltet das Rückgrat der RNA. Bei anderen Chemikalien ist dies nicht der Fall. Sie modifizieren nur die Gruppen, welche für die Ausbildung von Basenpaaren benötigt werden. Dies kann beispielsweise mit Dimethylsulfat durch eine Methylierung des N3 des Cytosins erfolgen. Diese Methylierung kann nur ablaufen, wenn die betreffende Base nicht gepaart vorliegt, somit erklärt sich die Spezifität der Chemikalien für ssRNA. Um jedoch die modifizierten Stellen sichtbar zu machen, muss die RNA in eine cDNA Kopie überführt werden. Bei der reversen Transkription bricht die Synthese des neuen Stranges an der dem 3' Ende nächstgelegenen modifizierten Basen der Matrize ab, weil an der modifizierten Base durch die Modifikation keine Basenpaarung mehr stattfinden kann. Aufgrund der Anforderung, eine cDNA zu erstellen, wird bei diesen Reaktionen unmarkierte RNA verwendet. Die für die Visualisierung der Produkte notwendige Markierung kann über die Modifikation der Primer erreicht werden. Die Markierung kann radioaktiv vorgenommen werden oder durch Anfügen einer fluoreszierenden Gruppe an den Primer erfolgen. Die weitere Auswertung ist prinzipiell identisch mit dem Vorgehen bei markierter RNA. Wenn fluoreszenzmarkierte Primer verwendet wurden, ist auch das Auslesen über einen Sequenzierautomaten möglich.

Die mit den mit verschiedenen Enzymen und/oder Chemikalien erhaltenen Produktmustern können zum Erstellen eines Modells verwendet werden, welches die verschiedenen dsRNA Bereiche zusammenbringt. Weil die Untersuchung allerdings nicht direkt die Bindungspartner in dsRNA Bereichen identifiziert, muss die Zuordnung der dsRNA Bereiche zueinander anschließend überprüft werden. Dies kann über Substitutionen erfolgen, welche die postulierten Interaktionen verhindern. Mit diesen Varianten kann dann zum einen erneut Strukturaufklärung betrieben werden und zum anderen (wenn es sich um funktionale RNA handelt) der Einfluss der Veränderung auf die Funktion untersucht werden. Eine zu der ersten Substitution komplementäre Substitution, welche die Interaktion funktionell und strukturell wiederherstellt, kann dann als abschließender Beweis einer Interaktion dienen.

5 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Sekundärstruktur der RHDV-TURBS zu untersuchen. Dabei sollten sowohl die strukturellen Grundlagen für eine funktionsfähige TURBS, als auch der Einfluss, den der Ausfall bestimmter Strukturelemente auf die Aktivität der TURBS hat, untersucht werden. Dieses Ziel wurde über Strukturaufklärung der Wildtyp-TURBS und ausgesuchter Mutanten, sowie den Funktionalitätstest der verschiedenen Sequenzen in transienten Proteinexpressionsexperimenten in Zellkultur verfolgt. Am Ende der Arbeit sollte eine vollständige Sekundärstruktur der TURBS des RHDV stehen.

Material und Methoden

Material

Spezielle Chemikalien

RNase-freie Chemikalien

HEPES, Cellpure®	Roth
Kaliumchlorid, Cellpure®	Roth
Magnesiumchlorid Hexahydrat, Cellpure®	Roth
Betain Lösung, 5 M	Sigma-Aldrich
Blei(II)acetat Trihydrat	Sigma-Aldrich
Borsäure BioReagent, Nuklease/Protease-frei	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfat (DMS)	Sigma-Aldrich
N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)carbodiimide	
metho-p-toluenesulfonat (CMCT)	Sigma-Aldrich
Trizma®Base (Tris)	Sigma-Aldrich

Zur Beschichtung der Glasplatten der Sequenziergele

PlosOne Bind Silane	GE-Healthcare
PlosOne Repel Silane	GE-Healthcare

Synthetische Oligonukleotide (Fa. Metabion, München)

Name	Sequenz 5' nach 3'
rw4f	GCGGCCGCGATATCATTTAGGTGACACTATAGAGCTCAACC
rw4r	ATGCATTGCTCAGGGATCCGATATCGGCACCTGCAAGTCCC
rw10f	CATTGACGTACGCCCCCAGGCCG
rw10r	CGGCCTGGGGGGCGTACGTCAATG
rw11f	GCACACTCGTGTTCAACACAGCCAATGGC
rw11r	GCCATTGGCTGTGTTGAACACGAGTGTGC
rw12f	CGCCCTGTGGGAAGGCCGTCCAAAAGC
rw12r	GCTTTTGGACGGCCTTCCCACAGGGCG
rw13f	CGCCCTGTGGGACCCCGTCCAAAAGC
rw13r	GCTTTTGGACGGGGTCCCACAGGGCG
rw14f	CGCCCTGTGGGACCCAGGTCCAAAAGC
rw14r	GCTTTTGGACCTGGGTCCCACAGGGCG

rw20f GCACACTCGTGTTCCGGCCTGGGGGG
 rw20r CCCCCAGGCCGAAACACGAGTGTGC
 rw25f CTCATTGACCTGAAAAAACTCATTGAC
 rw25r GTCAATGAGTTTTTTCAGGTCAATGAG
 rw26f GACGTACGCCAGTGGGACCCAGGCCG
 rw26r CGGCCTGGGTCCCACTGGGCGTACGTC
 rw27f GACGTACGCCCTGTGGGAATACCCAGGCCG
 rw27r CGGCCTGGGTATTCCACAGGGCGTACGTC
 rw30f CGCCCTGTGGGAATCAGGCC
 rw30r GGCCTGATTCCCACAGGGCG
 rw31f GAGCTCAACCACAAACATTGACCTG
 rw31r CAGGTCAATGTTTGTGGTTGAGCTC
 rw32f GAGCTCAACCACACTATATGACCTG
 rw32r CAGGTCATATAGTGTGGTTGAGCTC
 rw33f GCCCTGTGGGACCGTCCCCGTCC
 rw33r GGACGGGGACGGTCCCACAGGGC
 rw34f GAGCTCAACCACACTTGACCTG
 rw34r CAGGTCAAGTGTGGTTGAGCTC
 rw38f CTGAAACATTGACGTACGCC
 rw38r GGGCGTACGTCAATGTTTTAG
 rw39f CTGAACTATATGACGTACGCC
 rw39r GGGCGTACGTCATATAGTTCAG
 rw40f CTGAACTTGACGTACGCC
 rw40r GGGCGTACGTCAAGTTCAG
 rw41f TGGCTTTTCTTATGAGTGAATTC
 rw41r GAATTCCTCATAAGAAAAGCCA
 rw42f GCACACTCACTTTCAACC
 rw42.1f GCACACTCACTTTCAACCTGGGGG
 rw42r GGTTGAAAGTGAGTGTGC
 rw43f CCCTGTGGGACCTTACCCGTC
 rw43.1f CCCTGTGGGACCTTACCCGTCCAAAAGC
 rw43r GACGGGTAAGGTCCCACAGGG
 rw44f CCCTGTGGGACCGTAACCGTC
 rw44r GACGGTTACGGTCCCACAGGG
 rw45f CCCTGTGGGACCCATGCCGTC
 rw45r GACGGCATGGGTCCCACAGGG
 rw46f GGGGCACAGCCAATTTCTTTTC
 rw46r GAAAAGAAATTGGCTGTGCCCC
 rw47f CCCTGTGGGACCTTTCCGTCCAAAAGC
 rw47r GCTTTTGGACGGAAAAGGTCCCACAGGG
 rw48f CTGAACTAAATGACGTACGCC
 rw48r GGGCGTACGTCATTTAGTTCAG
 rw49f GGCTTTTCTTATGAGTGAATTCATCGG
 rw49r CCGATGAATTCCTCATAAGAAAAGCC
 rw50f CGTACGCCCTGTGGGACCCTCGCCG
 rw50r CGGCGAGGGTCCCACAGGGCGTACG
 rw51f GGCTTTTCTTATGATTGAATTCATCGGATTGGG

rw51r CCCAATCCGATGAATTCAATCATAAGAAAAGCC
 rw52f CCCTGTGGGACCGTCTCCGTCC
 rw52r GGACGGAGACGGTCCCACAGGG
 rw53f GGCTTTTCTTATCAGGGAATTCATCGG
 rw53r CCGATGAATTCCTGATAAGAAAAGCC
 rw54f CCCTGTGGGACCCAGGCTGTCC
 rw54r GGACAGCCTGGGTCCCACAGGG
 rw55f GTCCAAAAACACACTCGTGTTTC
 rw55r GAACACGAGTGTGTTTTGGAC
 rw56f GCACACTCTATTTCAACCTGGGGGGCAC
 rw56r GTGCCCCCAGGTTGAAATAGAGTGTGC
 rw57f CCTGACTGAACTTGATGACGTACG
 rw57r CGTACGTCATCAAGTTCAGTCAGG
 rw58f CCCTGTGGGACCCAGGGCGTCC
 rw58r GGACGCCCTGGGTCCCACAGGG
 rw59f GTCCAAAACCACACTCGTGTTTC
 rw59r GAACACGAGTGTGGTTTTGGAC
 rw60f CCTGACTGAACTAGTTGACGTACG
 rw60r CGTACGTCAACTAGTTCAGTCAGG
 rw61f CGTACGCCCTGTGGGACCCACTCCG
 rw61.1f TGTGGGACCCACTCCGTCCAAAAGCACACTCG
 rw61r CGGAGTGGGTCCCACAGGGCGTACG
 rw62f CCCAGGCCGACCAAAAAGCACAC
 rw62r GTGTGCTTTTGGTCGGCCTGGG
 rw63f GTGAACAACCAAAGGGGCACAACC
 rw63r GGTTGTGCCCTTTGGTTGTTTAC
 rw64f CCCAACAAATGAGTGAATTCATCGGATTGGG
 rw64r CCCAATCCGATGAATTCATCTATTTGTTGGG
 rw65f TGTGGGACCCACTCCGACCAAAAAGCACACAAG
 rw65r CTTGTGTGCTTTTGGTCGGAGTGGGTCCCACA
 Rw66f CCTGGGGGGCACAACCAAAGGCCCAACAAATG
 rw66r CAGACATTTGTTGGGCCTTTGGTTGTGCCCCCAGG
 rw67f GGGGCCACAAAAAAGGACCCAACAATGTCTGAATTCATCGG
 rw67r CCGATGAATTCAGACATTGTTGGGTCTTTTTTTGTGGCCCC
 rw68f GGTGAAACCAATGGGGGGCCACAAAAAAGGACC
 rw68r GTGGCCCCCATTGGTTTACCG
 rw69f CCAACACACACCACCAAAAACCCCCCTC
 rw69r GTTTTGGTGGTGTGTGTTGTTTGGCCCC
 rw70f GCCACAAACCAGGACCCAACAATG
 rw70r GTCCTGGTTTGTGGCCCCCATTGG
 rwPE1 CGGCACCTGCAAGTCCC
 rePE2 CGGCACCTGCAAGTCCCAATCCG
 rwPE3 CGGCACCTGCAAGTCCCAATCCG
 rw1347seq GTGATGCTCGTCAGGGGGGCG

Puffer und Lösungen

Acrylamid-Harnstoff-Gel

Präparativ

20 % v/v 40 % Acrylamid-Bisacrylamid Lösung (19:1)

8 M Harnstoff

10 % v/v 10 x TBE

0,08 % w/v APS

0,09 % w/v TEMED

Analytisch

20 % v/v 40 % Acrylamid-Bisacrylamid Lösung (19:1)

7 M Harnstoff

10 % v/v 10 x TBE

0,08 % w/v APS

0,09 % w/v TEMED

Acrylamid-SDS-PAGE-Gel

Sammelgel

12 % v/v 40% Acrylamid-Bisacrylamid Lösung (29:1)

12,5 % v/v 3 x Jagow Gelpuffer

0,08 % w/v APS

0,09 % w/v TEMED

Trenngel

25 % v/v 40% Acrylamid-Bisacrylamid Lösung (29:1)

33 % v/v 3 x Jagow Gelpuffer

5,5 % v/v Glycerin

0,05 % w/v APS

0,05 % w/v TEMED

BMK-Puffer

80 mM Natriumborat

60 mM Kaliumchlorid

12 mM Magnesiumchlorid

pH: 8,1 mit Natriumhydroxid-Lösung

Coomassie-Stammlösung

50 % v/v Methanol

10 % v/v Essigsäure

0,25 % w/v Serva Blue G

DNA-Ladepuffer

0,125 % w/v Orange G

15 % w/v Ficoll 400

5 x TAE-Puffer

Entfärber

30 % v/v Methanol

3% v/v Glycerin

Fixierlösung

30 % v/v Methanol

10 % v/v Essigsäure

+ Coomassie-Stammlösung

HMK-Puffer

20 mM HEPES

60 mM Kaliumchlorid

12 mM Magnesiumchlorid

pH: 7,9 mit Kaliumhydroxid-Lösung

Jagow-Anodenpuffer (10x)

2 M Tris

pH 8,1 mit HCL

Jagow-Gelpuffer (3x)

3 M TrisHCl

0,3 % w/v SDS

Jagow-Kathodenpuffer (10x)

1 M TrisHCl

1 M Tricine

LB++-Medium

10 mM Kaliumchlorid

20

20 mM Magnesiumsulfat

In LB-Medium

LB-Medium

1 % w/v BactoTryptone

0,5 % w/v BactoYeastExtract

0,5 % w/v Natriumchlorid

LB-Agarplatten

1,5 % w/v BactoAgar

In LB-Medium

Markierungsmedium

DMEM

+ 4 mM Glutamin

+1 mM Natriumpyruvat

Mini-Präparationslösung I

50 mM Tris

10 mM EDTA

50 mM Glucose

pH: 8,0 mit HCl

Mini-Präparationslösung II

200 mM Natriumhydroxid

1 % v/v Triton X-100

Mini-Präparationslösung III

3 M Natriumacetat

pH: 4,8 mit Essigsäure

PBS

0,5 mM Magnesiumchlorid

0,9 mM Calciumchlorid

137 mM Natriumchlorid

2,7 mM Kaliumchlorid

RIP-Puffer 1

1 % v/v Triton X-100

0,1 % w/v DOC

0,1 % w/v SDS

20 mM Tris

100 mM Natriumchlorid

1 mM EDTA

2 mg/l BSA

pH: 7,6 mit HCl

RIP-Puffer 2

1 % v/v Triton X-100

0,5 % w/v DOC

0,1 % w/v SDS

20 mM Tris

100 mM Natriumchlorid

1 mM EDTA

pH: 7,6 mit HCl

RIP-Puffer 3

0,2 % (v/v) Triton X-100

20 mM Tris

100 mM Natriumchlorid

1 mM EDTA

pH: 7,6 mit HCl

RIP-Puffer 4

0,06 % v/v Triton X-100

6 mM Natriumchlorid

30 mM Tris

0,3 mM EDTA

pH 7,6 mit HCl

RIP-Probenpuffer

62,5	mM	Tris
2 %	w/v	SDS
10 %	v/v	Glycerol
6	M	β -Mercapto-Ethanol
5 %	v/v	Harnstoff
0,01 %	w/v	Bromphenolblau
0,01 %	w/v	Phenol-Rot

pH: 6,8 mit HCl

Sucrose-Lösung

25 %	w/v	Sucrose
1 %	v/v	Triton X-100
0,5 %	w/v	DOC
0,1 %	w/v	SDS
20	mM	Tris
100	mM	Natriumchlorid
1	mM	EDTA
2	mg/l	BSA

pH: 7,6 mit HCl

TAE (10x)

400	mM	Natriumacetat
50	mM	Tris
10	mM	EDTA

pH: 7,8 mit HCl

TBE (10x)

500	mM	Tris
500	mM	Borsäure
10	mM	EDTA

Vorgefertigt Systeme (Kits)

BigDye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Nucleo-Spin®-Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleobond®Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel, Düren
SP6 Ribomax Kit	Promega, Mannheim

Zellkulturmedien

Wurden von der Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts auf der Insel Riems bezogen, mit Ausnahme von DMEM, welches von Invitrogen® bezogen wurde.

Methoden

1 Bakterien

1.1 Transformation von kompetenten Bakterien-Zellen mit Plasmiden

0,5 – 10 µl der zu transformierenden Plasmide wurden zu 50 µl kompetenten E.coli Top 10 Zellen gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock auf 42°C für 2 min, anschließende 2 min auf Eis. Die Zugabe von 200 µl LB++ Medium und eine anschließende Inkubation auf 37°C für mindestens 30 min schlossen die Transformation ab. Zur Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien wurde der Transformationsansatz anschließend auf LB-Agar-Platten mit dem benötigten Selektionsantibiotikum ausplattiert und bei 37°C für 12 - 16 h inkubiert. Im Falle einer Re-Transformation wurde der Transformationsansatz in eine Bakterienkultur für eine Plasmid-Präparation im mittleren Maßstab überführt.

1.2 Bakterienkulturen für Plasmid-Präparationen im Minimal Maßstab (Mini-Kultur)

5 ml LB-Medium mit dem gewünschten Selektionsantibiotikum (meist Ampicillin) wurden mit Bakterien von LB-Agar-Platten angeimpft. Diese inkubierten bei 37°C unter Schütteln mindestens 8 h bei High-Copy Plasmiden bzw. über Nacht. Low-Copy Plasmid-Kulturen wurden generell über Nacht (mindestens 14 h) inkubiert.

1.3 Bakterienkulturen für Plasmid-Präparationen im Mittleren Maßstab (Midi-Kultur)

Diese Kulturen hatten ein Volumen von 100 ml (High-Copy Plasmide) oder 200 ml (Low-Copy Plasmide) LB-Medium mit einem Selektionsantibiotikum. Zum Animpfen der Kulturen dienten entweder 0,5 - 1 ml einer Mini-Kultur oder ein Ansatz frisch transformierte Bakterien. Die Kulturen inkubierten für 12 - 16 h bei 37°C unter Schütteln.

1.4 Präparation von Plasmid-DNA im Minimal Maßstab (Mini-Präparation)

Von den Mini-Kulturen wurden 1,5 ml (High-Copy Plasmide) bzw. 3 ml (Low-Copy Plasmide) 10 min bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Lösung 1 aufgenommen. Nach dem vollständigen Resuspendieren des Pellets wurde Lösung 2 hinzugegeben um die Bakterienzellen zu lysieren, dies erfolgte für 5 min auf Eis. Die Lyse wurde durch Zugabe von 150 µl Lösung 3 abgestoppt, es folgte eine Inkubation für 10 min auf Eis. Grobe Zellreste, die denaturierten Proteine und genomische DNA wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei 16000 x

g für 10 min pelletiert. Anschließend erfolgte die Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß, welches 400 µl Isopropanol zur Fällung der Plasmid DNA enthielt. High-Copy Plasmid-Präparationen wurden umgehend bei 16000 x g abzentrifugiert. Low-Copy Plasmid-Präparationen wurden hingegen vor der Zentrifugation mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und es folgte ein Wasch-Schritt mit 200 µl Isopropanol für 5 min bei 16000 x g. Auch diesmal wurde der Überstand verworfen und das Pellet anschließend getrocknet. Zum Lösen der DNA wurde zu dem Wasser noch 10-20 µg RNaseA zugegeben, um die RNA zu hydrolysieren.

1.5 Präparation von Plasmid-DNA im Mittleren Maßstab (Midi-Präparation)

Die Kulturen wurden bei 4°C 15 min bei 5000 x g abzentrifugiert. Die Aufreinigung der Midi-Kulturen erfolgte über das Kit "NucleoBond® Xtra Midi" von Macherey-Nagel nach Anleitung des Herstellers bei High-Copy Plasmiden. Im Falle von Low-Copy Plasmiden wurden entsprechend den Herstellervorgaben die Puffervolumina angepasst. Zusätzlich wurde der Durchfluss nach dem ersten Auftragen auf die NucleoBond®-Säule aufgefangen und ein zweites Mal über die Säule gegeben. Zusammen mit einer Inkubation für 30 min auf Eis, nach Zugabe des Isopropanols, konnte die Ausbeute an Plasmid deutlich erhöht und trotzdem Plasmid-DNA in vergleichbarer Reinheit erhalten werden. Die Qualität und Quantität der Präparation wurde photometrisch bestimmt.

2 Zellkultur

2.1 Zellkulturarbeiten für transiente Expression

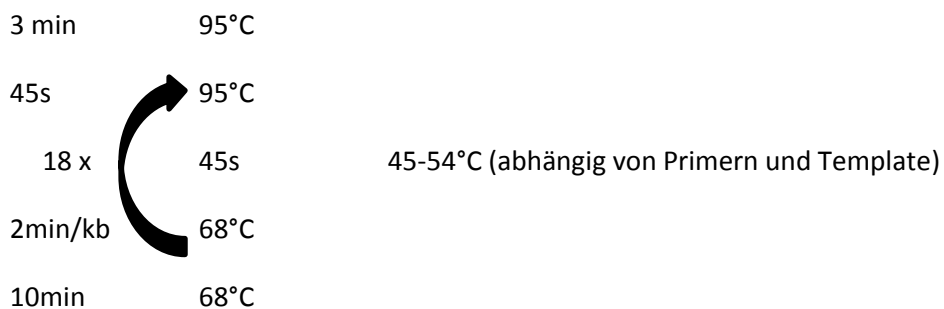
24 h vor Beginn des Experiments wurden BHK-Zellen in 3 cm Kulturschalen ausgesät. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass die Zellen zu Beginn des Experiments eine Konfluenz von ca. 70 % aufwiesen. Um für die Infektion mit Vaccinia MVA günstige Bedingungen zu schaffen, wurde in serumfreiem Medium gearbeitet. Um das Serum zu entfernen, wurde zunächst der Überstand abgenommen und die Schalen anschließend mit je 2 ml Medium ZB5D (serumfrei) gewaschen. Die Infektion mit Vaccinia erfolgte mit einer M.O.I. von 5 in 1 ml serumfreiem Medium; dieses wurde für 1 h bei 37°C auf den Zellen gelassen. Während der Infektion wurden 5 µg der zu transfizierenden DNA in 75 µl serumfreiem Medium mit 10µl SuperFect® versetzt und durch mehrmaliges Vortexen gemischt. Das Gemisch wurde 5 – 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Infektion 1 h inkubiert hatte, wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen. Als nächster Schritt wurde der Transfektionsansatz zusammen mit 600 µl Medium ZB5 auf die Zellen gegeben und für 4 h bei 37°C inkubiert. Danach folgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit je 2 ml Markierungsmedium, um Reste des Methionin/Cystein haltigen Mediums zu entfernen. Die Zellen wurden danach mit 1 ml Markierungsmedium versetzt und hungerten für 1 h bei 37°C in dem Medium ohne Methionin und Cystein. Vor der folgenden radioaktiven Markierung wurden die Schalen abermals einmal mit je 2 ml Markierungsmedium gewaschen. Die eigentliche Markierung erfolgte mit einem Mix aus Markierungsmedium und 17 µl (1µCi/µl)³⁵S-markiertem Methionin/Cystein-Mix mit einem Volumen von 600 µl pro Schale. Die Zellen wurden bei 37°C über Nacht in dem Medium inkubiert. Am nächsten Morgen, nach ca. 12-15 h, erfolgte die Ernte der Zellen. Dazu wurde der Überstand entfernt, die Zellen einmal mit 600 µl PBS gewaschen und nach Entfernung des PBS bei -70°C für mindestens 30 min eingefroren.

3 DNA basierte Methoden

3.1 Quik®-Change-PCR (QC-PCR)

Mutationen wurden mittels QC-PCR in Plasmide eingeführt, dabei werden Primer verwendet, welche die gewünschte Mutation tragen und im Bereich dieser Mutation überlappen. Die Primer sind in forward und reverse Konfiguration vorhanden und erlauben so die Amplifikation von kodierendem und Gegenstrang mit der gewünschten Mutation. Die neu synthetisierten Stränge tragen die gewünschte Mutation durch ihren Primer. In dieser Form ist diese Technik nur mit methylierter DNA möglich. Die Template DNA wird nach der PCR mit dem Enzym *DpnI* abgebaut, welches nur methylierte DNA hydrolysiert und somit das PCR-Produkt intakt lässt. Die Produkte des forward und reverse Primers sind komplementär zueinander und können sich zusammen lagern. Sie bilden dadurch ein lineares DNA Plasmid, welches im Anschluss in *E.coli* Top 10 transformiert werden kann und dort vor der Replikation zirkularisiert wird.

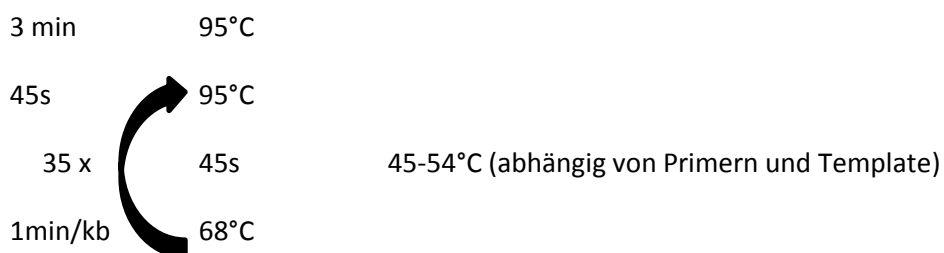
Programm:



3.2 Vier Primer PCR

In den Fällen in denen die QC-PCR nicht zum Erfolg führte, wurde die Vier Primer PCR durchgeführt. Dazu wurden im 1. Schritt der forward und der reverse Primer der QC-PCR mit anderen Primern, die nahe der Zielsequenz für die Mutation lagen, zu Paaren zusammengeführt. Es wurden somit zwei Reaktionen mit der Kombination QC-Primer forward/Primer X reverse bzw. QC-Primer reverse Primer/Y forward durchgeführt. Es entstanden zwei PCR Fragmente die durch die komplementären QC-Primer überlappten. Diese Fragmente wurden mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, ausgeschnitten und eluiert. Die gereinigten Produkte wurden gemischt und im 2. Schritt wurde eine PCR mit den Primern X und Y durchgeführt. Durch die komplementären Bereiche beider Produkte aus den PCRs des ersten Schrittes konnten sich diese zusammenlagern und es entstand ein Fusionsprodukt, welches sehr gut amplifiziert wurde. Das amplifizierte Produkt wurde anschließend mit Restriktionsenzymen hydrolysiert, so dass es in den ursprünglichen Zielvektor, der ebenfalls mit denselben Enzymen behandelt wurde, ligiert werden konnte.

Programm



10min 68°C

3.3 Enzymatische Hydrolyse von DNA

Enzymatische Hydrolyse wurde durchgeführt, um Klonierungen zu ermöglichen (Bsp.: Vier Primer PCR), Plasmide auf das Vorhandensein einer gewünschten Mutation zu untersuchen („Testspaltung“) oder Templates für die *in-vitro* Transkription zu erhalten. Dazu wurden das/die benötigte(n) Enzym(e) in dem für diese Reaktion empfohlenen Puffer bei der für die Reaktion erforderlichen Temperatur inkubiert. Der Erfolg der Reaktion wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen von DNA-Fragmenten wurden bei Raumtemperatur mittels T4-DNA-Ligase durchgeführt. Der Vektor für die Ligation wurde zuvor dephosphoryliert und das Insert im Überschuss zugegeben (ca. 5-6:1). Nach ca. 30 min wurde die Hälfte der Reaktion im E.coli Top 10 transformiert.

3.5 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte über eine PCR-Reaktion, unter Verwendung des BigDye® Terminator Sequencing Kits. Bei dieser Methode findet ein Kettenabbruch durch den Einbau eines fluoreszenz-markierten ddNTPs statt. Weil jedes ddNTP spezifisch markiert ist, kann das Ergebnis über einen Sequenzierautomaten ausgelesen werden.

3.6 In-Vitro Transkription

Das Template wurde zunächst mittels enzymatischer Hydrolyse geschnitten, so dass ein spezifisches 3' Ende entstand. Nach der Hydrolyse wurde das Template über ein Agarosegel gereinigt, um ungeschnittenen Vektor zu entfernen, und dann aus dem Gel extrahiert. Die Transkription wurde mit dem RiboMaXX Large Scale RNA Production System durchgeführt, Template-abhängig entweder mit dem SP6- oder T7-RNA-Polymerase basierten System. Die Reaktion wurde auf 37°C für 4 h mit ca. 5 µg Template durchgeführt, dieses wurde anschließend für 10 min mit der im Kit enthaltenen RNase-freien DNase hydrolysiert. Um nicht inkorporierte Nukleotide zu entfernen, wurde das Produkt anschließend über eine mit Sephadex G50 gefüllte Säule gereinigt, zuletzt wurde die RNA Konzentration photometrisch bestimmt.

3.7 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen und anderen Verunreinigungen wurden Phenol-Chloroform-Extraktionen angewandt. Dazu wurde die Probe mit dem gleichen Volumen wassergesättigtem, stabilisiertem Phenol (pH:7,5) versetzt und durch Schütteln vermischt. Nach einer Zentrifugation bei 14000 x g für 3 min wurde der wässrige Überstand abgenommen und zu einem gleichen Volumen Chloroform gegeben. Die Misch- und Zentrifugationsschritte wurden wiederholt, anschließend erfolgte der Übertrag des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß zur Ethanol-fällung.

3.8 Ethanol-fällung

Die Probe wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 0,1 Volumen 3M Natriumacetat versetzt, anschließend für mindestens 30 min auf -70°C bzw. -78°C inkubiert und danach mit 16000 x g 30 min bei 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte ein Waschschriff mit 150 µl 75% Ethanol, mit einer Zentrifugation mit 16000 x g bei 4°C für 10 min. Zuletzt wurde der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Je nach Verwendungszweck ist das Pellet in autoklaviertem Milipore gereinigtem Wasser oder Nuklease-freiem Wasser aufgenommen worden.

3.9 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden Gele mit einem Agarosegehalt von 1 % bzw. bei kurzen DNA Fragmenten 2 % verwendet. Die Agarose war in TAE Puffer gelöst. Je nach benötigter Auflösung des Gels liefen diese bei 80 bzw. 100 V für 15-60 min in TAE Puffer.

3.10 Dephosphorylierung von Plasmiden

Um eine Ligation des Vektorrückgrates mit sich selbst (anstatt mit dem gewünschten Insert) zu verhindern, wurden die Vektoren schon während der Behandlung mit Restriktionsenzymen mit 1 U Alkalischer Phosphatase versetzt. Durch diese Behandlung wird das 5' Phosphat entfernt, so dass keine Ligation mit dem 3' OH möglich ist. Die Phosphatase musste vor der Ligation entfernt werden. Dies wurde durch Agarose-Gelelektrophorese erreicht.

3.11 Radioaktive Markierung von DNA-Primern

Für die Visualisierung der Produkte der Reversen Transkription auf Filmen wurde eine radioaktive Markierung der cDNA benötigt. Diese wurde durch die Übertragung des γ -Phosphates von ^{32}P - γ -ATP mittels T4 Polynukleotidkinase auf den Primer erreicht. Die Reaktion fand im T4 Polynukleotidkinasepuffer statt, es wurden 20 U Enzym verwendet. Im Anschluss an die 2,5 h dauernde Inkubation bei 37°C, erfolgte eine Reinigung über eine Sephadex G15 Säule und anschließend eine Phenol-Chloroform-Extraktion, nach dem Protokoll, welches in der RNA Sektion beschrieben ist. Zur Fällung wurden 50 μg Hefe tRNA als Fällungshilfsmittel hinzugegeben.

3.12 Gelextraktion

Die Gelextraktion erfolgte über das NucleoSpin GelExtraction Kit von Macherey-Nagel und wurde gemäß dem beiliegenden Protokoll durchgeführt. Die einzige Ausnahme bildete die Aufreinigung von Templates für die In-Vitro Transkription. Für diese Anwendung wurden die Waschschrte mit dem Puffer NT3 um zwei Waschschrte mit 350 μl Puffer erweitert. Die Elution von der Säule erfolgte mit autoklaviertem Milipore Wasser, bzw. im Fall des Templates für In-Vitro Transkription mit Nuklease-freiem Wasser. In der Regel wurden zwei Elutionen mit jeweils 15 μl Wasser durchgeführt.

3.13 Aufreinigung von DNA über Spin-Säulen

Die Aufreinigung erfolgte wie die Gelextraktion mit dem NucleoSpin GelExtraction Kit von Macherey-Nagel gemäß dem beiliegenden Protokoll. Sie wurde vor allem verwendet, um DNA aus Mini-Präparationen für die Sequenzierung aufzureinigen.

3.14 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch, in der Regel wurde eine 1:100 Verdünnung der zu messenden Probe angesetzt.

4 RNA basierte Methoden

4.1 Dephosphorylierung von RNA

Die Dephosphorylierung war notwendig, um die Effizienz der radioaktiven 5' Markierung der RNA zu erhöhen. 10 μg der RNA wurden mit 50 U Antarctic Phosphatase in dem dazugehörigen Puffer versetzt und 1,5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 5 min bei 65°C und eine Reinigung über eine Sephadex G50 Spinsäule.

4.2 Radioaktive Markierung von RNA

Zur Visualisierung der Produkte der partiellen enzymatischen Hydrolyse der RNA über Röntgenfilme wurde eine radioaktive Markierung der RNA benötigt. Dazu wurde dephosphorylierte RNA mit T4 Polynukleotidkinase und ^{32}P - γ -ATP in dem dazugehörigen Puffer versetzt. Die Reaktion erfolgte analog zur Markierung der Primer, allerdings folgte in diesem Fall die Aufreinigung über eine Sephadex G50-Spinsäule. Eine Phenol-Chloroform-Extraktion schloss sich an.

4.3 Reinigung über Sephadex G15/G50-Spin-Säulen

Die Reinigung wurde in sterilen 1 ml Spritzenkörpern durchgeführt. Der Auslass wurde mit Heißluft-serilisierten Whatman® glass microfiber Filtern verschlossen und das Nuklease-freie Sephadex mittels Pipette eingefüllt. Sobald die Spritze vollständig gefüllt war, wurde sie in einer Zentrifuge bei ca. 800 x g für 2 min zentrifugiert. Die Säule wurde dadurch dicht gepackt und konnte, wenn mindestens 700 μl Bettvolumen Sephadex vorhanden waren, verwendet werden. Anderfalls musste nachgefüllt und die Zentrifugation wiederholt werden. Für das Auffangen der Proben wurden Nuklease-freie Eppendorf Tubes verwendet, bei denen vorher der Deckel entfernt wurde. Die zu reinigende Lösung wurde auf 100 μl Volumen aufgefüllt und auf die präparierte Säule gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei ca. 800 x g für 5 min. Wenn das Durchflussvolumen geringer als 80 μl war wurde nochmals zentrifugiert. Das Eluat wurde anschließend in ein neues Nuklease-freies Gefäß überführt.

4.4 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen und anderen Verunreinigungen wurden Phenol-Chloroform-Extraktionen angewandt. Dazu wurde die Probe mit 50 μl wassergesättigtem, stabilisierten Phenol (pH:7,5)/Chloroform im Verhältnis 5:1 versetzt und durch Schütteln vermischt. Nach einer Zentrifugation bei 16000 x g für 3 min wurde der wässrige Überstand abgenommen und in 50 μl Chloroform überführt. Die Misch- und Zentrifugationsschritte wurden wiederholt. Anschließend erfolgte der Übertrag des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß zur Ethanol-fällung.

4.5 Ethanol-fällung

Die Probe wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 0,1 Volumen 3M Natriumacetat versetzt, anschließend für mindestens 30 min auf -70°C bzw. -78°C inkubiert und danach mit 16000 x g 30 min bei 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte ein Waschschriff mit 150 μl 75 % Nuklease-freiem Ethanol, mit einer Zentrifugation mit 16000 x g bei 4°C für 15 min. Zuletzt wurde der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet.

4.6 Präparatives Acrylamid-Harnstoff Gel

Für Strukturaufklärungsexperimente wird homogene RNA benötigt. Verkürzte Produkte die schon aus der In-Vitro Transkription oder durch Abbau der RNA in den weiteren Verarbeitungsschritten stammen, müssen entfernt werden um die Experimente gut auswerten zu können. Dazu wurde die radioaktiv markierte RNA, welche bereits Phenol-Chloroform gereinigt war, nach der Fällung getrocknet und in 10 μl Gelladepuffer (Gel loading buffer II) aufgenommen, für 3 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf ein TBE gepuffertes 8 % Acrylamid 8 M Harnstoff Gel aufgetragen. Das Gel lief bei 320 V und maximal 12 W für 4 h in 1 x TBE-Puffer. Durch diesen Lauf wurden verkürzte RNAs von der Volllänge RNA abgetrennt. Dieselbe Prozedur wurde auch verwendet, um unmarkierte RNA für die chemische Modifikation zu reinigen; dabei wurden 10 μg RNA eingesetzt.

4.7 Gelextraktion

Die RNA musste nach dem Lauf über das präparative Acrylamidgel ausgeschnitten und eluiert werden. Dazu wurde sie über den Schattenwurf, welcher unter UV-Licht auf einer fluorbeschichteten Dünnschichtchromatographieplatte zu sehen war, identifiziert und mittels Skalpell möglichst sauber ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in einem Reaktionsgefäß mit 400 µl 0,5% SDS in Nuklease-freiem Milipore gereinigtem Wasser versetzt und bei 4°C für 48 – 60 h unter Schütteln eluiert. Anschließend folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion sowie eine Ethanolfällung unter Zugabe von 50 µg Hefe tRNA. Als nächstes wurde die RNA getrocknet und die Aktivität des Pellets mit einem Bohrlochzählgerät bestimmt. Zum Lösen wurde die RNA in Nuklease-freiem Milipore Wasser bei 50°C für 5 min geschüttelt. Die Wassermenge wurde so berechnet, dass am Ende eine Aktivität von 500 - 1000 cps/µl im Bohrlochzähler gemessen wurde. Im Falle der unmarkierten RNA musste auf Erfahrungswerte zurückgegriffen werden um die Menge Wasser zum Lösen zu bestimmen, weil keine Aktivitäts- oder Konzentrationsbestimmung (wegen der als Fällungshilfe eingesetzten tRNA) möglich war.

4.8 Alkalische Hydrolyse von RNA

Um eine Hydrolyseleiter zu erhalten, welche jedes mögliche Spaltprodukt der untersuchten RNA enthalten soll, wurde die Alkalische Hydrolyse durchgeführt. Dazu wurden 2 µl der radioaktiv markierten RNA mit 13 µl 1 x Alkaline Hydrolysis Buffer versetzt, durchmischt und gleichmäßig auf drei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Ansätze wurden für 4, 5 bzw. 6 min Reaktionszeit auf 95°C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit erfolgte eine Abkühlung auf Eis und das Abstoppen mit 10 µl Gel Loading Buffer II.

4.9 Partielle enzymatische Hydrolyse zur RNA Sequenzierung

Die RNA wurde mit *RNase T1* sequenziert. Diese Reaktion diente ausschließlich zum Erstellen einer Guanin-Leiter, um auf den Sequenziergelen die Hydrolysefragmente besser zuordnen zu können und im Vergleich mit dem Strukturaufklärungsexperiment mit dem gleichen Enzym erste Strukturinformationen zu erhalten. Die Sequenzen der verwendeten RNAs waren bekannt. Für das Experiment wurden 3 µl der zu untersuchenden, radioaktiv markierten RNA mit 24 µl 1 x RNA Sequencing Buffer versetzt und durchmischt. Als nächster Schritt erfolgte die Aufteilung der 27 µl auf drei Reaktionsgefäße, so dass nachher drei Reaktionsgefäße mit je 9 µl Reaktionsansatz vorlagen. Diese wurden bei 55°C für 5 min denaturiert und dann auf Eis gestellt. Die Reaktionsgefäße wurden mit 1-3 beschriftet. Für die Reaktion wurde zunächst auf Eis das Enzym hinzugegeben. Dazu wurde 1 µl *RNase T1* (1U/µl) zu Reaktionsgefäß 1 gegeben, durch Pipettieren gemischt und anschließend 1 µl aus Reaktionsgefäß 1 in Reaktionsgefäß 2 überführt, ebenfalls durchmischt und von Reaktionsgefäß 2 1 µl in Reaktionsgefäß 3 pipettiert. Nachdem die Reaktionen angesetzt waren, wurden sie für 5 min auf 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte das Abstoppen der Reaktionen mit 20 µl Inactivation/Precipitation Buffer. Nach dem Abstoppen wurden die Reaktionen für mindestens 30 min auf -20°C inkubiert und dann für 30 min bei 4°C und 20800 x g pelletiert. Die Pellets wurden in einer SpeedVacc getrocknet und anschließend in 7 µl Gel Loading Buffer II aufgenommen.

4.10 Partielle enzymatische Hydrolyse von RNA zur Strukturaufklärung

Bei der partiellen enzymatischen Hydrolyse wurde radioaktiv markierte RNA zu Sekundärstrukturaufklärungszwecken mit Enzymen versetzt. Diese Reaktionen wurden nach kurzer Zeit gestoppt, damit der größte Teil der RNA nur 1 x modifiziert („single hit“) vorlag. In dieser Arbeit wurden die Enzyme *RNase A*, spezifisch für die ungepaarten Basen Cytosin und Uracil, *RNase T1*, spezifisch für ungepaartes Guanin, *RNase V1*, spezifisch für gepaarte Nukleotide und *S1-Nuklease*,

welche spezifisch für ungepaarte Basen ist, eingesetzt. Die Reaktionen der RNasen erfolgten in 1 x RNA Structure Buffer, die der *S1-Nuklease* in 1 x Nuclease Reaktion Buffer. Für die Reaktionen wurden jeweils 36 µl Reaktionslösung angesetzt bestehend aus 4 µl 10 x RNA Structure Buffer (bzw. 10 x Nuclease Reaktion Buffer bei *S1-Nuklease*), 28 µl Nuklease-freiem H₂O und 4 µl RNA. Nach gründlichem Mischen wurden die Lösungen auf vier Reaktionsgefäße a 9 µl aufgeteilt, stichprobenartig wurde die Aktivität der einzelnen Reaktionsgefäße gemessen, um die gleichmäßige Aufteilung der RNA zu überprüfen. Diese wurden anschließend bei 55°C für 5 min denaturiert und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Vor der Enzymzugabe wurden die Gefäße auf Eis gestellt und mit 0-3 (*RNase T1*) bzw. 0 und 2-4 *RNase A* und *S1-Nuklease* beschriftet. Das jeweilige Gefäß, welches mit 0 beschriftet war diente als Pufferkontrolle und wurde nicht mit Enzym versetzt, die mit 1-3 bzw. 2-4 beschrifteten hingegen schon. Die Enzymzugabe und Verdünnung erfolgten nach dem gleichen Prinzip wie bei der Sequenzierung beschrieben. Die Abweichung der Beschriftung bei *RNase A* und *S1-Nuklease* resultierte aus der Notwendigkeit diese vorzuverdünnen, bei *S1-Nuklease* (100U/µl) war dies eine 1:10 bzw. bei *RNase A* (1 µg/µl) eine 1:20 Verdünnung in gepufferter Lösung ohne RNA, von der nach demselben Schema wie in bisher weiter verdünnt wurde. *RNase V1* wurde ohne 0-Kontrolle bearbeitet, weil sie den gleichen Puffer wie die anderen RNasen verwendete und somit keine weitere Pufferkontrolle notwendig war. Die auf Eis stehenden Reaktionsansätze wurden anschließend für je 5 min bei 37°C inkubiert und mit 20 µl Inactivation/Precipitation Buffer gestoppt. Die weiteren Reaktionsschritte sind ebenfalls mit der Sequenzierung der RNA identisch.

4.11 Partielle chemische Modifikation von RNA zur Strukturaufklärung

Ergänzend zu der enzymatischen Strukturaufklärung wurde die chemische Modifikation von RNA durchgeführt. Diese erfolgte mit RNA welche nicht markiert war, aber über ein präparatives Acrylamid-Harnstoff Gel gereinigt wurde. Es wurden die Chemikalien *Dimethylsulfat (DMS)*, modifiziert die ungepaarten Basen Adenin und Cytosin, *N-Cyclohexyl-N'-(morpholinoethyl)carbodiimide metho-p-toulene-sulfonat (CMCT)*, modifiziert ungepaartes Guanin und Uracil verwendet. Diese führen nicht zur Spaltung der RNA und sind nur über Reverse Transkription auslesbar. Das zusätzlich verwendete *Bleiacetat* spaltet ssRNA und wäre so auch ohne Reverse Transkription auslesbar, wurde in dieser Arbeit allerdings auch nur über das RT-System ausgelesen. Dieses System hat den Zusatznutzen, dass die Chemikalien sehr viel kleiner sind als Enzyme und daher sehr viel geringer sterisch gehemmt werden. *DMS* macht zusätzlich die Adenine sichtbar, was nur bei den basenunspezifischen Enzymen der Fall war. Die RNA wurde in HMK-Puffer, für *DMS*-Modifikation und Bleispaltung, oder BMK-Puffer bei *CMCT*-Modifikation versetzt und mit Nuklease-freiem H₂O soweit aufgefüllt, dass mit der jeweils eingesetzten Reagenzien Menge ein Gesamtvolumen von 10 µl erreicht wurde. Es gab auch hier eine Kontrollreaktion nur mit dem jeweiligen Puffer, die genau wie die Proben behandelt wurden. Die Reaktionsgefäße wurden bei 55°C für 5 min denaturiert, langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend auf Eis platziert. Die Chemikalien wurden, wie schon die Enzyme, in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Von reinem *DMS* wurden 1,5 µl bzw. 1 µl oder 0,5 µl eingesetzt. *Bleiacetat* wurde in Konzentrationen von 10 mM, 5 mM bzw. 1 mM eingesetzt. Beide Reaktionen liefen für 5 min bei 37°C und wurden durch Zugabe von 50 µl Phenol mischen und platzieren auf Eis abgestoppt. *CMCT* wurde in Konzentrationen von 25 mM, 12,5 mM und 10 mM eingesetzt. Die Reaktion lief für 10 min bei 37°C, gestoppt wurde auch hier durch Zugabe von Phenol und kühlen auf Eis. Zu den Reaktionsgefäßen wurden jeweils 50 µl Wasser gegeben, gevortext und wie bei Phenol-Chloroform-Extraktion üblich zentrifugiert. Nach Übertrag der wässrigen Phase in 100 µl Chloroform wurde die phenolische Phase allerdings erneut mit 50 µl H₂O versetzt und nochmals ausgeschüttelt, zentrifugiert und der wässrige Überstand mit

der ersten Extraktion vereinigt, so dass wieder eine Lösung/Chloroform Volumensverhältnis von 1:1 bestand. Die weiteren Schritte sind identisch mit der normalen Phenol-Chloroform-Extraktion. Das Pellet wurde nach der Ethanol-fällung getrocknet, in 5 µl Nuklease-freiem H₂O aufgenommen und für 3 min bei 50 °C geschüttelt. Diese Lösung ist das Template für die Reverse Transkription.

4.12 Reverse Transkription

2,2 µl der chemisch modifizierten RNA wurden als Template für die Reverse Transkription eingesetzt, als Kontrolle wurde ebenfalls 1 µl unbehandelter RNA verwendet. Für die Reaktion wurde die RNA mit 1 µl ³²P-markiertem Primer versetzt und bei 65°C für 5 min denaturiert, es folgte langsames Abkühlen auf Raumtemperatur. Anschließend wurde der RT-Mix zugegeben, bestehend aus 2 µl 5 x RT-Puffer, 3,3 µl 5 M Betain, 0,5 µl 10 mM dNTP-Mix, 10 U Reverse Transkriptase und Nuklease-freiem Wasser, womit die Reaktionsgefäße auf 10 µl aufgefüllt wurden. Die Reaktion lief für 30 min auf 50 °C. Anschließend wurde die Template RNA mittels 1 U RNase A abgebaut und zwar im Thermo-Cycler bei einem Programm das zunächst 15 min 37°C, 5 min 95°C, 10 min 37°C und anschließend auf 37°C gehalten wurde. Die zwischenzeitliche Denaturierung, war notwendig um die DNA-RNA-Hybriden zu trennen und die RNA vollständig abzubauen. Der letzte Schritt war die Zugabe von 10 µl Gel Loading Buffer II.

4.13 Acrylamid-Harnstoff-Sequenziergel

4.13.1 Gießen

Das Sequenziergel wurde verwendet, um die Produkte der RNA-Strukturaufklärungsreaktionen aufzutrennen. Im Laufe dieser Arbeit wurden verschiedene Acrylamid-konzentrationen von 4 % - 10 % getestet, 8 %ige Gele stellten sich als die geeignetste Variante dar und wurden standartmäßig verwendet. Das Gel enthielt außerdem 7 M Harnstoff und war mit 1 x TBE-Puffer gepuffert. Die verwendeten Glasplatten wurden vor dem Gießen behandelt und zwar die große Platte mit Repel-Silane um ein Anheften des Gels zu verhindern und beim Abbau des Gels dieses auf der kleinen Platte zu haben, welche mit Bind-Silane beschichtet war. Die Gele wurden mindestens zwei Stunden vor dem Gelvorlauf gegossen.

4.13.2 Gellauf

Der Gellauf erfolgte ebenfalls in 1 x TBE-Laufpuffer bei 48 W. Vor dem eigentlichen Lauf wurden Sie für 30 min durch einen Vorlauf aufgeheizt. Um eine gleichmäßigere Temperaturverteilung zu erreichen, wurden Aluminiumplatten an beiden Seiten der Glasplatten, zwischen denen sich das Gel befand, befestigt. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 3 min bei 95°C denaturiert. Die durchschnittliche Laufzeit betrug 1 h 45 min, mit einer Abweichung von +/- 10 min, denn nicht die Zeit sondern die Laufstrecke des Gels war entscheidend. In dem verwendeten Ladepuffer waren zwei Farbstoffe enthalten und das Gel lief so lange, bis die Bromphenolblau-Bande ca. 7 cm vom unteren Ende des Gels entfernt war. Nach dem Lauf wurden die Glasplatten vorsichtig voneinander gelöst, die Binde-Platte mit dem darauf haftenden Gel mit Frischhaltefolie bedeckt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Exposition erfolgte für ca. 38 bis 60 h bei -70 °C.

5 Methoden zur Proteinanalyse

5.1 Aufarbeiten der Proben der transienten Expression

5.1.1 Zellaufschluss

Nach dem Einfrieren wurden die Zellen mit 500 µl RIP-Lösung 1 von den Schalen gespült und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, in welchen 50 µl 10 % SDS vorgelegt waren. Diese wurden für 10 min bei 95°C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren, anschließend kurz auf Eis abgekühlt und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Als Nächstes folgte ein Zentrifugationsschritt bei 2000 x g für 5 min, um die groben Zellreste zu pelletieren. Die Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt, welche für Ultrazentrifugation geeignet waren, und auf +/- 20 mg austariert. Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 4°C und 91300 x g für 1 h. Während diese lief, wurden 4 ml Röhrchen vorbereitet, in denen je 2 ml RIP-Lösung 1 vorgelegt wurden. Nach der Ultrazentrifugation wurde der Überstand in diese Röhrchen überführt, so dass pro Schale ca. 2,5 ml Lösung erhalten wurde.

5.1.2 Immunpräzipitation

Für die Fällung wurden Kaninchen-Antiseren gegen die RHDV Strukturproteine VP1 und VP2 verwendet. Dazu wurden 5 µl des jeweiligen Antiserums in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und 100 µl bei VP1 Fällung bzw. 500 µl bei VP2 Fällung des Zelllysates zugegeben. Nach gründlichem Vermischen der Lösungen erfolgte eine Inkubation von 1 h bei 37°C gefolgt von 1 h bei 4°C. Der nächste Schritt war die Zugabe von Staphylococcus Aureus Protein A, um die Protein-Antikörper Komplexe zu fällen. Diese Fällung wurde für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt und die Proben währenddessen dreimal gevortext. Anschließend erfolgte eine Inkubation für mindestens 12 h bei 4°C. Zur Aufarbeitung wurden die Proben gevortext um die Komplexe wieder in Lösung zu bringen, anschließend erfolgte eine Unterschichtung mit 25 % Sucrose-Lösung. Die so präparierten Proben wurden für 10 min bei 2000 x g zentrifugiert, um die Antikörper-ProteinA-Komplexe mit ihren gebundenen Zielproteinen zu pelletieren. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand der VP2-Fällung verworfen. Mit dem Überstand der VP1-Fällung hingegen wurde eine erneute Fällung mit VP1-Antiserum durchgeführt. Die Durchführung entsprach der ersten Fällung, nur dass der komplette Überstand verwendet wurde. Alle Fällungen wurden nach dem folgenden Schema aufgearbeitet. Zuerst wurden die Pellets in 700 µl RIP-Lösung 2 durch Vortexen resuspendiert, anschließend für 5 min bei 2000 x g erneut gefällt und der Überstand verworfen. Als nächstes folgte ein identischer Waschschrift, allerdings mit 700µl RIP-Lösung 3. Nach diesem Waschschrift wurden die Pellets in 5 µl (VP1), oder 10 µl (VP2) RIP-Lösung 4 resuspendiert und 25 µl (VP1) bzw. 50 µl (VP2) Verdauungslösung hinzugegeben. Nach einer Inkubation für 3 min auf 95°C, welche dazu diente die Proteine von den Antikörpern zu lösen folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 8000 x g. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, dabei wurden die 2 VP1-Fällungen der jeweiligen Probe vereinigt, so dass am Ende jede Probe 50 µl VP1- und 50 µl VP2-Präparation enthielt.

5.2 SDS-Acrylamid Gele

In dieser Arbeit wurden 10 % SDS-Acrylamidgele mit einem Sammelgel zur Proteinauftrennung verwendet, diese liefen in Jagow-Gelpuffer. Die Proben wurden vor dem Auftragen 3 min bei 95 °C denaturiert, danach kurz zentrifugiert und vollständig auf das Gel geladen. Der Gellauf erfolgte über Nacht bei 40-60 V. Nachdem die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt und die Apparatur abgebaut. Zur Vorbereitung der Trocknung wurden die Gele 30 min in der Fixierlösung fixiert und anschließend mindestens 3 h in Entfärber geschwenkt. Dabei sollte Glycerin in das Gel eindringen und es reißfester machen. Anschließend erfolgte die

Trocknung auf dem Geltdrockner bei 54°C unter Vakuum. Die trockenen Gele wurden in Frischhaltefolie eingeschlagen und auf Phosphoimager-Bildplatten exponiert. Auf ausgewählte Gele wurden auch Röntgenfilme aufgelegt.

Ergebnisse

1. Methodik

In dieser Arbeit wurden Struktur-Funktions-Beziehungen der TURBS-Region in der sg mRNA des RHDV untersucht. Die TURBS ist essentiell für die Expression des minoren Kapsidproteins VP2. Sie sorgt für die Reinitiation der Translation nach Termination der Synthese des Hauptkapsidproteins VP1. Für die nachfolgend beschriebene Analyse sind zwei Methoden verwendet worden, zum einen ein Sekundärstrukturaufklärungssystem und zum anderen ein System zur transienten Expression der RHDV-Strukturproteine in Zellkultur. Beide Methoden ergänzen sich, weil über die Expressionsexperimente der Einfluss von Veränderungen in der TURBS-Region auf ihre Funktion untersucht werden kann. Die Strukturaufklärung liefert hingegen Hinweise auf interessante Kandidaten für gezielte Mutationen und kann helfen den Grund des Funktionsverlustes, welcher bei vielen TURBS-Varianten beobachtet werden kann, zu bestimmen. Abb. 2 zeigt ein TURBS-Modell, welches zu Beginn dieser Arbeit vorlag.

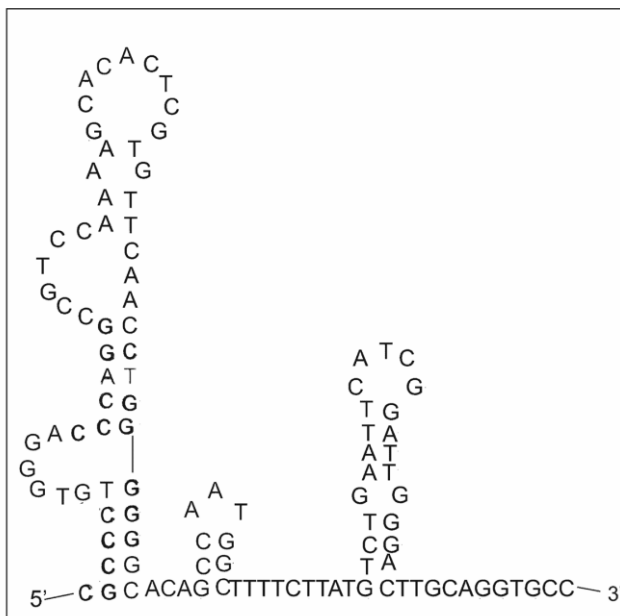


Abb. 2 modifizierte Darstellung des TURBS-Modells aus der Arbeit von F.Kreher (Kreher 2009)

1.1 Konstrukte

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits Deletionsmutanten der TURBS sowie einige Substitutionen und Insertionen auf ihre Reinitiationseffizienz untersucht. Diese Experimente wurden auf Basis des pRmRNA-Konstruktes (Meyers 2003), im Weiteren als *pExp* bezeichnet, durchgeführt, welches die ORFs und NTRs der sg mRNA des RHDV trägt. Nachdem mittels Mutationsanalysen bereits wichtige Erkenntnisse zum Einfluss von Primärstrukturelementen der TURBS auf die Reinitiation gewonnen worden waren, sollte die Bedeutung von Sekundärstrukturelementen

untersucht werden. Zu Beginn dieser Arbeit sollte ein System zur Aufklärung der RNA-Sekundärstruktur verbessert werden. Dazu wurde das Konstrukt *pStr* erstellt. Dieses enthält die TURBS samt flankierenden Sequenzen und einen *SP6-RNA-Polymerase* Promotor, um eine *in-vitro* Transkription zu ermöglichen. Zur Generierung von RNAs mit homogenen Enden wurden *EcoRV* Schnittstellen 5' und 3' seitig eingeführt. Die Konstrukte sind schematisch in Abb. 3 dargestellt.

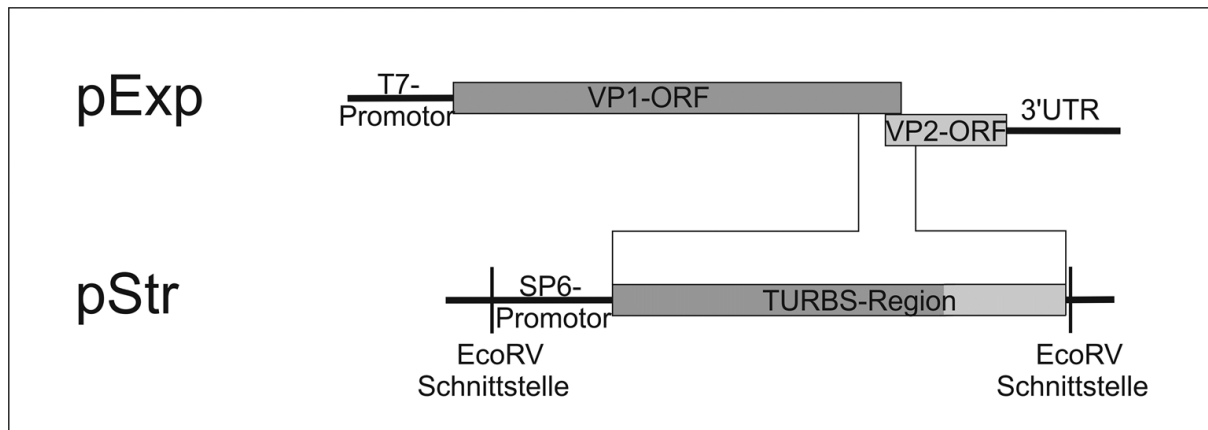


Abb. 3 schematische Darstellung der Expressions- und Strukturaufklärungskonstrukte [modifiziert nach (Meyers 2003)]

Die in folgenden behandelten Vektoren *pExp* und *pStr* mit identischer Nummerierung tragen die identischen Mutationen in der TURBS-Region.

1.2 Transiente Expression

Die Untersuchung der Funktionsfähigkeit der verschiedenen TURBS-Varianten wurde mit einem transienten Expressionssystem in Zellkultur durchgeführt. Bei dem Experiment wurden Vaccinia-MVA-T7 infizierte BHK-Zellen mit den entsprechenden *pExp*-Konstrukten transfiziert. Die Proteine wurden mit ³⁵S-markiertem Methionin und Cystein markiert. Nach einer Inkubation über Nacht wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die Lysate mit gegen VP1 bzw. VP2 gerichteten Antiseren versetzt. Nach einer Fällung erfolgte das Auftrennen der Proteine mittels Gelelektrophorese. Zur Auswertung wurden die Mengen an VP1 und VP2 am Phosphoimager bestimmt und in Beziehung gesetzt. Dieses Verhältnis wurde mit dem für das Wildtyp-Konstrukt ermittelten Wert verglichen.

1.3 Strukturaufklärungsexperiment mit 5' markierter RNA

Die *in-vitro* Transkription zur Erstellung der RNA für die Experimente wurde mit SP6-RNA-Polymerase durchgeführt. Als DNA-Vorlage diente das mit *EcoRV* gespaltene und über ein Agarosegel gereinigte Konstrukt *pStr*. Die für die Transkription als Vorlage benutzte DNA-Sequenz ist in Abb. 4 dargestellt. Die transkribierte RNA wurde anschließend dephosphoryliert, um die Effizienz der nachfolgenden 5' ³²P-Markierung zu erhöhen. Um verkürzte RNA-Moleküle zu entfernen, fand eine Reinigung über ein Acrylamid-Harnstoff Gel statt. Die gereinigte RNA konnte für die Strukturaufklärungsexperimente verwendet werden.

<u>pStr</u>	
1	GAGCTCAACC AACTCATTG ACCTGACTGA ACTCATTGAC GTACGCCCTG TGGGACCCAG
61	GCCGTCCAAA AGCACACTCG TGTTCAACCT GGGGGGCACA GCCAATGGCT TTTCTTATGT
121	CTGAATTCAT CGGATTGGGA CTTGCAGGTG CCGAT

Abb. 4 zeigt die *pStr*-Sequenz, die *in-vitro* transkribiert wurde, in schwarz: RHDV Sequenz, in grau: Fremdsequenz. Die Nummerierung erfolgte hier wie auch im Folgenden nach der Nummerierung der TURBS-Sequenz in den Struktur- aufklärungsexperimenten. Die ersten drei Basen sind konstruktionsbedingt nicht identisch zur Wildtyp-TURBS, genauso wie die letzten zwei. Diese terminalen Bereiche liegen allerdings außerhalb der eigentlichen TURBS und werden aufgrund ihrer terminalen Lage bei der Strukturanalyse ohnehin nicht betrachtet.

Zur Analyse der Sekundärstrukturen wurde mit vier Enzymen gearbeitet, welche RNA spezifisch spalten. Es kamen *RNase A*, spezifisch für einzelsträngiges Cytosin und Uracil, *RNase T1*, spezifisch für einzelsträngiges Guanin, *RNase V1*, spezifisch für dsRNA und *S1-Nuklease*, spezifisch für einzelstränge Nukleinsäuren zum Einsatz. Mit diesen Enzymen wurden Experimente in Puffern durchgeführt, welche die RNA-Strukturen erhalten sollen. Zusätzlich wurde mit *RNase T1* ein Sequenzierexperiment durchgeführt, bei dem mit denaturierter RNA gearbeitet wurde, um eine Leiter aller Guanine zu erhalten. Zur Auftrennung der Fragmente wurde ein Acryamid-Harnstoff Gel verwendet. Zusätzlich zu den Enzymreaktionen wurde bei der Elektrophorese noch eine Spur mit unbehandelter RNA (0-Kontrolle) sowie drei Spuren mit alkalisch hydrolysiertes RNA (Leiter) aufgetragen. Die Visualisierung der 5'-Spaltprodukte erfolgte durch Exposition gegen Röntgenfilme.

1.4 Strukturaufklärungsexperimente mit nicht markierter RNA

Es wurde RNA aus *in-vitro* Transkriptionsansätzen verwendet, wie sie auch für die später markierte RNA verwendet wurde. Allerdings erfolgte in diesen Analysen gleich im Anschluss an die Transkription die Aufreinigung über das Acryamid-Harnstoff Gel. Die gereinigte RNA wurde dann auf verschiedene Arten weiter prozessiert. Eine Vorgehensweise war die Behandlung mit *RNasen*, entsprechend dem oben beschriebenen Prinzip. Eine weitere Variante war die Behandlung mit *DMS*, das einzelsträngiges Adenin und Cytosin modifiziert, oder mit *CMCT*, welches einzelsträngiges Guanin und Thymin modifiziert, oder *Pb²⁺*-Ionen. Diese spalten einzelsträngige RNA. Die Produkte wurden als Matrize in eine reverse Transkription (RT) eingesetzt. An dieser Stelle erfolgte die Markierung der Reaktionsprodukte, weil 5' ³²P-markierte Primer verwendet wurden, welche 3' seitig an die RNA binden können. Zusätzlich wurde auch unbehandelte RNA in die RT-Reaktion eingesetzt (0-Kontrolle) und zwei Ansätze mit unbehandelter RNA und Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an ddNTPs (Sequenzierung) durchgeführt. Die Auftrennung und Visualisierung war mit der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Technik identisch.

2. Enzymatische Strukturaufklärung der TURBS

2.1 Optimierung der Technik

Mit der Etablierung der enzymatischen Strukturaufklärung wurde bereits von F. Kreher in seiner Diplomarbeit begonnen. Ein Bildausschnitt aus dieser Arbeit ist in Abb. 5 zu sehen. Man kann

deutlich Hintergrundbanden in der 0-Spur erkennen. Die Stärke dieser Hintergrundbanden variierte, so dass bei einigen TURBS-Varianten mit dem übernommenen Protokoll zu prominente Hintergrundbanden sichtbar waren und das Verfahren weiter optimiert werden musste.

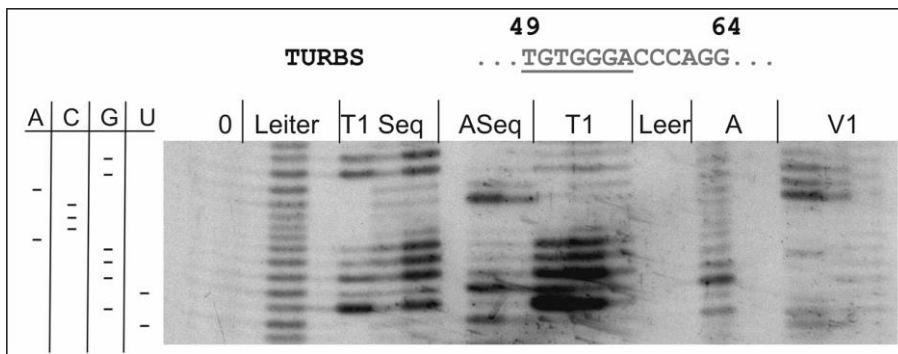


Abb. 5 zeigt einen Ausschnitt aus einem Ergebnis der Strukturanalyse der RHDV-TURBS aus der Diplomarbeit von F. Kreher (Kreher 2009). Die Sequenz des Abschnitts ist sowohl über dem Gelbild dargestellt, als auch an der linken Seite mit Strichen markiert. In der Sequenzdarstellung ist die Sequenz des *Motiv 1* unterstrichen. Die Spuren sind mit den verwendeten Enzymen gekennzeichnet. Die Abkürzung Seq bezeichnet ein Sequenzierexperiment mit entfalteter RNA.

Zunächst gab es mit dem ursprünglichen Konstrukt, welches auf dem Vektorrückgrat von *pBluescript* basierte, Probleme. Es wurde bereits in der Arbeit von F. Kreher nachgewiesen, dass bei der „run-off“ Transkription mit linearisiertem Konstrukt nicht nur das erwartete TURBS-Fragment transkribiert wurde, sondern drei weitere längere Fragmente entstanden (Kreher 2009). Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels PCR eine zusätzliche *EcoRV*-Spaltstelle eingeführt, so dass das Fragment das die TURBS hinter einem *SP6-RNA-Polymerase* Promotor enthält, vom Vektorrückgrat abgespalten und getrennt aufgereinigt werden konnte. Zusätzlich wurden flankierend die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *BamHI* und *NotI* eingeführt, über diese wurde das Fragment in das Vektorrückgrat des in der Arbeitsgruppe vorhandenen Konstruktes *p1347* eingefügt (Abb. 6). Das resultierende Konstrukt *pStr* und seine Varianten bildeten die Basis für fast alle in dieser Arbeit für die Strukturaufklärung eingesetzten RNAs.

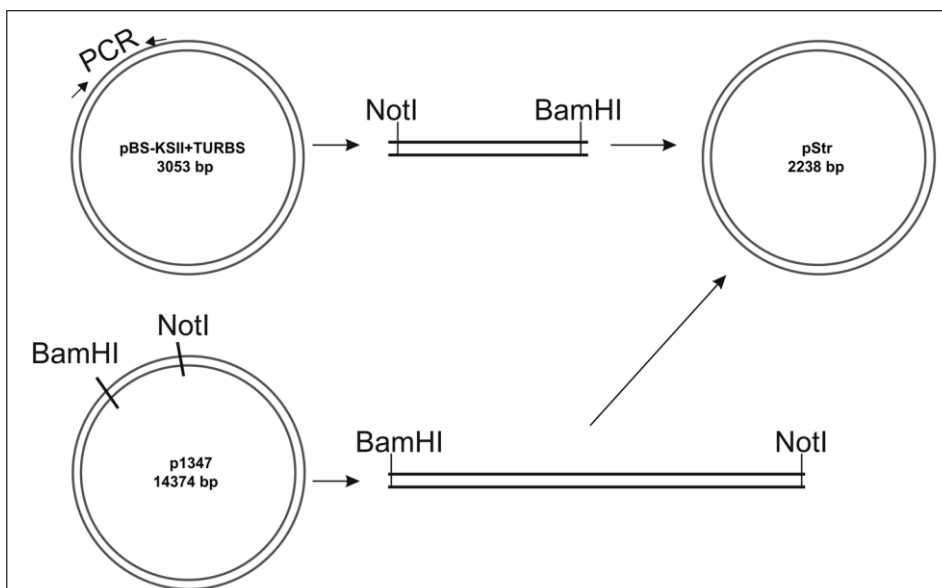


Abb. 6 schematische Darstellung der Klonierung des Konstruktes *pStr*. Mittels PCR wurde das Fragment, welches die RHDV-TURBS hinter einem Promotor für die *SP6-RNA-Polymerase* enthält, ausgehend vom Konstrukt *pBS-KSII+TURBS* herausamplifiziert und 5' mit einer weiteren *EcoRV*-Schnittstelle versehen. Außerdem wurden die für die Klonierung benötigten Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *NotI* und *BamHI* eingeführt. Nach Restriktion des PCR-

Produktes und des Konstruktes *p1347* mit *NotI* und *BamHI* und anschließender Reinigung mittels Gelelektrophorese wurde das PCR-Produkt in das Rückgrat des Konstruktes *p1347* eingesetzt.

Zusätzlich wurde die Methode zur Elution der radioaktiv markierten RNA aus dem präparativen Acrylamidgel verändert. Nach dem ursprünglichen Protokoll war diese bei 65 °C über Nacht durchgeführt worden. Allerdings stellte es sich heraus, dass die Qualität der eluierten RNA davon profitierte, wenn diese Elution bei 4 °C durchgeführt wurde. Allerdings musste wegen der langsameren Diffusion die Elutionszeit auf 48-60 h erhöht werden. Zusätzlich wurde die Sequenzierreaktion mit *RNase A* durch ein Strukturaufklärungsexperiment mit *S1-Nuklease* ersetzt. Durch die *S1-Nuklease* erhält man ein zur *RNase V1* komplementäres Spaltproduktmuster, weil *S1-Nuklease* an allen einzelsträgigen Nukleotiden spaltet. Außerdem ist sie das einzige der verwendeten Enzyme, welches Adenin in ssRNA erkennt. Des Weiteren wurden die Enzym-Reaktionen in dieser Arbeit bei 37 °C durchgeführt, anstatt bei Raumtemperatur. Die Erhöhung der Reaktionstemperatur ermöglichte kürzere Reaktionszeiten, weil die Temperaturoptima der Enzyme bei 37 °C liegen. Zusätzlich ist dies auch die physiologische Temperatur, bei der die TURBS in infizierten Kaninchen ihre Funktion ausführt. Es konnten allerdings keine grundsätzlichen Unterschiede der Strukturen bei Raumtemperatur bzw. 37 °C festgestellt werden, nur manche vorhandene Signale wurden bei 37 °C verstärkt und der Hintergrund weiter verringert (vgl. Abb. 8). Auch die Zusammensetzung der Sequenziergele wurde verändert. Während ursprünglich 6 % Acrylamid und 8 M Harnstoff verwendet wurden, hat sich 8 % Acrylamid und 7 M Harnstoff als vorteilhaft für die Auftrennung erwiesen.

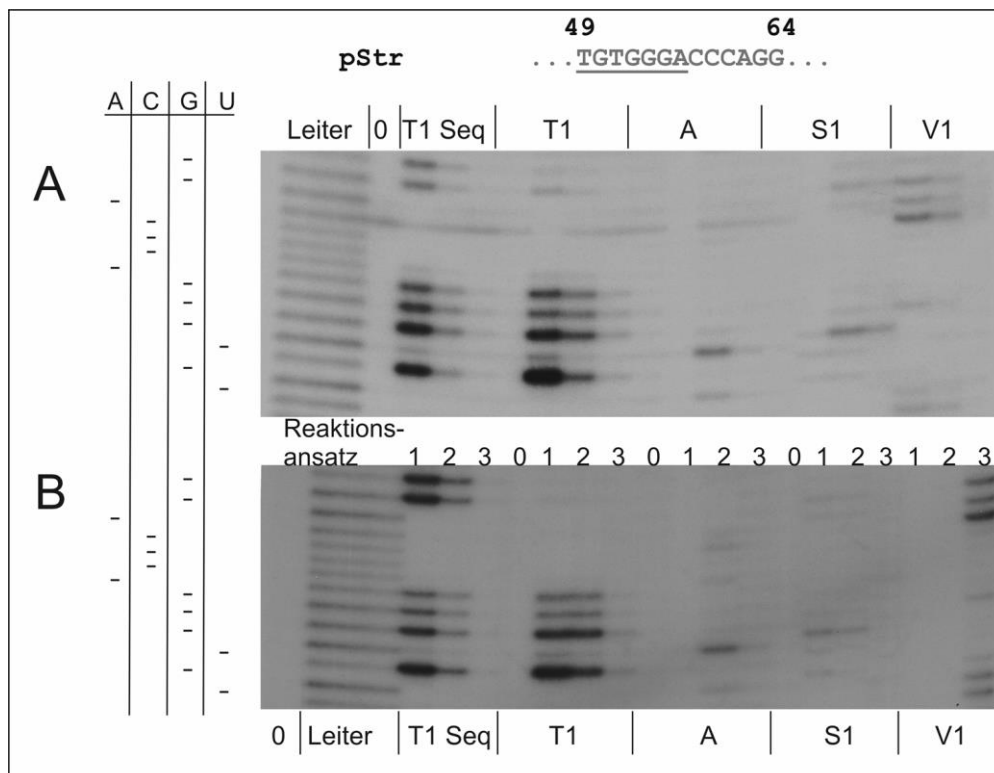
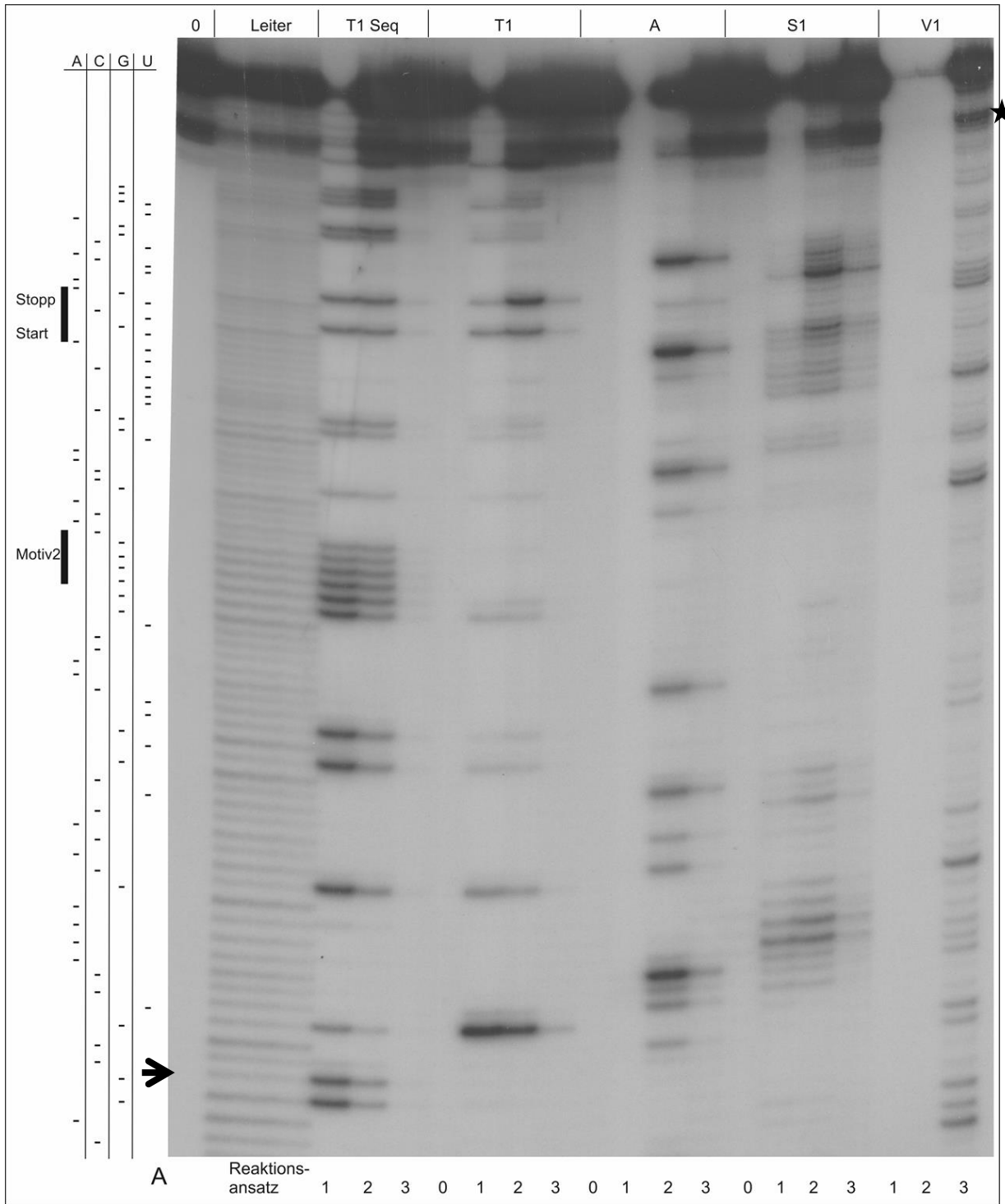


Abb. 7 zeigt den gleichen Ausschnitt der RHDV-TURBS wie Abb. 5. Die gezeigte Sequenz ist zum einen über den Gelbildern gezeigt, *Motiv 1* ist unterstrichen. Am linken Rand sind die jeweiligen Basen durch Striche markiert. (A) zeigt ein Experiment, bei dem die RNA bei 4 °C eluiert wurde. Die Enzymbehandlung erfolgte bei Raumtemperatur für 10 min. (B) Zeigt identisch aufgereinigte RNA, welche bei 37 °C für 5 min mit den Enzymen behandelt wurde. Die Spaltmuster sind bei beiden Temperaturen identisch, allerdings ist der Hintergrund bei dem unter (B) gezeigten Experiment geringer.

2.2 Ergebnisse der Strukturaufklärung für die Wildtyp-TURBS

In der vorliegenden Arbeit wurde als erstes die Sekundärstruktur der Wildtyp-TURBS des RHDV untersucht. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Aufklärung der RNA-Sekundärstruktur mittels Nukleasen dargestellt. Die Experimente sind mit RNA, welche ausgehend vom Plasmid *pStr* transkribiert wurde, durchgeführt worden. Ein vollständiges Gelbild ist in Abb. 8 dargestellt. Alle später in dieser Arbeit zum Vergleich mit den Mutanten gezeigten Bildausschnitte für das Wildtyp-Konstrukt *pStr*, stammen aus diesem Bild. Um die Ergebnisse der Experimente interpretieren zu können, muss man beachten, dass nur die RNA-Fragmente sichtbar sind, welche das 5'-Ende der untersuchten RNA tragen, weil nur diese radioaktiv markiert sind. Auf das Gel wurden die Produkte der Enzymreaktionen und zusätzlich eine unbehandelte Kontroll-RNA (0) sowie die Produkte der Alkalischen Hydrolyse (Leiter) aufgetragen. Die unbehandelte RNA erfüllt die wichtige Funktion aufzuzeigen, ob schon vor Beginn der Enzymbehandlung verschiedene RNA-Spezies vorhanden waren. Falls in dieser Spur schon prominente Banden zu detektieren sind, können auf gleicher Höhe laufende Banden aus den Enzymreaktionen nicht ausgewertet werden, weil keine Unterscheidung zwischen Reaktionsprodukt und von vorherhin vorhandenem Fragment gemacht werden kann. Eine hohe Qualität der eingesetzten RNA ist also entscheidend für die Informationen, welche ein solches Experiment liefern kann. Die partielle Alkalische Hydrolyse wird mit denaturierter RNA durchgeführt, so dass die Zugänglichkeit zu jeder Base identisch ist. Dies führt zur statistischen Spaltung der RNA. Es entsteht also eine Leiter welche jede Base in der RNA repräsentiert und die Orientierung auf den Gelbildern erleichtert. Auf jedes Gel wurden für die verwendeten Enzyme jeweils drei Reaktionsansätze aufgetragen, diese repräsentieren drei Verdünnungsstufen des Enzyms. Die mit 1 beschriftete Spur enthält die 10 fache Enzymmenge wie die Spur 2 und diese wieder die 10 fache Enzymmenge wie Spur 3. Zusätzlich gibt es bei den Strukturaufklärungsexperimenten noch eine zum jeweiligen Ansatz gehörende 0-Spur, die mit Ausnahme des Enzyms den gleichen Reaktionsmix enthält wie die Reaktionsansätze. Diese wurden identisch wie die Reaktionsansätze behandelt und dienen zur Kontrolle, um RNA-Abbau ohne Enzymzugabe detektieren zu können. Bei *RNase V1* wurde auf die 0-Spur verzichtet, weil die Reagenzien identisch mit den bei *RNase A* und *T1* verwendeten waren. Die mit T1 Seq beschrifteten Spuren repräsentieren die Behandlung von denaturierter RNA mit *RNase T1*, welche für ungepaarte Guanine spezifisch ist. Man erhält also eine Leiter, welche alle Guanine in der RNA zeigt. Weil die Sequenz der RNA bekannt ist, kann man diese Leiter als Orientierungshilfe nutzen- um die Produkte der anderen Reaktionen einem definitiven Sequenzausschnitt zuzuordnen. Die folgenden mit T1 beschrifteten Spuren, repräsentieren das Strukturaufklärungsexperiment mit *RNase T1*. Die eingesetzte Enzymmenge und die Reaktionsbedingungen sind identisch mit dem Sequenzierexperiment, nur der Puffer ist ein anderer. Außerdem fehlt der Denaturierungsschritt. In diesem Experiment sind nur noch die in der nativen Form der RNA ungebundenen Guanine zu sehen, so dass schon durch den Vergleich von Sequenzier- und Strukturaufklärungsexperiment erste Strukturinformationen erhalten werden können.



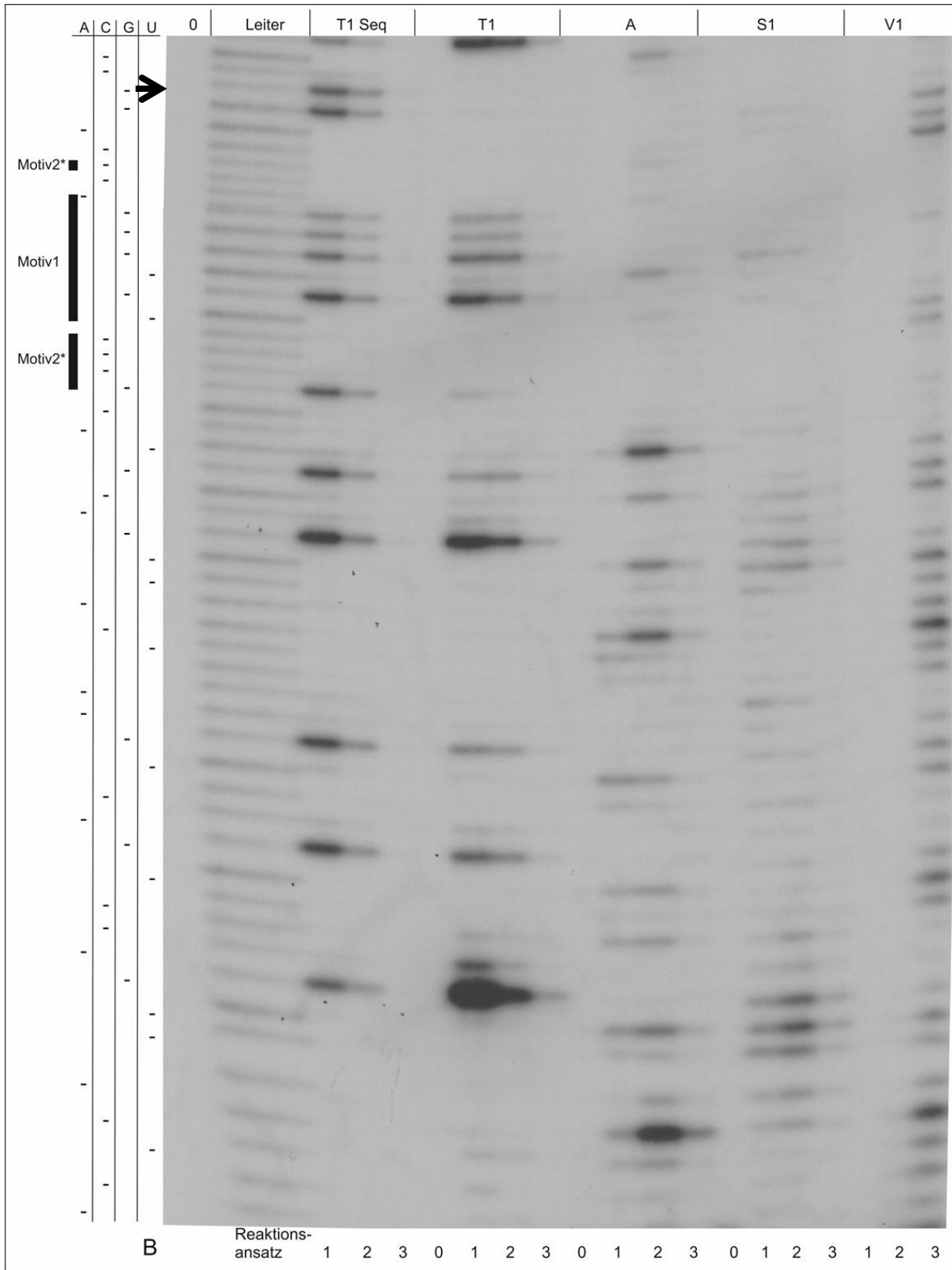


Abb. 8 ist aufgeteilt in (A) und (B). Zusammen zeigen sie ein vollständiges Sequenziergel, auf das die Reaktionsprodukte der enzymatischen Strukturaufklärung der von *pStr* transkribierten RNA aufgetragen wurden. Die schwarzen Pfeile am Rand zeigen die identischen Positionen an, an denen die Bilder überlappen. Jeweils am oberen Rand sind die Produkte bezeichnet, welche aufgetragen wurden. Von links nach rechts liegt folgende Reihenfolge vor: unbehandelte RNA (0), folgend drei Spuren mit Alkalischer Hydrolyse (Leiter), Sequenzierexperiment mit entfalteter RNA und *RNase T1* (T1 Seq), dann die eigentlichen Strukturaufklärungsexperimente mit gefalteter RNA in der Reihenfolge *RNase T1* (T1), *RNase A* (A), *S1-Nuklease* (S1) und schließlich *RNase V1* (V1). Die jeweiligen Enzymverdünnungen sind am unteren Rand angegeben (Verdünungsschema in Material und Methoden). Die Bezeichnungen werden auch im Folgenden wie in dieser Abbildung

verwendet. Teil (A) zeigt die RNA von Base 58-155, (B) von 13-64. Die Spaltprodukte, die weniger als 13 Basen haben, sind nicht auf dem Film abgelichtet. Am oberen Ende von (A) ist die ungespaltene RNA zu erkennen. Der schwarze Stern zeigt zusätzlich eine verkürzte RNA Spezies, welche bei der Aufreinigung der markierten RNA nicht entfernt werden konnte, weil sie zu nah an der unverkürzten RNA lief. Unterhalb dieser Markierung ist das Gel vollständig auswertbar. Die Basenfolge ist am linken Rand durch Striche markiert. Ebenso sind durch Balken die Lage von *Motiv 1*, *Motiv 2* und *Motiv 2** sowie der Start/Stopp-Region markiert.

Mit A überschrieben sind die Strukturaufklärungsexperimente, die mit *RNase A* durchgeführt wurden. Diese spaltet RNA bei den Basen Cytosin und Uracil, wenn sie ungepaart vorliegen. Weiter rechts sind dann, mit S1 beschriftet, die Strukturaufklärungsexperimente mit *S1-Nuklease* aufgetragen. Diese spaltet einzelsträngige RNA (und DNA). Ihr Produktmuster ist somit komplementär zur *RNase V1*, die als nächstes aufgetragen ist und doppelsträngige RNA spaltet.

Die Position der Spaltung des Rückgrates der RNA muss in zwei Gruppen eingeordnet werden, weil die Produkte unterschiedliches Laufverhalten haben. Dies muss bei der Auswertung der Experimente beachtet werden. Während die Spaltung bei *Alkalischer Hydrolyse*, *RNase A* und *T1* 3' des Zielnukleotides erfolgt, spalten *RNase V1* und *S1-Nuklease* 5' seitig ihres Ziels. Schon dadurch ergibt sich eine Veränderung des Laufverhaltens. Zusätzlich unterscheiden sich die Spaltprodukte durch einen Phosphatrest, welcher das Laufverhalten der Hydrolyseprodukte beeinflusst (Ehresmann, Baudin et al. 1987).

In Abb. 8 ist gut zu erkennen, dass nur ein kleiner Teil der TURBS-Region Basenpaare ausbildet. Was an der großen Zahl von Signalen für die einzelstrangspezifischen Enzyme ersichtlich ist. Die teilweise Überlagerung dieser Banden mit Signalen für die *RNase V1* kann damit erklärt werden, dass diese auch Bereiche erkennt, in denen die Ringsysteme der Basen miteinander interagieren, die also sogenanntes „base-stacking“ aufweisen (Draper 1986). Eindeutig gepaarte Bereiche sind in der untersuchten Region offensichtlich in der Minderheit.

3. Primer-Extension Experimente zur Strukturanalyse

Zusätzlich zur enzymatischen Strukturanalyse mit 5' markierter RNA wurden auch Strukturanalyseexperimente mit unmarkierter RNA durchgeführt. Die Markierung erfolgte im Anschluss über eine Reverse Transkription, bei der ein 5' ³²P markierter Primer zum Einsatz kam. Die verwendeten Primer sind in Abb. 9 schematisch dargestellt. Die Primer binden in der 3' Region des analysierten RNA-Moleküls, so dass die 3' seitigen Spaltprodukte visualisiert werden können, im Gegensatz zu der Visualisierung der 5' Spaltprodukte mit der zuvor beschriebenen Technik. Ein Vorteil der „Primer-Extension“ Analyse ist, dass nicht nur Reagenzien eingesetzt werden können, welche die RNA spalten, wie beispielsweise die bereits beschriebenen Nukleasen, sondern auch Reagenzien, welche die Basen modifizieren, so dass keine Basenpaarung mehr möglich ist. Solche Modifikationen inhibieren die Reverse Transkription und sorgen für spezifische Abbrüche bei der cDNA Synthese. Die cDNAs können im Anschluss über ein Sequenziergel aufgetrennt werden. Man erhält damit ebenfalls ein für das eingesetzte Reagenz, spezifisches Produktmuster.

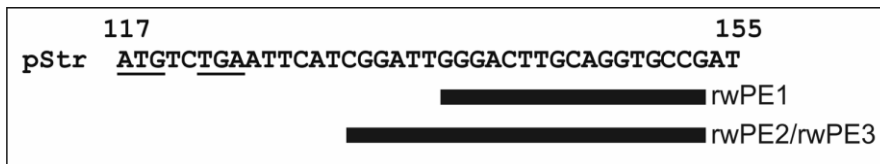


Abb. 9 Darstellung der 3' Region der Test-RNA mit den Bindungsstellen der für die Reverse Transkription verwendeten Primer. Die Primer *rwPE2* und *rwPE3* sind von den Sequenzen identisch. *rwPE3* ist allerdings HPLC gereinigt.

3.1 Etablierung der Technik

Die Technik der Primer-Extension Analyse wurde in dieser Arbeit neu in der Arbeitsgruppe etabliert. Zunächst wurde die in der Arbeitsgruppe vorhandene *AMV Reverse-Transcriptase* des Herstellers LifeSciences verwendet. Das erste Experiment ist in Abb. 10 dargestellt. Die Ergebnisse dieses Experiments waren ernüchternd, weil schon die 0-Spur des Strukturaufklärungsexperiments nahezu eine vollständige Leiter darstellte (0 in der Sektion „T1“). Auch die 0-Spur mit unbehandelter RNA ganz links in Abb.10 zeigt extremen Hintergrund, außerdem ist sie stark überladen und deshalb sind keine definierten Banden sichtbar.

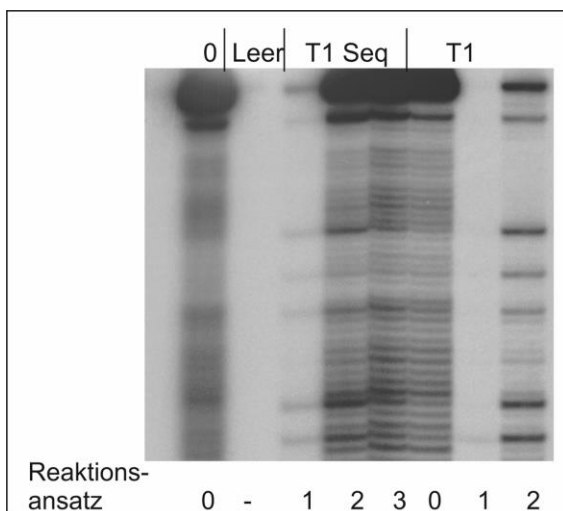


Abb. 10 erster Versuch der Primer Extension Analyse mit nur wenigen Proben. Die Reverse Transkription wurde bei einer Temperatur von 40 °C mit dem Primer *rwPE1* durchgeführt. Zu sehen ist der starke Hintergrund, Die Spuren sind nicht auswertbar.

Es wurden in der Folge andere Reverse Transkriptasen ausprobiert, zum einen die *AMV Reverse Transcriptase* und zum anderen die *RevertAid Premium Reverse Transcriptase*, welche auf der *M-MuLV Reversen Transkriptase* basiert. Die Ergebnisse des Vergleichs sind in Abb. 11 dargestellt. Zum Vergleich wurde auch eine RNA untersucht, welche mit RHDV nichts zu tun hat. Deutlich erkennbar ist, dass diese einen geringeren Hintergrund aufweist.

Auch die Menge an RNA, welche für die Strukturanalyse eingesetzt wurde, sowie die Primerkonzentration (bestimmt an der radioaktiven Zerfallsrate pro Sekunde) wurden variiert. Außerdem wurde ein längerer Primer bestellt um eine bessere Bindung an die RNA zu erreichen, so dass die Temperatur für die Reverse Transkription angehoben werden konnte. Alle diese Optimierungsschritte führten nicht zum gewünschten Resultat, den Hintergrund deutlich zu reduzieren. Zugabe von *DMSO* bzw. *Betain* in verschiedenen Konzentrationen wurde ebenso getestet und brachte eine Verbesserung der Ergebnisse, wobei sich 1,7 M *Betain* in den Reaktionen als die beste Variante herausstellte. Dies wurde bei allen folgenden Experimenten zugesetzt. Ein Gelbild, das die Ergebnisse einer enzymatischen Strukturanalysereaktion nach der optimierten Methode enthält,

ist in Abb. 12 dargestellt. Im unteren Bereich des Bildes ist weiterhin ein starker Hintergrund zu erkennen. Dieser konnte nicht weiter reduziert werden.

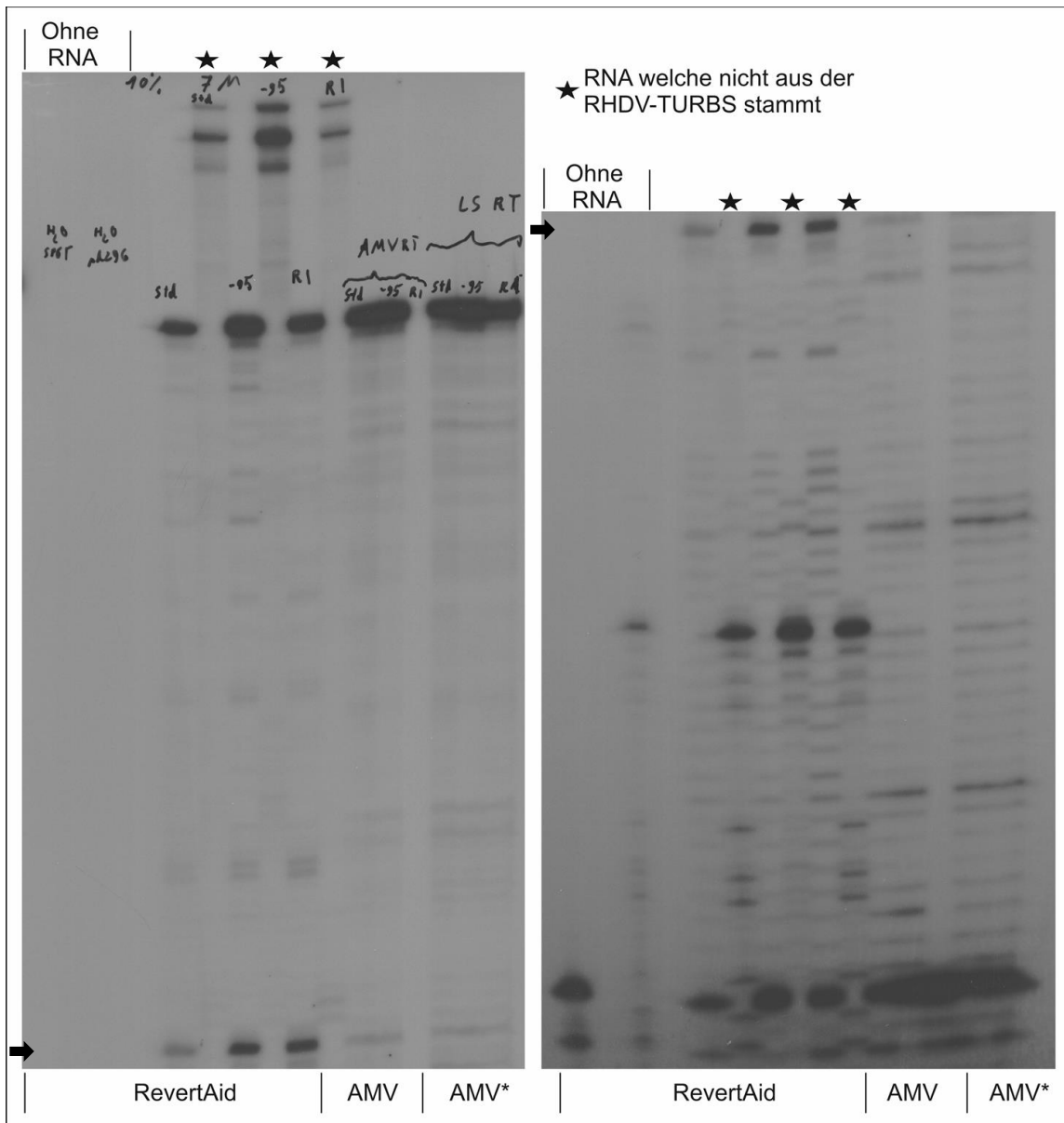


Abb. 11 zeigt in allen Spuren unbehandelte RNA, welche nach drei verschiedenen Protokollen für die Reverse Transkription vorbereitet wurde. Es wurden drei verschiedene Reverse Transkriptasen getestet, zwei *AMV Reverse Transkriptasen* von zwei verschiedenen Herstellern und eine *M-MuIV* basiertes Enzym. Außerdem wurde eine nicht RHDV-RNA ebenfalls getestet (Spuren mit Stern gekennzeichnet).

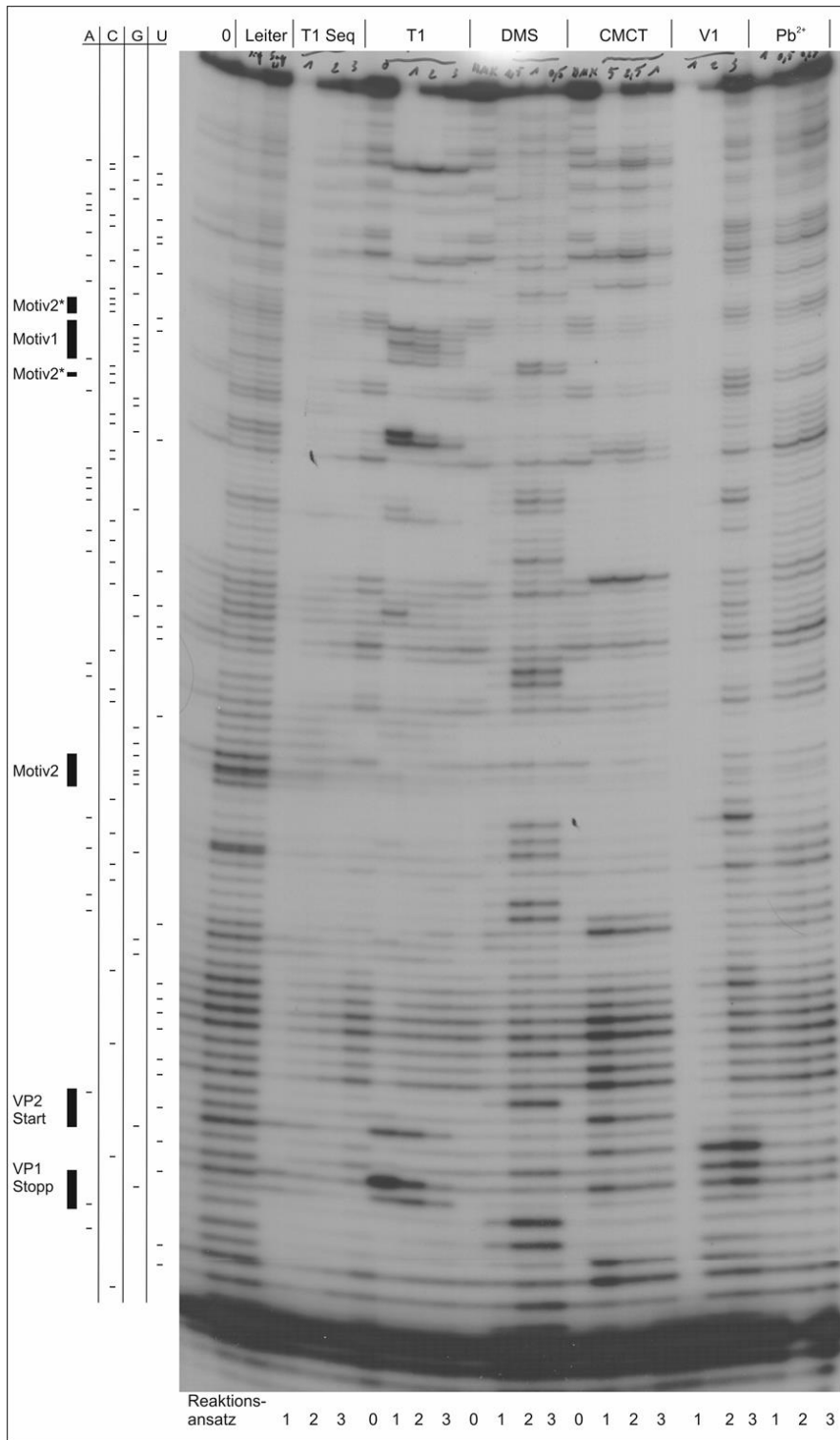


Abb. 12 Zeigt die Produkte eines Experimentes zur Strukturanalyse mittels reverser Transkription von partiell enzymatisch gespaltener *pStr*-RNA. Die Leiter an der linken Seite zeigt die Positionen der Basen. Zu erkennen ist außerdem der starke Hintergrund im unteren Teil des Gels, welcher die Auswertung in diesem Bereich schwierig machte. Die Motive sowie *VP2*-Start und *VP1*-Stopp sind durch Balken gekennzeichnet.

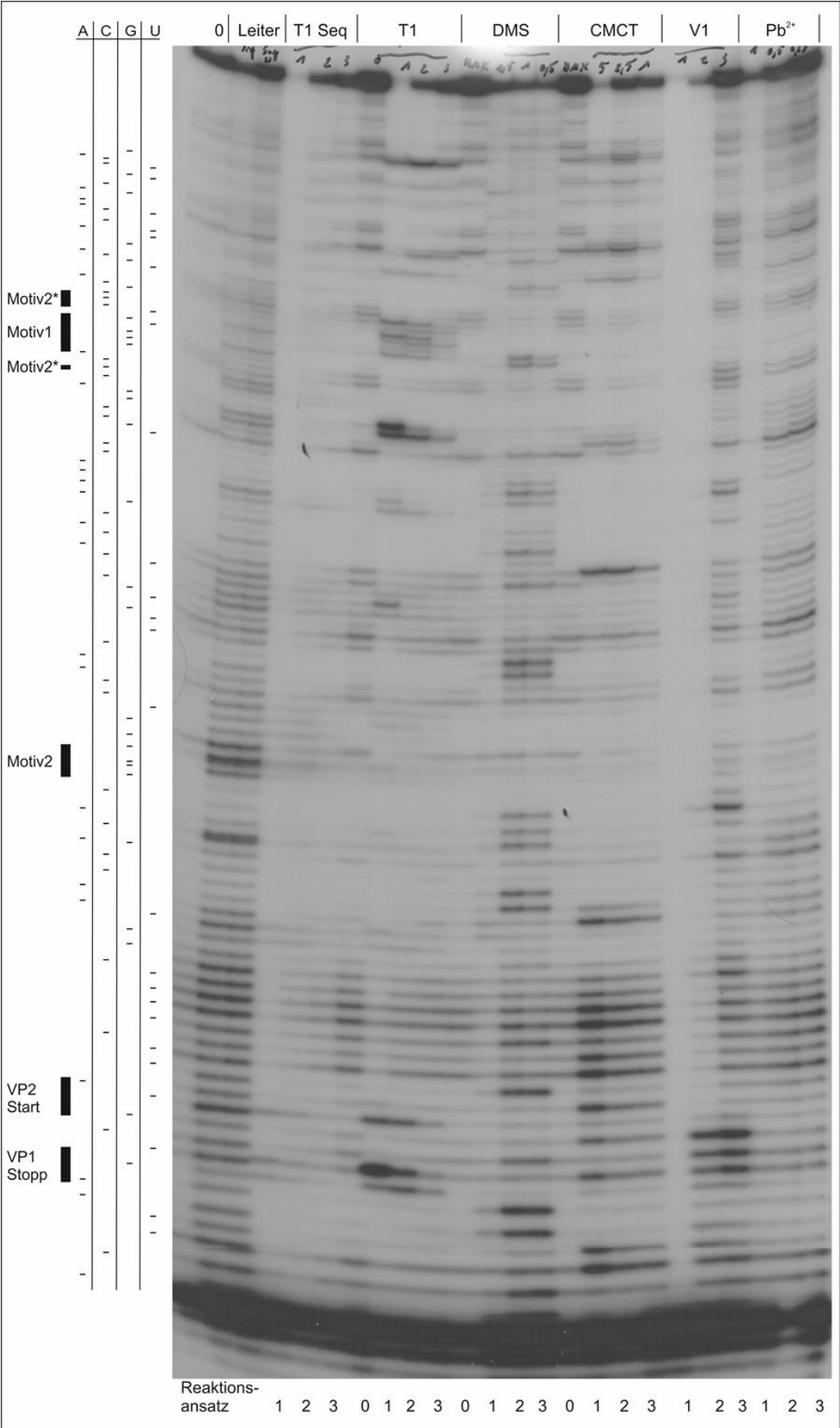


Abb. 13 zeigt ein Ergebnis der chemischen Modifikation von einer von *pStr* abgeleiteten RNA. Die *RNasen T1* und *V1* sind ebenfalls verwendet worden, weil keine Chemikalie verfügbar war, welche dsRNA modifiziert und *RNase T1* mit Guanin-Leiter die Orientierung auf dem Gelbild erleichtert. Auch hier sind die Motive, *VP2-Start* und *VP1-Stopp* mit Balken eingezeichnet. Wie schon bei Abb. 12 erwähnt, ist im unteren Bereich des Bildes also bei den kurzen Fragmenten, der Hintergrund sehr stark und erschwert die Auswertung der Ergebnisse.

Auch in dem in Abb. 13 gezeigten Experiment mit chemisch modifizierter RNA ist der starke Hintergrund zu beobachten. Bei dieser Technik wurde nicht markierte RNA mit *DMS* oder *CMCT* behandelt. Die Chemikalien modifizieren ungepaarte Basen, *DMS*, Adenin und Cytosin, *CMCT*, Guanin und Uracil. Die modifizierten Basen können in der reversen Transkription keine Basenpaarung mehr eingehen, somit führt die Modifikation zum Kettenabbruch. Zusätzlich wurden zweiwertige Bleitionen verwendet, welche basenunspezifisch Einzelstrang-RNA spalten. Die chemische Modifikation brachte zusätzliche Informationen, zum einen aufgrund der von den Enzymen abweichenden Spezifitäten und zum anderen wegen der geringeren Größe der aktiven Reagenzien. Dies reduziert sterische Beeinträchtigungen. So konnte mit *DMS* das Adenin von *Motiv 1* modifiziert werden. Dagegen war mit *S1-Nuklease* eine Spaltung an dieser Stelle nicht zu beobachten.

Insgesamt konnten die Ergebnisse, welche mit der 5' markierten RNA erzielt wurden, durch die Primer-Extension basierten bestätigt werden. Für *Motiv 1* ist an den Signalen zu erkennen, dass es ungepaart vorliegt. Für *RNase V1* sind Signale für die Basen 58-61 zu sehen. Dies spricht für dsRNA, wie im Fall der 5' Markierung auch zu sehen. Auch bei *Motiv 2* kann man im Vergleich der *RNase T1* Ansätze mit gefalteter bzw. denaturierter RNA erkennen, dass das Signal im gefalteten Zustand zurückgeht. Allerdings ist dies nicht so leicht zu sehen, weil schon ein starkes Hintergrundsignal vorliegt. Für die Start/Stopp-Region ist aufgrund des Hintergrunds keine eindeutige Aussage mehr möglich. Auch wenn in den Spuren mit den Reaktionsprodukten von *RNase V1*-Signale vorhanden sind, die über den Hintergrund hinausgehen, kann man höchstens in Verbindung mit der 5' Markierung von einem Hinweis auf dsRNA in diesem Bereich sprechen. Aus Zeitgründen wurde in dieser Arbeit auf eine weitere Optimierung der Technik verzichtet, weil sich kein Anhaltspunkt für einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn ergab und die erhaltenen Daten die Ergebnisse mit 5' markierter RNA nicht in Zweifel zogen. Alle weiteren Analysen wurden mit 5' markierter RNA durchgeführt.

4. Einfluss von Mutationen auf die TURBS-Struktur

In der Arbeitsgruppe sind in der Vergangenheit schon viele TURBS-Mutanten im transienten Expressionssystem getestet worden. Dabei wurde festgestellt, dass Deletionen von drei Basen in weiten Bereichen der RHDV-TURBS nur wenig Einfluss auf die Funktion der TURBS haben (Meyers 2007, Kreher 2009). Nach den Ergebnissen der Strukturaufklärungsexperimente liegen in den Mutanten, welche nur geringen Einfluss auf die VP2-Expression zeigen, die deletierten Basen in der Wildtyp-RNA ausnahmslos einzelsträngig vor. Dagegen haben Deletionen, welche die dsRNA-Bereiche betreffen, immer starken Einfluss auf die Reinitiationseffizienz. In dieser Arbeit wurden zu Beginn auch jene Deletionen untersucht, welche in den ungepaarten Bereichen liegen und einen Einfluss auf die TURBS-Funktion zeigen, allerdings konnten keine Einflüsse auf die Sekundärstruktur beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund des starken Einflusses der Deletionen, die Basen betreffen, welche nach den ersten Ergebnissen dieser Arbeit gepaart vorliegen, wurden die Analysen im Folgenden auf jene Regionen konzentriert.

4.1 Einfluss von Deletionen nahe *Motiv 1* auf die Effizienz der Reinitiation

Es konnte schon in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass die Deletionen von drei Basen in der Nähe des *Motiv 1* zu einer sehr starken Reduktion der VP2-Expression führten (Meyers 2007). Laut den Daten aus den hier beschriebenen Strukturaufklärungsexperimenten liegen diese Bereiche zum Teil gepaart vor. Die Mutationen sind im Vergleich zum Wildtyp in Abb. 14 dargestellt.

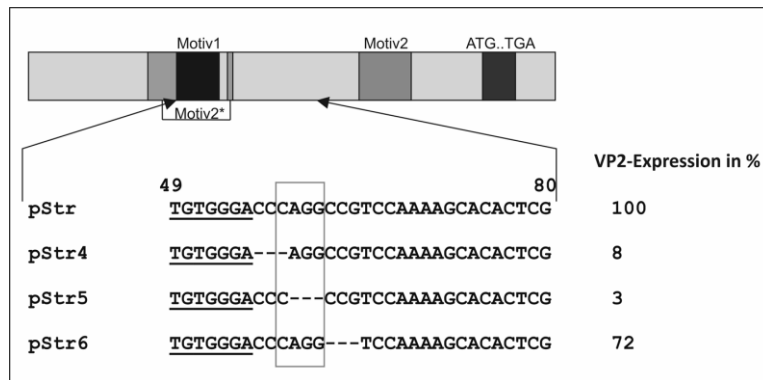


Abb. 14 Vergleich der Sequenzen der TURBS-Varianten *pStr4*, *pStr5* und *pStr6* mit dem Wildtyp *pStr*. Das *Motiv 1* ist unterstrichen. Die gepaarten Basen sind mit einem grauen Rahmen markiert. Die Lage der gezeigten Sequenzen ist schematisch an der gesamt TURBS gezeigt.

In diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Reinitiationseffizienz von Expressionskonstrukten, deren Deletionen denen von *pStr4* und *pStr5* entsprachen, bei 8 % bzw. 3 % des Wildtypniveaus lagen. *pStr6* hingegen war in der Lage 72 % der für den Wildtyp ermittelten VP2-Menge zu exprimieren. Wie in Abb. 14 zu sehen, liegen die Deletionen der Konstrukte *pStr4* und *pStr5* in einem Bereich, der in der Wildtyp-TURBS doppelsträngig ist. Um einen Einfluss auf die TURBS-Struktur zu untersuchen, wurden diese beiden Mutanten im Strukturaufklärungssystem getestet. Ebenso wurde die Variante *pStr6* analysiert, welche direkt angrenzend, aber außerhalb des dsRNA-Bereiches liegt. Die Ergebnisse der Strukturaufklärung für den Bereich ab *Motiv 1* sind in Abb. 15 gegenübergestellt. Man kann erkennen, dass die Variante *pStr4* die eindeutigen dsRNA-Signale des Wildtyps im Bereich der Nukleotide 58-61 nicht mehr zeigt. Obwohl nur eine Base der gepaarten Region deletiert ist, reicht dies offensichtlich schon aus, um die Interaktion nachhaltig zu schwächen. Besonders gut kann man das beim Vergleich der *RNase T1* Sequenzier- und Strukturaufklärungsreaktionen erkennen. Während in der Strukturaufklärungsreaktion für den Wildtyp die Guanine 60 und 61 nicht zu finden sind, zeigt *pStr4* diese eindeutig. Zusätzlich kann man erkennen, dass die Zugänglichkeit der ungepaarten RNA für *S1-Nuklease* in der Nachbarschaft besser ist, die Signale sind stärker und auch zahlenmäßig mehr. *S1-Nuklease* ist das mit Abstand größte der hier verwendeten Enzyme und reagiert deshalb am empfindlichsten auf sterische Hinderung. Es kommt bei dieser Mutation aber noch nicht zu einer deutlichen Umfaltung der Sekundärstruktur dieses Bereiches der RNA. Diese ist beim Konstrukt *pStr5* zu erkennen. Dort kommt es zu einer deutlichen Steigerung des dsRNA-Anteils, besonders wenn man beachtet, dass drei der vier im Wildtyp gepaarten Basen deletiert wurden. Für das letzte Konstrukt *pStr6* wiederum ist zu erkennen, dass sich eine dem Wildtyp entsprechende Faltung der RNA einstellt. Diese Ergebnisse decken sich mit dem Einfluss der Deletionen auf das VP2-Expressionsverhalten. Je stärker die Struktur der TURBS verändert wird, desto stärker ist auch die Reduktion der VP2-Menge und damit die Beeinträchtigung der TURBS-Funktionalität.

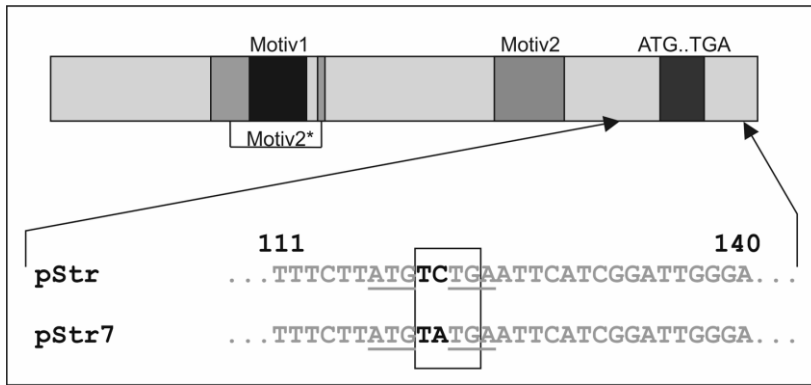


Abb. 16 Vergleich der Variante *pStr7* mit *pStr*. *VP2-Start* und *VP1-Stopp* sind unterstrichen. Die zwei Positionen, welche verändert werden können, sind schwarz hervorgehoben. Die Bereiche, die in der Wildtyp-RNA doppelsträngig sind, werden durch einen Kasten gekennzeichnet. Schematisch ist die Lage der gezeigten Sequenzen in der TURBS-Region gezeigt.

Die Einflüsse auf die Reinitiation wurden nun auch auf Ebene der RNA-Struktur untersucht. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich in der RNA von *pStr7* eine bessere Zugänglichkeit für einzelstrang-spezifische Enzyme zu den Positionen 119-123. Besonders im Falle der *RNasen A* und *T1*, sind zusätzliche Produkte zu erkennen, bzw. bereits vorher schwach sichtbare Signal sind deutlich stärker ausgeprägt (Abb. 17). Zu sehen ist eine deutliche Abschwächung des Signals von *RNase V1* für die Positionen 120-123 in der Variante gegenüber dem Wildtyp. Komplementär dazu sind Signale für die Guanine 119 und 123 in der gefalteten RNA mit *S1-Nuklease* in *pStr7* zu sehen, dies konnte in *pStr* nicht beobachtet werden kann. Das trotzdem vorhandene Produktmuster von *RNase V1*, wenn auch deutlich geschwächt, lässt darauf schließen, dass die ursprünglich vorhandene Interaktion partiell noch vorhanden sein dürfte.

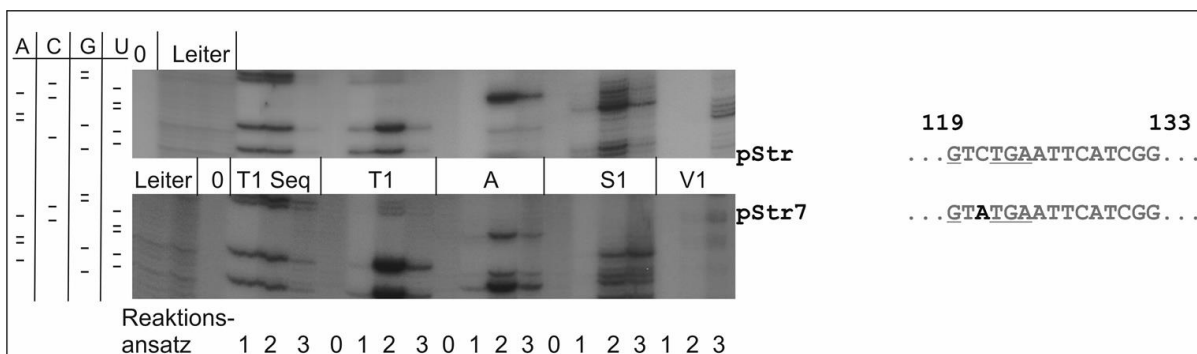


Abb. 17 Vergleich der Strukturanalysen für die RNA der Varianten *pStr* und *pStr7* im Bereich der Positionen 119-133. Die Verschiebung der Produkte von *RNase V1* gegenüber *RNase T1* kommt durch eine am Rand nach oben gebogene Lauffront (vgl. Abb.8) des Gels, sowie das unterschiedliche Spaltverhalten der RNasen zustande.

Die bisher Beschriebenen Untersuchungen der dsRNA-Bereiche lieferten nur die Informationen, dass die betreffende Region mit einer anderen Region des Moleküls gepaart vorliegt. Die hier verwendete Methode kann nur indirekte Hinweise auf den Interaktionspartner liefern. Für die Erstellung eines Sekundärstrukturmodells muss dieser Partner allerdings bekannt sein. Potentielle Partner lassen sich durch den Vergleich der Sequenzen finden. So kann Adenin beispielsweise nur mit Uracil paaren oder Guanin nur mit Cytosin oder Uracil. Als potentieller Bindungspartner für den hier untersuchten Bereich der Basen 120-123 wurden schon in einer vorangegangenen Diplomarbeit (Kreher 2009) die RNA-Sequenz der Basen 139-142 vorgeschlagen. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde die DNA-Vorlage für die *in-vitro* Transkription mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verkürzt (Abb. 18A). Die verkürzte Variante wurde im Strukturaufklärungssystem überprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 18B zu

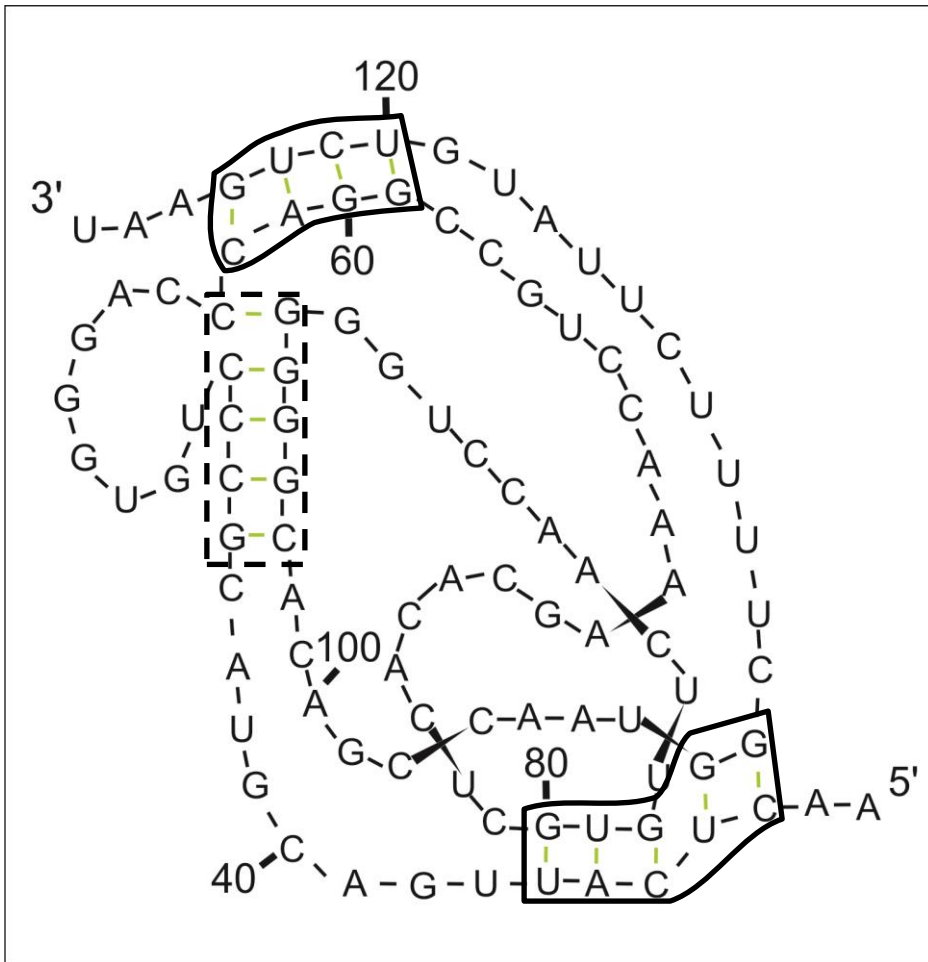


Abb. 19 Modell-Darstellung der TURBS-Region mit der bereits zuvor nahegelegten und hier bestätigten Interaktion der *Motive 2* und *2** (gestrichelter Kasten) und den neu gefundenen dsRNA-Bereichen die durch schwarzen Kästchen hervorgehoben sind. Die letztgenannten Interaktionen sind Hypothesen, die im Folgenden überprüft werden sollen.

	Motiv1	Motiv2	ATG..TGA
	*	Λ	X
	Motiv2*		
	32		77
pExp	...CTCATTGACGTACGCCCTGTGGGACCCAGGCCGTCCAAAAGCACAC		
pExp16 (*)	...AACATTGACGTACGCCCTGTGGGACCCAGGCCGTCCAAAAGCACAC		
pExp18 (^)	...CTCATTGACGTACGCCCTGTGGGACCCAGGCCGTCCAAAAGCACAC		
pExp22 (*)	...CTCATTGACGTACGCCCTGTGGGACCCAGGCCGTCCAAAAGCACAC		
			124
pExp	TCGTGTTCAACCTGGGGGGCACAGCCAATGGCTTTTCTTATGTCTGA...		
pExp16 (*)	TCGTGTTCAACCTGGGGGGCACAGCCAATGGCTTTTCTTATGTCTGA...		
pExp18 (^)	TCACTTCAACCTGGGGGGCACAGCCAATGGCTTTTCTTATGTCTGA...		
pExp22 (*)	TCGTGTTCAACCTGGGGGGCACAGCCAATGGCTTTTCTTATGAGTGA...		

Abb. 20 Substitutionsvarianten zur Zerstörung von dsRNA-Bereichen. In schwarz sind die veränderten Basen gezeigt. Start und Stopp sind unterstrichen. Im oberen Bereich ist ein Schema der TURBS-Region mit Lage der Motive und der

Start/Stopp-Region gezeigt. Die Varianten sind sowohl für den Expressionsvektor *pExp* als auch den Strukturaufklärungsvektor *pStr* erstellt worden. Die Lage der Substitutionen in der TURBS-Region ist über Symbole markiert, die auch in Klammern bei den Namen der Konstrukte aufgeführt sind.

Um die postulierten Interaktionen zu überprüfen, wurde jeweils eine Seite der potentiellen Interaktionspartner so verändert, dass sich die Interaktion in der resultierenden Variante nicht mehr ausbilden sollte. Die zunächst konstruierten Varianten sind in Abb. 20 dargestellt. Zu beachten ist dabei, dass die Basen 122 und 123 nicht veränderlich sind, weil sie Teil des essentiellen VP1-Stopp-Signals sind.

4.3.1 Ergebnisse der transienten Expressionsstudien

Die in diesem Abschnitt verwendeten TURBS-Varianten sind komplette Neukonstruktionen. Deshalb wurde zunächst der Einfluss der Veränderung auf die Expression von VP2 in Zellkulturexperimenten untersucht. Dabei wurde das Konstrukt *pExp*, welches die ORFs der RHDV sg mRNA enthält, in BHK_T-Zellen transfiziert. Diese waren zuvor mit Vaccinia MVA-T7 infiziert worden. Durch dieses Virus wird eine *T7-RNA-Polymerase* in den Zellen exprimiert, welche den T7-Promotor des *pExp*-Vektors erkennt und somit eine RNA transkribiert, die durch die Vacciniavirus PolyA-Polymerase polyadenyliert wird. Das Vaccinia-Virus stellt zudem ein Cap-Analogon bereit. Somit entsteht eine funktionale mRNA, welche von der Translationsmaschinerie der Zelle translatiert werden kann (Meyers 2003). Die Markierung der Proteine erfolgte radioaktiv. Dazu wurde in einem sogenannten Markierungsmedium gearbeitet, dem die Aminosäuren Methionin und Cystein fehlten. Für die Markierung wurden ³⁵S markiertes Methionin und Cystein zugegeben, welche in die ab diesem Zeitpunkt translatierten Proteine eingebaut wurden. Nach einer Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Die Zellysate wurden anschließend entweder mit anti-VP1-Antikörper oder anti-VP2-Antikörper versetzt und nach weiteren Inkubationszeiten mittels zugefügten fixierten *Staphylococcus aureus* Bakterien gefällt. Die gefällten Proteinkomplexe wurden anschließend aufgearbeitet und von den Antikörpern abgespalten. Die aufgearbeiteten Proteine wurden danach über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Lauf sind die Gele fixiert, entfärbt und im Anschluss getrocknet worden. Die Auswertung erfolgte mittels Phosphoimager-Analyse bzw. durch Auflegen von Röntgenfilmen. Zur Quantifizierung wurden wegen des wesentlich breiteren linearen Bereiches der Phosphoimager-Bildplatten und der direkten Zugänglichkeit der Ergebnisse in elektronischer Form ausschließlich die Phosphoimager-Daten verwendet. Um die Messwerte auswerten zu können, mussten diese durch die Zahl der markierten Aminosäuren im jeweiligen Protein geteilt werden. Während VP1 13 markierbare Stellen besitzt sind es im Falle des VP2 nur zwei. Außerdem muss der VP1-Wert mit 5 multipliziert werden, weil für die Fällung von VP2 die fünffache Menge eingesetzt wurde um die niedrigere Expressionsrate zu kompensieren. Unter Einbeziehen dieser Korrekturfaktoren wurde das Verhältnis VP2 zu VP1 bestimmt. Die in dieser Arbeit verwendeten Prozentwerte erhält man durch das Teilen des VP2/VP1-Wertes der entsprechenden Variante durch den VP2/VP1-Wert des Wildtyp-Konstrukts multipliziert mit 100.

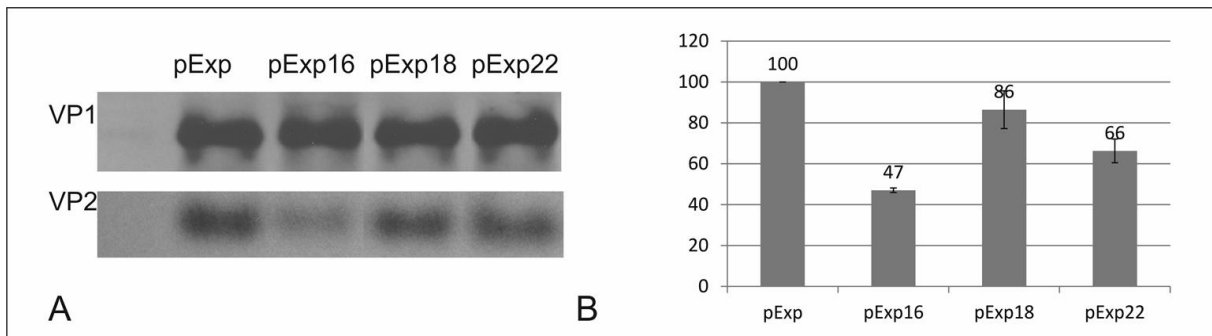


Abb. 21 Ergebnisse der transienten Expressionsexperimente mit Substitutionsvarianten. In (A) sind die Ergebnisse eines Expressionsexperimentes in Form der Polyacrylamid Gele mit den präzipitierten Proteinen gezeigt. (B) zeigt die Quantifizierung der Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. Die y-Achsen-Werte geben die Menge VP2 im Verhältnis zum Wildtyp (*pExp*) an, der auf 100 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken zeigen die Streuung der Messwerte in Form der Standardabweichung.

In Abb. 21 ist zu erkennen, dass die Substitution in *pExp16* den stärksten Einfluss auf die VP2-Expression hat. Der Austausch von zwei Basen sorgt für eine Reduktion der Reinitiationseffizienz auf 47 %. Die Einflüsse der beiden anderen Varianten sind nicht so stark. Im Falle von *pExp18* sogar kaum vorhanden, obwohl in diesem Fall drei Basen ausgetauscht wurden. Der Austausch von zwei Basen zwischen *VP2-Start* und *VP1-Stopp* führte beim Konstrukt *pExp22* nur zu einer Reduktion der VP2-Expression um 34 %, also weniger als der Einzelaustausch entsprechend Konstrukt *pStr7*, der in Expressionsexperimenten, eine Reduktion von 47 % lieferte (vgl. Abschnitt 4.2).

4.3.2 Ergebnisse der Strukturaufklärungsexperimente

Die Konstrukte wurden alle zusätzlich im Strukturaufklärungssystem untersucht, um ihre Interaktionspartner identifizieren zu können. Im Falle der Variante *pStr16* ergaben sich eindeutige Hinweise auf eine Interaktion für die veränderten Basen 32-33 (Abb. 22). Hier taucht deutlich für Position 108 ein Signal beim Strukturaufklärungsexperiment mit *RNase T1* auf. Position 107 ist schwächer zu erkennen. Die Unterschiede könnten durch eine bessere Zugänglichkeit von Position 108 zu erklären sein. Diese beiden Basen sind also Kandidaten für eine Interaktion mit Cytosin und Uracil, die an Position 32 bzw. 33 in der Wildtyp Sequenz liegen und damit interessante Ziele für eine komplementäre Substitution zur Mutation in *pStr16* darstellen, mit der die Funktion der TURBS wieder herzustellen sein sollte (siehe *pStr24*, Abschnitt 4.4). Die nächste getestete TURBS-Variante *pStr18* zeigte nur sehr geringen Einfluss auf die Reinitiationseffizienz am VP2-Startcodon. Um die Gesamtstruktur der RHDV-TURBS zu überprüfen, wurde sie trotzdem weiter untersucht. Dabei zeigte sich (siehe Abb. 23A), dass ein in der Wildtyp-Sequenz gepaart vorliegender Bereich in der Mutante *pStr18* ungepaart vorlag. Das *S1-Nuklease*-Signal nimmt im Bereich der Mutation gegenüber dem Wildtyp deutlich zu. Das veränderte Bandenmuster in den Spuren von *RNase T1* kommt zustande, weil die von diesem Enzym erkannten Guanine mutiert wurden. Es sagt also nichts über eine Strukturänderung aus. Abb. 23B zeigt im Bereich von den Basen 34-36 ebenfalls eine Zunahme der Signale in der Spur von *RNase A*. Dies deutet darauf hin, dass die RNA dort einzelsträngig vorliegt. Der Bereich liegt direkt angrenzend an den in Variante *pStr16* veränderten und im Wildtyp und *pStr18* gepaarten Basen. Möglicherweise wird durch diese Interaktion ein deutlicheres Signal verhindert, weil die Zugänglichkeit für die Enzyme sterisch behindert wird. Von Sequenzvergleichen her wäre an dieser Position jedenfalls eine Interaktion möglich.

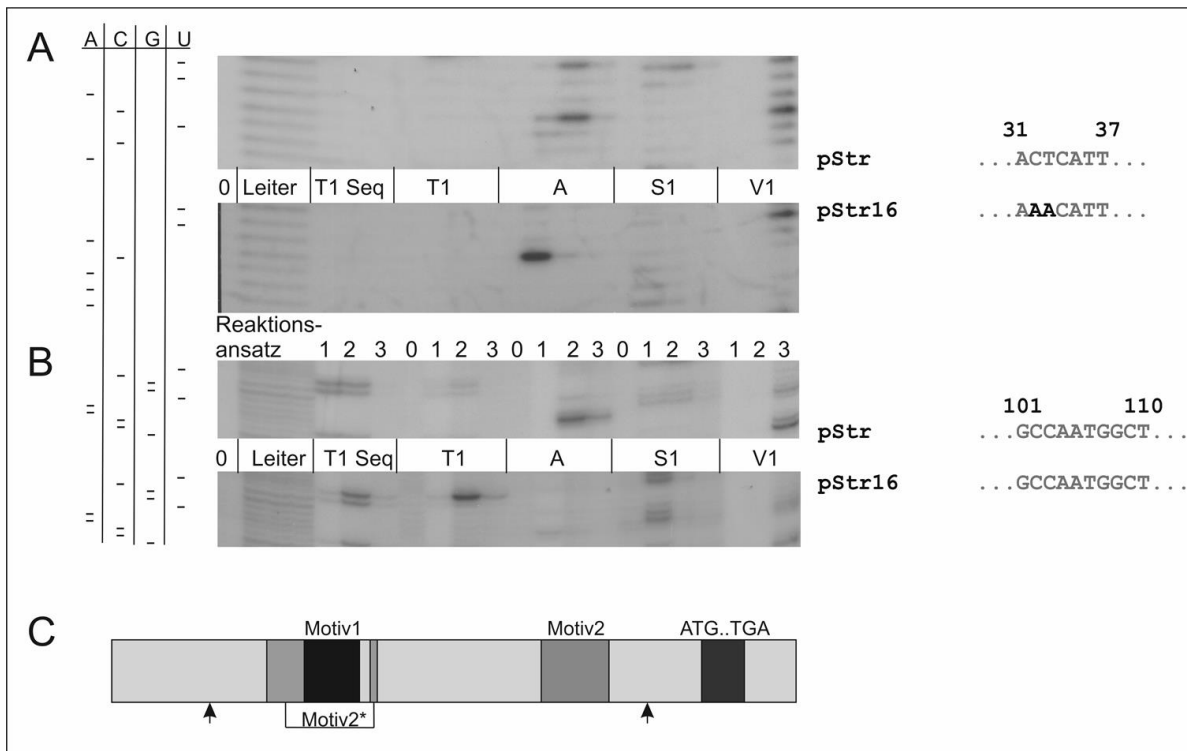


Abb. 22 Vergleich der Ergebnisse der Strukturanalysen von *pStr* mit *pStr16*. In (A) werden die Regionen, in denen die Basen 31-37 liegen, verglichen. (B) zeigt die Region der Basen 101-110 (C) zeigt schematisch die Lage der Region um die Basen 32-33, welche mutiert wurden und die Lage der Basen 107-108 in der TURBS. Das im Wildtyp zu sehende starke *RNase A*-Signal für das Cytosin 102 ist in *pStr16* nur schwach zu erkennen. Allerdings sind Intensitätsschwankungen von *RNase A*-Signalen auch in identischen Konstrukten zu finden und damit kein eindeutiger Hinweis auf strukturelle Veränderungen der TURBS.

Einen Hinweis auf eine mögliche Interaktion lieferte auch eine Variante, bei der die Basen 34-36 mutiert wurden und eine veränderte Faltung im Bereich der Basen 80-82 festzustellen war. Außerdem war auch bei dieser Mutation die Reduktion der VP2-Expression vergleichbar mit der von *pExp18* (Daten nicht gezeigt).

Die als letztes in diesem Abschnitt behandelte Variante ist *pStr22*. Diese enthält Mutationen der beiden Basen zwischen *VP2-Start* und *VP1-Stopp*. Hier kann auch, wie schon im Falle der Variante *pStr7*, der Verlust der dsRNA im veränderten Bereich beobachtet werden. Zudem ist eine Verschiebung des Spaltverhaltens der *RNase V1* zu erkennen. Die Signale für dsRNA im Bereich von Position 58-61 ist im Wildtyp zu erkennen, dieser verlängert sich um eine Position auf 57-61 (siehe Abb. 24), diese Verlängerung ist nur im Vergleich der Spuren von *RNase T1* (Sequenzierung gegenüber Strukturaufklärung) und *RNase V1* ersichtlich. Diese veränderte Zugänglichkeit macht aus der Region von den Basen 58-61, welche in *pStr* doppelsträngig vorliegt, einen potentiellen Interaktionspartner für die Basen 120-123. Denn obwohl im stromaufwärts gelegenen Bereiche keine Base verändert wurde, ergab sich eine Änderung der Spaltmuster mit *RNase V1*.

untersucht, um direkte Hinweise auf die Einflüsse der Mutationen auf die TURBS-Sekundärstruktur zu erlangen.

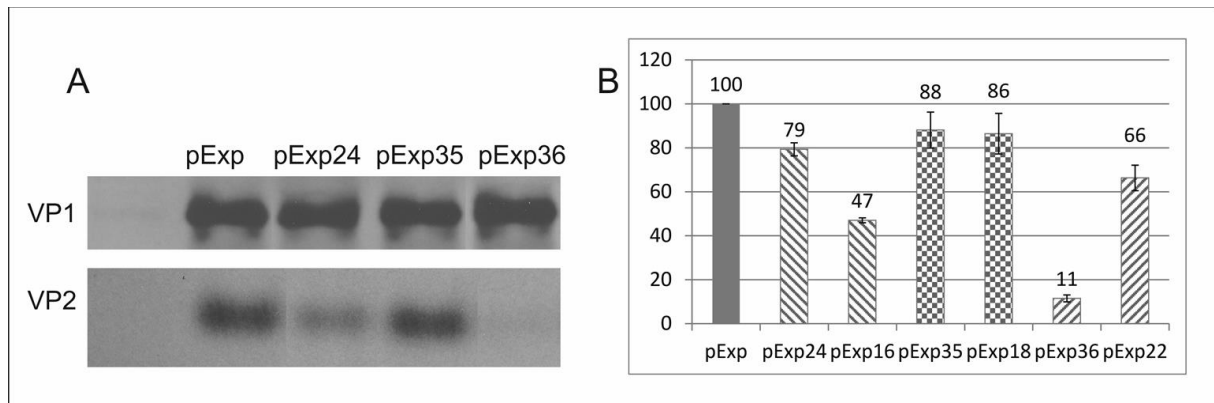


Abb. 26 Ergebnisse der Expressionsexperimente mit den Substitutionsvarianten. In (A) sind die Ergebnisse eines Expressionsexperimentes in Form eines Polyacrylamidgeles mit den gefällten Proteinen gezeigt. (B) zeigt die Quantifizierung der Ergebnisse von drei unabhängigen Expressionsexperimenten mit den in (A) gezeigten Konstrukten. Zusätzlich sind die jeweils zugehörigen nur in einer Region veränderten substituierten Konstrukte *pExp16*, *18* und *22* als Vergleich gezeigt. Die y-Achsen-Werte geben die Menge VP2 im Verhältnis zum Wildtyp (*pExp*) an, der auf 100 % gesetzt wurde. Die Fehlerbalken zeigen die Streuung der Messwerte.

4.4.2 Ergebnisse der Strukturaufklärungsexperimente

In Abb. 27 sind die Veränderungen der Mutanten *pStr16* und *pStr24* anhand der Wildtypstruktur verdeutlicht. Die vier an der vermuteten Interaktion beteiligten Basen sind in Kästchen hervorgehoben.

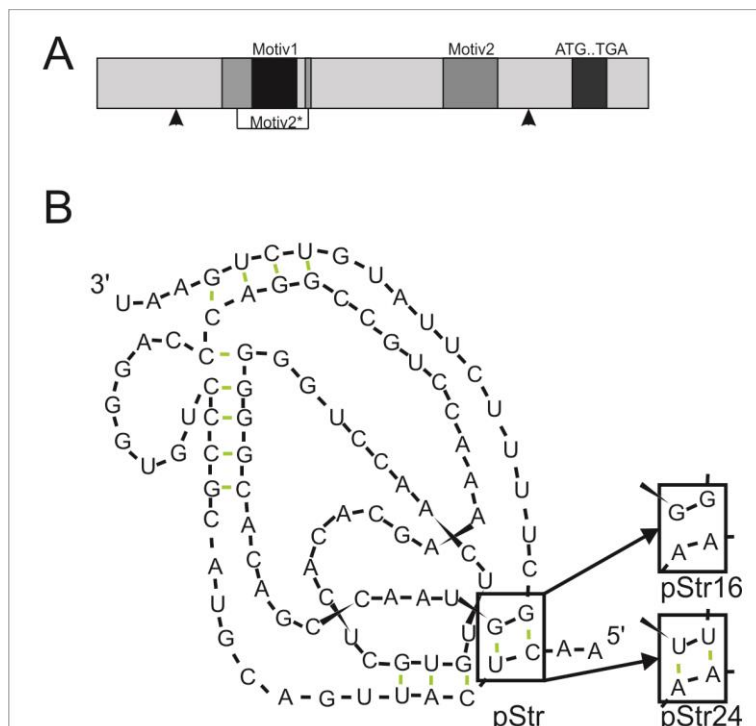


Abb. 27 zeigt die Grundstruktur der TURBS mit Hervorhebung der Interaktion, auf die mit den Substitutionsmutanten *pStr16* und *pStr24* gezielt wurde. (A) veranschaulicht die Lage der Substitutionen in der linearen TURBS, (B) am Sekundärstrukturmodell.

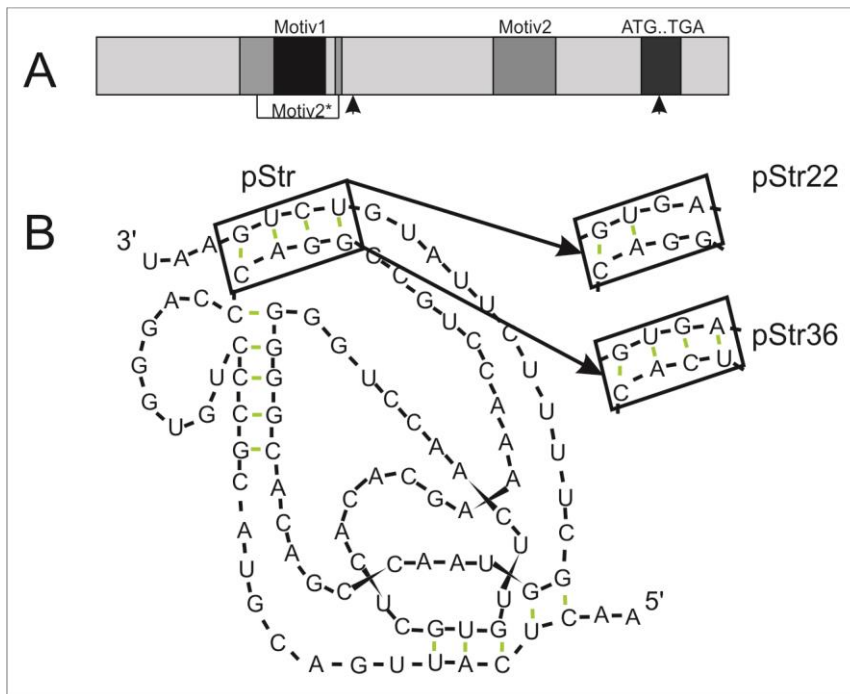


Abb. 31 zeigt die Interaktion auf die mit den Substitutionsmutanten *pStr18* und *pStr35* gezielt wurde. (A) veranschaulicht die Lage der Substitutionen an der linearen TURBS, (B) am Sekundärstrukturmodell.

Als letztes wurde das Mutantenpaar *pStr22* und *pStr36* analysiert. Für die fragliche Mutante konnte in der transienten Expression eine deutliche Verringerung der VP2-Expression der putativen Komplementationsmutante gegenüber dem einseitig substituierten Konstrukt *pExp22* festgestellt werden. Die postulierten Interaktionsstellen für den Wildtyp sowie die Mutanten sind in Abb. 31 am Modell dargestellt. Wie bereits in Abschnitt 4.4.1 erwähnt ist die VP2-Expression nur geringfügig höher als im Falle der dieselbe Region betreffenden Deletionsmutanten. Der Vergleich der Ergebnisse der Strukturanalyse der Konstrukte *pStr22* und *pStr36* mit dem Wildtyp ist in Abb. 32 dargestellt. Während die Ergebnisse der Strukturanalysen für *pStr22* noch deutliche Parallelen zum Wildtyp zeigten, findet man für *pStr36* mehr Ähnlichkeit mit der TURBS-Struktur von *pStr5*. Bei diesem lag eine Deletion der drei Basen an den Positionen 58-62 vor. Diese Basen sind das Adenin (59) und die beiden Guanine (60 und 61) der untersuchten Interaktion (siehe Kästchen Abb. 31). So nimmt das Signal für *S1-Nuklease* und somit für *ssRNA* in *pStr36* deutlich ab, während sich die Signale für *dsRNA*, also die Signale in der *RNase V1*-Spur, verschieben und deutlich ausweiten (siehe Abb. 32D). Das bedeutet, dass Bereiche die im Wildtyp einzelsträngig vorliegen, in *pStr36* gepaart vorliegen. Die Sekundärstruktur der Mutante entfernt sich also weiter von der Wildtypstruktur. Zusätzlich fällt auf, dass das *Motiv 1* in *pStr36* nicht mehr einzelsträngig vorliegt, erkennbar am Vergleich der Sequenzier- und Strukturaufklärungsexperimente mit *RNase T1*. Es wird deutlich, dass hier keine Komplementierung stattfindet, sondern sich die globale Faltung der TURBS ändert. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund wären Effekte, die durch Veränderung der Positionen 58-61 zustande kommen könnten. Denn sowohl Deletionen (Abschnitt 4.1) also auch Veränderungen dieser vier Basen machten die TURBS nahezu funktionsunfähig (siehe Abschnitt 4.5). Eine andere Erklärung wäre die Beeinträchtigung eines zusätzlichen *dsRNA*-Bereiches. Dies soll im folgenden Abschnitt 4.5 untersucht werden.

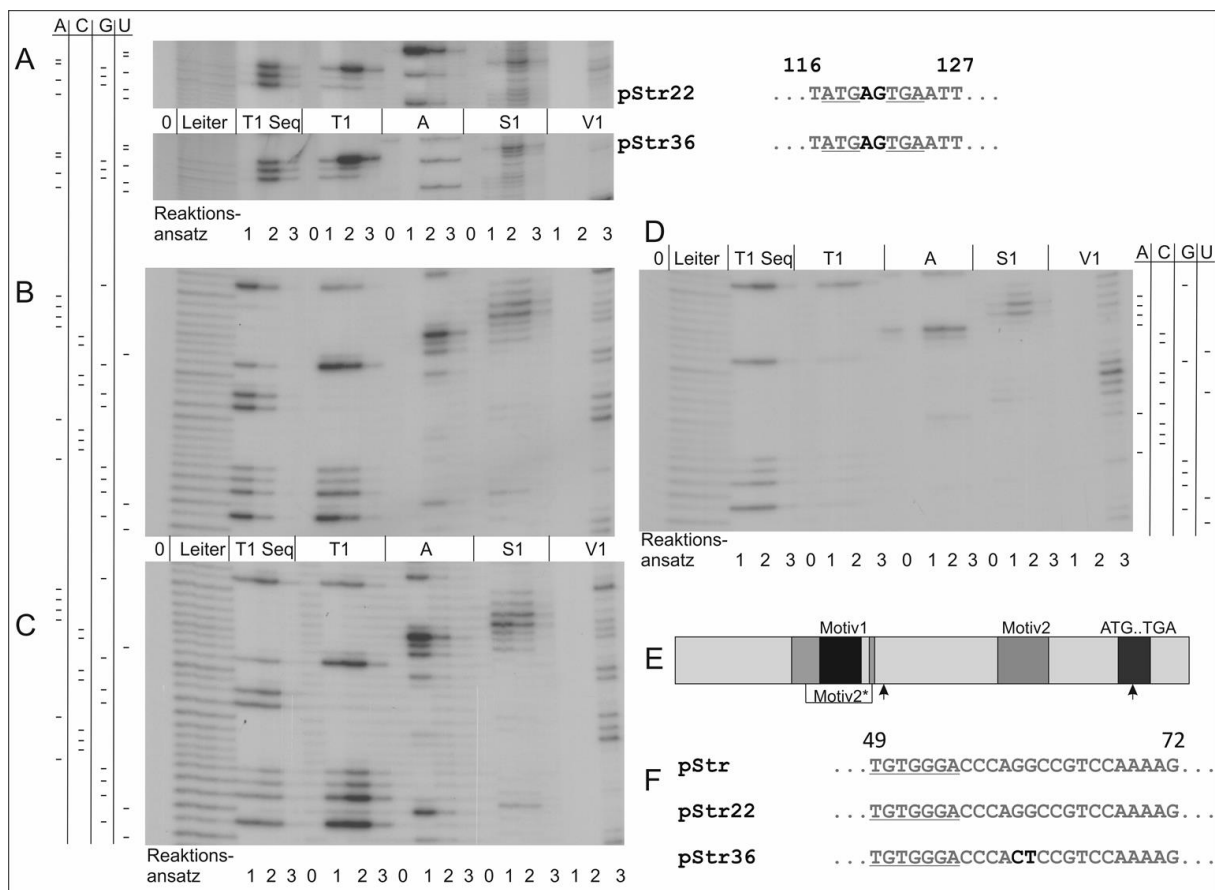


Abb. 32 Vergleich der Ergebnisse der RNA-Strukturanalysen von *pStr* und der TURBS-Varianten *pStr22* und *pStr36*. (A) zeigt den Vergleich Mutanten *pStr22* und *pStr36* im Bereich der Basen 111-127, die Primärsequenz ist dort identisch, die Intensität der Signale sehr ähnlich. Dies soll verdeutlichen, dass die Unterschiede der Intensitäten in den folgenden Bildern nichts mit der aufgetragenen RNA-Menge zu tun haben. (B) zeigt den Wildtyp, (C) *pStr22* und (D) *pStr36* im Bereich der Basen 49 bis 72. In (E) ist schematisch die Lage der behandelten Regionen in der TURBS gezeigt. (F) zeigt die Sequenzen der Regionen, die in (B), (C) und (D) dargestellt sind. *Motiv1*, *VP1-Stopp* und *VP2-Start* sind in den Sequenzen unterstrichen.

4.5 Weitergehende Charakterisierung der dsRNA Basen 58-61

Nachdem ein starker Einfluss des dsRNA-Bereichs, der von den Basen 58-61 im Vektor *pStr* gebildet wird, auf die TURBS-Funktion nachgewiesen worden war, wurden weitere Konstrukte erstellt, bei denen die Basen an diesen vier Positionen komplett verändert wurden. Alle zeigten eine VP2-Expression zwischen 2 % und 6 % des Wildtypniveaus und somit eine noch stärkere Reduktion der Reinitiationsrate als für *pStr36* beobachtet wurde (Daten aus Expressionsexperimenten in Abb. 33). Die Wahl der Basen, welche an die Positionen gesetzt wurden, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Stärke der Reduktion der TURBS-Funktion.

Weil die Veränderung von zwei oder mehr Basen die TURBS-Funktion fast komplett verhinderte, wurde der Versuch unternommen mit möglichst wenig Veränderung die in dieser Arbeit postulierte Interaktion zwischen den Basen 58-61 und der Start-Stopp-Region um die Basen 120-123 zu überprüfen. Dazu boten sich Variationen von Vektor *pStr7* und vom dazugehörigen Konstrukt *pExp7* an. Diese enthalten nur eine Substitution und die Mutante *pExp7* war bereits in vorangegangenen Arbeiten untersucht worden.

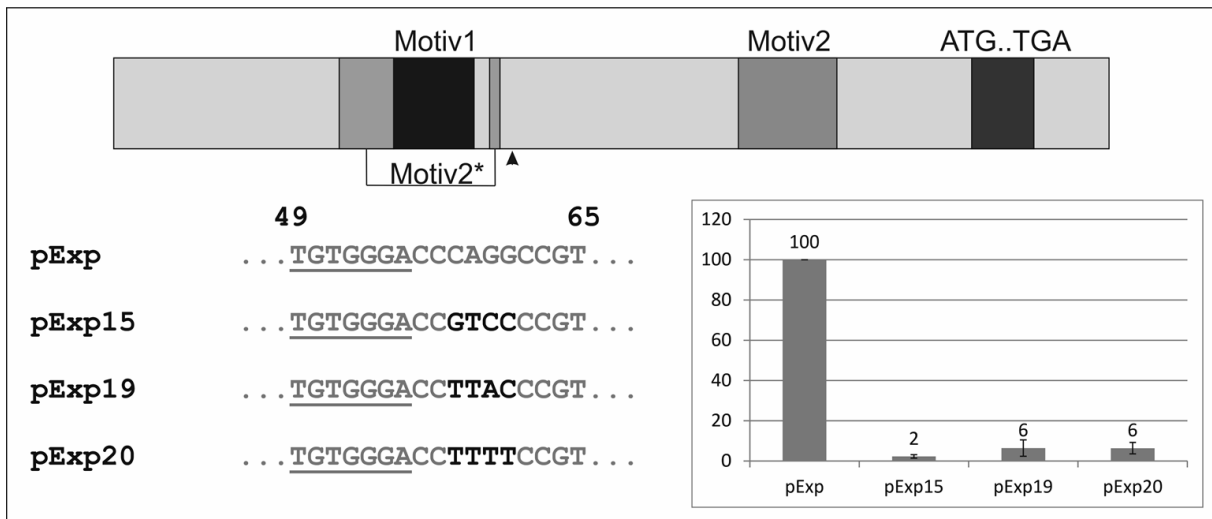


Abb. 33 zeigt schematisch die Lage der Mutation in der TURBS, sowie die Sequenzen von Wildtyp und den Varianten *pExp* 15, 19 und 20. Das *Motiv 1* ist unterstrichen. Die Quantifizierung von drei unabhängigen Expressionsexperimenten ist im Diagramm rechts unten gezeigt. Die Fehlerbalken geben die Streuung der Messwerte an. *pExp* ist zum Vergleich aufgeführt.

Strukturaufklärungsexperimente mit *pStr7* wurden bereits in Abschnitt 4.2 dieser Arbeit beschrieben. Es wurden für die weiteren Untersuchungen zwei Konstrukte etabliert. Die erste Variante, *pExp46*, enthielt im Wildtypumfeld eine Substitution des Guanins an Position 60, welches nach dem Modell mit der Position 121 gepaart vorliegen sollte. Durch diese Substitution wird ein postuliertes Cytosin-Guanin-Paar zu einem Cytosin-Uracil, welches in der RNA paaren können sollte (Cruse, Saludjian et al. 1994). Die Bindung wäre allerdings deutlich schwächer als eine Guanin-Cytosin-Paarung. Ebenso wurde ein Konstrukt erstellt, welches die Mutationen von *pExp7* und *pExp46* kombinierte und als *pExp47* bezeichnet wurde. In diesem Fall würde das in der Wildtyp-TURBS vorhandene G-C-Paar durch ein A-U-Paar ersetzt. Dieses ist zwar weniger stabil als das ursprüngliche G-C-Paar, ist aber ebenfalls ein Watson-Crick-Basenpaar. In Abb. 34 sind die Sequenzen gegenübergestellt.

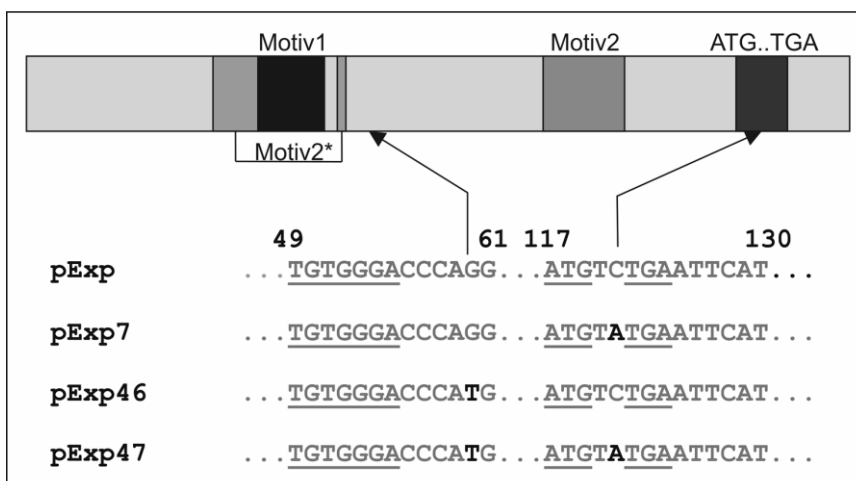


Abb. 34 Vergleich der Sequenzen der Vektoren *pExp7*, *pExp46* und *pExp47* mit dem Wildtyp-Konstrukt *pExp*. *Motiv 1*, *VP2-Start* und *VP1-Stop* sind unterstrichen. In dem Substitutionsvarianten sind die nicht veränderten Basen grau und die veränderten in schwarz dargestellt. Es wurden zusätzlich auch die *pStr*-Varianten erstellt, um Strukturanalyseexperimente durchzuführen. An der im oberen Bereich schematisch dargestellten TURBS-Region ist die Lage der beiden Substitutionsorte gezeigt.

4.5.1 Ergebnisse der transienten Expressionen

In Abb. 35 sind die Ergebnisse der transienten Expressionen zu sehen. Es fällt auf, dass die Mutationen in *pExp7* und *pExp46* einen ähnlich starken Einfluss auf die TURBS-Funktion haben. Allerdings ist mit *pExp47* keine Komplementierung möglich, sondern die VP2-Expression fällt auf ein Niveau ab, welches vergleichbar mit dem beim Konstrukt *pExp36* beobachteten ist. Dies könnte auch hier ein Hinweis auf eine andere Faltung der TURBS-Region geben (siehe Abschnitt 4.5). Ein Einfluss des zusätzlichen ATG, welches sich im falschen Raster befindet, kann die Reduktion der VP2-Expression nicht erklären, weil die gleiche Mutation auch in *pStr7* vorliegt. Außerdem nutzt RHDV, im Gegensatz zu anderen Caliciviren keine anderen Startcodons in der Nähe des originalen VP2-Startcodons (Meyers 2003). Alle bisher in dieser Arbeit getesteten TURBS-Varianten, die Substitutionen der Basen 58-61 beinhalteten, senkten die VP2-Expression im Vergleich zum Wildtyp um ca. 90 %. Die Variante *pExp46* ist nun das erste Konstrukt, welches eine dieser Basen verändert hat, bei dem nur ein geringer Einfluss der Substitution auf die TURBS-Funktion zu beobachten war. Im Vergleich zum Wildtyp wurde in diesem Fall die VP2-Expression nur um 44 % verringert. Auch hier wurden im Folgenden Strukturaufklärungsexperimente durchgeführt um die Ursache zu ermitteln.

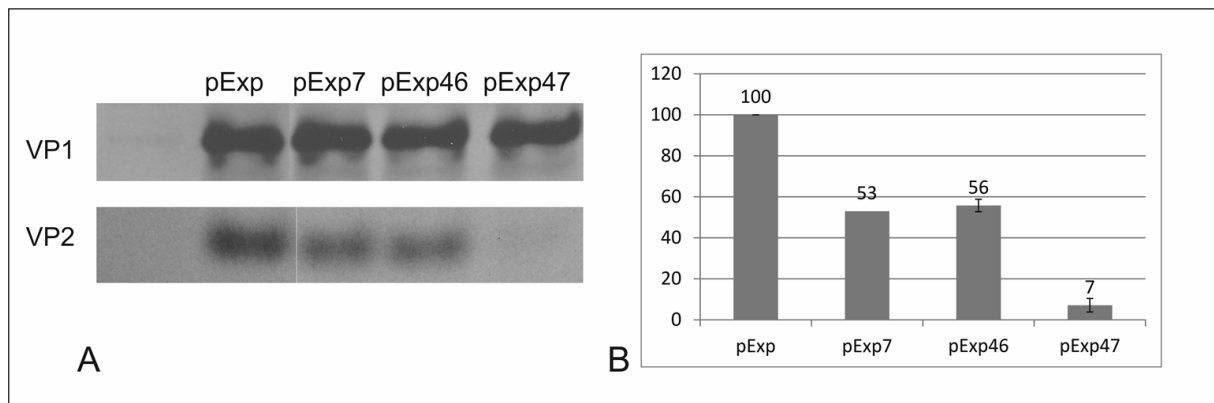


Abb. 35 der Teil (A) der Abbildung zeigt ein Expressionsexperiment zu Bestimmung der VP2-Menge, welche die jeweiligen Konstrukte exprimieren. Teil (B) zeigt die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Streuung der Messwerte an. *pExp7* ist zum Vergleich aufgeführt.

4.5.2 Ergebnisse der Strukturaufklärungsexperimente

Die Strukturaufklärungsexperimente mit *pStr46* haben ergeben, dass der Austausch von nur einer Base einen deutlichen Einfluss auf die Faltung der TURBS-Region hat. Abb. 36 zeigt den Vergleich der Sequenzen von *pStr46* und *pStr47* mit dem Wildtyp. Die möglichen Basenpaarungen in dem untersuchten Bereich sind in den schwarzen Kästchen hervorgehoben.

In Abb. 37A ist die Lage der Regionen, deren Interaktion mit den Konstrukten *pStr46* und *pStr47* untersucht werden sollten, schematisch an der linearen TURBS gezeigt. Die Abb. 37B und 37C zeigen Ausschnitte aus den Gelbildern. Die Sequenzen der verglichenen Konstrukte sind angrenzend dargestellt und zwar ausschließlich die Basen, welche auf den Bildern zu sehen sind. C zeigt dabei die Start/Stopp-Region, B das *Motiv 1* und folgende Basen. Zu erkennen ist in B, dass sich in der Start/Stopp-Region eine Änderung der Struktur ergibt, denn *RNase V1* schneidet nur noch zwei Basen in *pStr46*, statt vier in *pStr*. Auch die Guanine von *VP1-Start* und *VP2-Stopp* sind besser für *RNase T1* zugänglich. Zu beachten ist dabei, dass diese Änderung durch eine Mutation 60 Basen stromaufwärts hervorgerufen wird.

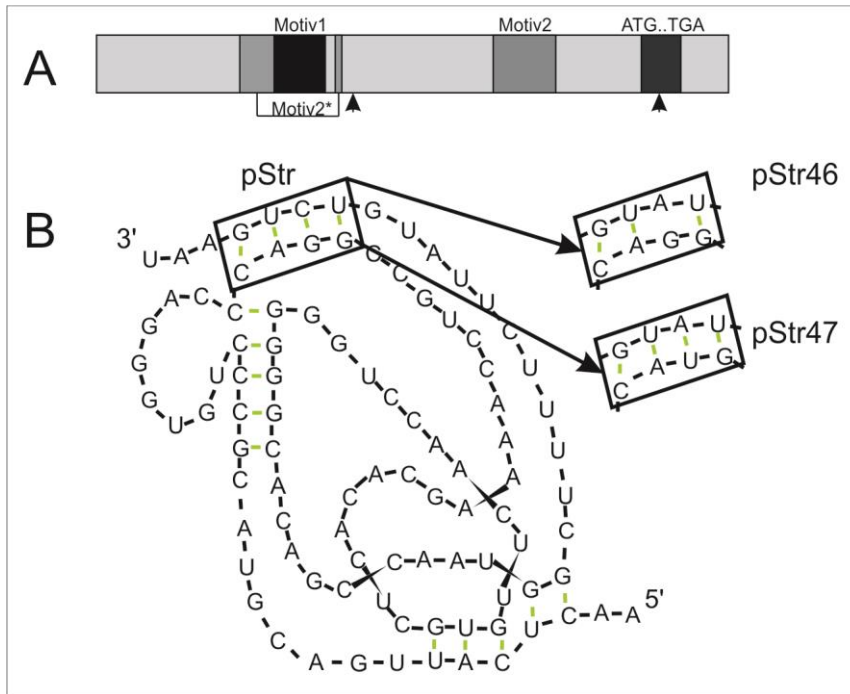


Abb. 36 zeigt die Lage der potentiell miteinander interagierenden Basen in (A) schematisch in der linearen TURBS und in (B) am Modell. In den Kästchen sind die vier Basen, deren Interaktion untersucht werden sollte, sowie die potentiellen Bindungen dargestellt.

Noch prominenter sind die Veränderungen um die veränderte Base in B dargestellt. Dort kann man klar erkennen, dass *Motiv 1* in *pStr46* gepaart vorliegt oder zumindest nicht mehr für die Enzyme zugänglich ist. Zusätzlich faltet sich auch der Bereich nach *Motiv 1* von klar einzelsträngig zu dsRNA um. Dabei deuten einige Signale darauf hin, dass vor allem die Basen 58-61 teilweise gepaart und teilweise einzelsträngig vorliegen. Weil Basen an identischen Positionen sowohl Signale für einzelstrangspezifische Enzyme, als auch *RNase V1* zeigen, sieht es so aus als ob zwei Strukturen parallel vorliegen und zumindest noch ein Teil der RNA-Moleküle eine Wildtyp-ähnliche Faltung annimmt. Dies war bei den anderen Konstrukten mit Substitutionen von mehr als einer Base in dem hier untersuchten Bereich nicht zu beobachten. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen eine gegenseitige Beeinflussung der Regionen der Basen 58-61 und 120-123 dies könnte für eine Interaktion sprechen. Im Falle des in Abb. 38 im Vergleich mit *pStr46* gezeigten Konstrukts *pStr47* ist zu erkennen, dass im Start/Stop-Bereich die Interaktion nicht mehr nachweisbar ist. Des Weiteren sieht es so aus, als ob sich die Strukturen in *pStr47* noch stärker von der Wildtypstruktur unterscheiden, als dies bei *pStr46* zu beobachten war. So sind die dsRNA-Signale von *RNase V1* deutlicher zu sehen. Zusätzlich verstärkt sich das Signal für *S1-Nuklease* im Bereich der im Wildtyp gepaarten Basen 59-61 gegenüber *pStr46* deutlich, im Wildtyp gibt es dort kein *S1-Nuklease*-Signal. Es ist also zu sehen, dass der Versuch der Komplementierung zu einer veränderten Faltung der TURBS führt. Die fehlende Restaurierung der Struktur des Wildtyps, kann auch die fehlende Wiederherstellung der VP2-Expression erklären.

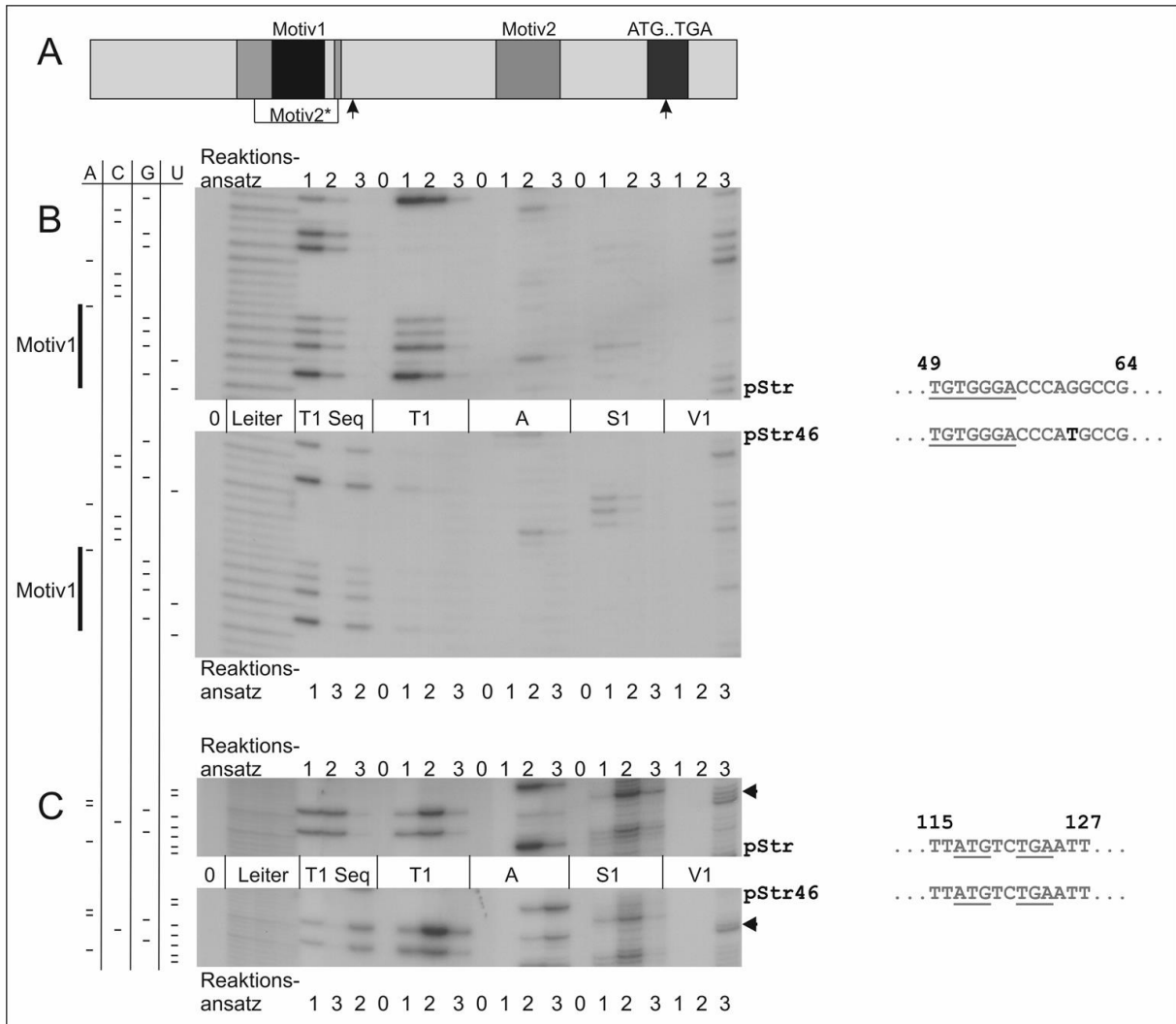


Abb. 37 zeigt den Vergleich der an Position 60 der zur Strukturaufklärung verwendeten RNA substituierten TURBS-Variante *pStr46* mit der Wildtyp-TURBS *pStr*. In (A) ist schematisch die Lage der Sequenzen in der TURBS-Region gezeigt. In (B) und (C) werden auf der rechten Seite die Sequenzen gegenübergestellt, wobei die Basen gezeigt werden, welche auch in den Gelbildern zu sehen sind, also die Positionen 116-127 (B) und 49-73 (C). Die veränderte Position ist schwarz hervorgehoben und *Motiv 1* unterstrichen. Zu beachten ist, dass beim Auftragen der Sequenzierreaktion mit *RNase T1* auf das Gel bei *pStr46* die Verdünnung zwei und drei vertauscht sind, zu erkennen an der Beschriftung in (B) und natürlich ebenso in (C) zu beachten. Die Veränderung, welche in (C) zu beobachten ist, wurde mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Die Banden sind auf den Ausschnitten nicht so gut zu erkennen, aber in den Originalbildern sind deutlich vier Spaltprodukte für *RNase V1* in *pStr* und zwei für *pStr46* zu erkennen.

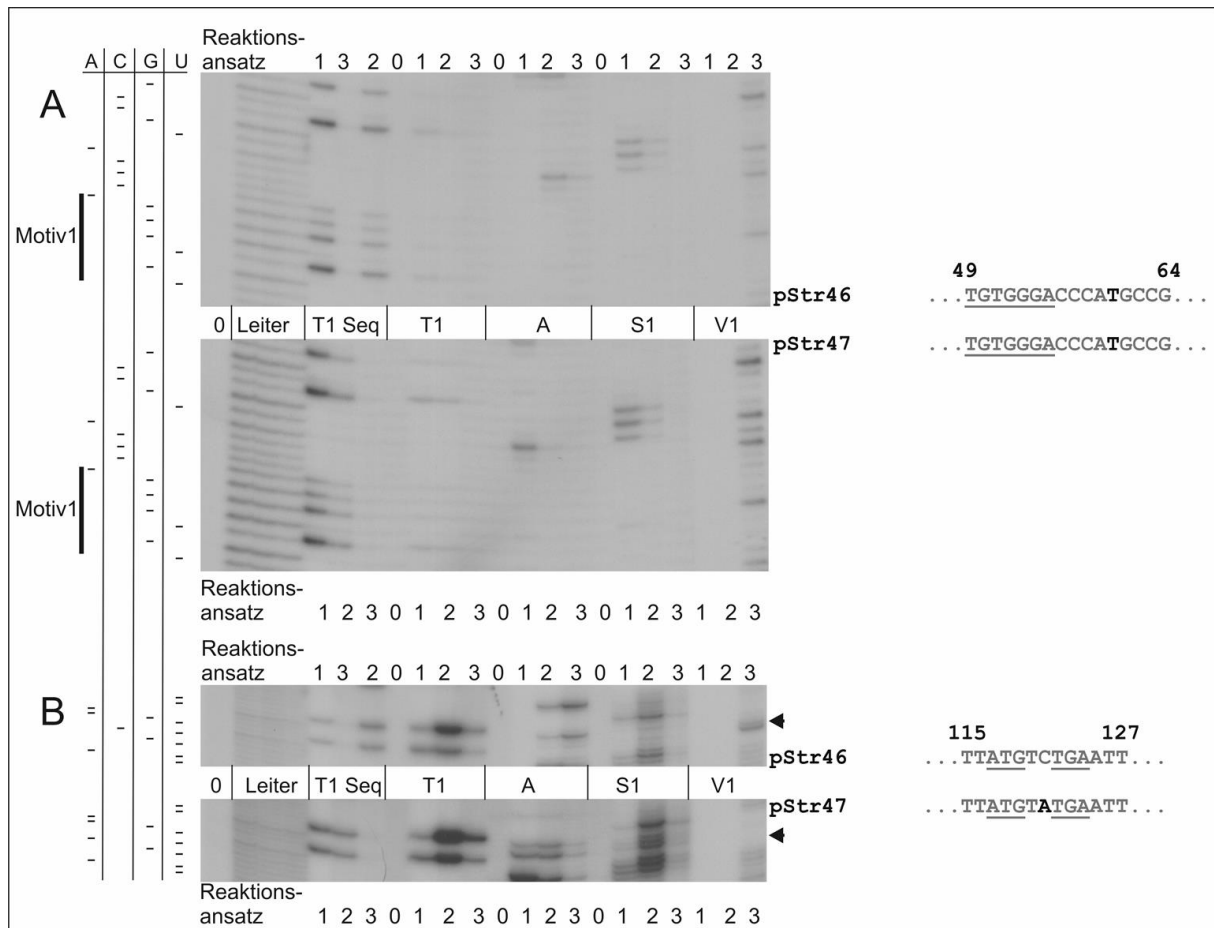


Abb. 38 zeigt die gleichen Regionen wie Abb. 37 nur diesmal den Vergleich zwischen *pStr46* und *pStr47*. (A) zeigt die Signale für die Nukleotide 49-64. (B) zeigt bei *pStr47* den vollständigen Verlust der Basenpaare im Bereich 120-123, die schwarzen Pfeile zeigen die Positionen. Wie bereits bei den vorherigen Abb. von *pStr46* ist auch hier zu beachten, dass die Produkte der Sequenzierung mit *RNase T1* beim Auftragen vertauscht wurden.

5 Varianten der TURBS mit synthetischer hergestellten Sequenzen

Parallel zu den in Abschnitt 4.5 vorgestellten Arbeiten wurden Experimente mit verschiedenen TURBS-Varianten durchgeführt, welche zeigen sollten, ob außer den bereits beschriebenen, weitere Interaktionen auf Sekundärstrukturebene für die Reinitiation wichtig sind.

5.1 Varianten der TURBS zur Blockierung unentdeckter Interaktionen

Um gravierende Veränderungen in allen identifizierten ssRNA-Bereichen zu ermöglichen, wurden synthetische DNAs bestellt, bei denen im Konstrukt *pExp38* wurden die Guanine und Thymin, die nicht für die postulierten Sekundärstrukturen notwendig sind, gegen Adenin oder Cytosin ausgetauscht, um Basenpaarungen zu verhindern. Vom Austausch ausgenommen war die Region ab dem VP2-Startcodon, um das VP2-Raster nicht zu verändern. Zusätzlich wurde mit *pExp50* ein Konstrukt bestellt, das alle Veränderungen von *pExp38* enthält und bei dem darüber hinaus die 15 Nukleotide zwischen den Positionen 64-80 deletiert wurden um nachzuweisen, dass diese ungepaarten Basen nicht essentiell für die TURBS-Funktion sind. Die Sequenzen sind in Abb. 39 dargestellt. Positionen, an denen im Wildtyp die Basen Adenin oder Cytosin vorliegen, wurden nicht verändert, weil sie untereinander keine Sekundärstrukturen ausbilden können. Mit beiden hier

aufgeführten Konstrukten wurden Expressionsexperimente durchgeführt. Für die Strukturanalyseexperimente wurde nur für das Konstrukt *pExp38* das dazugehörige *pStr*-Konstrukt analysiert.

	3	60
pExp	...CTCAACCACACTCATTGACCTGACTGAACTCATTGACGTACG <u>CCCTGTGGGACCC</u> CAG	
pExp38/50	...CACACCACACCCAAACACCAAACCCA <u>ACTCATAAACCCACACCCCTGTGGGACCC</u> CAG	
	61	120
pExp	GCCGTCCAAAAGCACACTCGTGTTC AACCTGGGGGCACAGCCAATGGCTTTTCTTATGT...	
pExp38	GCCGACCAAAAACACACAAAGTGAACAACCTGGGGGCACAACCAAAGGCCCAACAAATGT...	
pExp50	GCCG-----GTGAACAACCTGGGGGCACAACCAAAGGCCCAACAAATGT...	

Abb. 39 zeigt die Sequenzen der synthetischen Varianten *pExp38* und *pExp50* im Vergleich zur Wildtyp-TURBS. Veränderte Positionen sind schwarz hervorgehoben. Bis auf die Deletion der Basen 65-79 in *pExp50* ist es mit *pExp38* identisch. *Motiv 1*, *Motiv 2* und das Start-ATG von VP2 sind unterstrichen. *Motiv 2** ist gestrichelt unterstrichen.

5.1.1 Ergebnisse der transienten Expressionen

In Abb. 40 sind die Ergebnisse der Expressionsstudien mit den Konstrukten *pExp38* und *pExp50* dargestellt. Zu sehen ist, dass beide Konstrukte in etwa gleichwertig funktionieren. Die Reduktion um 74 % bzw. 76 % ist deutlich. Aber für den Austausch von dieser Anzahl an Basen (28 in *pExp38* bzw. 22 in *pExp50* mit einer zusätzlichen Deletion von 15 Basen) haben die Veränderungen einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die TURBS-Funktion. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die entscheidenden Stellen in diesen Konstrukten noch intakt sind. Die Substitutionen führen im C-terminalen Bereich des VP1 zum Austausch von 15 Aminosäuren und zu einem veränderten Laufverhalten des VP1 von *pExp38* und *pExp50*. Des Weiteren zeigt dieses Experiment, dass weite Bereiche der nach den Strukturanalysen einzelsträngigen RNA zwischen den *Motiven 2*/1* und 2 nicht notwendig für die Funktion der TURBS sind.

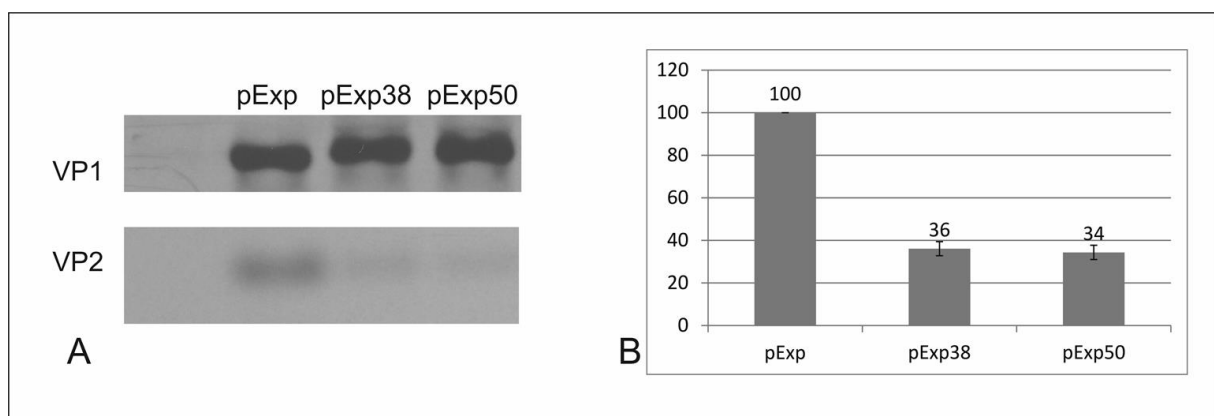


Abb. 40 Ergebnisse der Expressionsexperimente mit den synthetischen Konstrukten *pExp38* und *pExp50*. In (A) sind die Ergebnisse eines Expressionsexperimentes gezeigt. (B) zeigt die Quantifizierung der Ergebnisse von drei unabhängigen Expressionsexperimenten. Die Y-Achsen-Werte geben die Menge VP2 im Verhältnis zum Wildtyp (*pExp*) an, der auf 100 % gesetzt wurde. Die Fehlerbalken zeigen die Streuung der Messwerte.

5.1.2 Ergebnisse der Strukturaufklärungsexperimente

Nachdem gezeigt werden konnte, dass diese Substitutionen in *pExp38* mit einer funktionalen TURBS vereinbar sind, sollte die Struktur im TURBS-Bereich von *pExp38* untersucht werden.

Abb. 41 zeigt das Ergebnis eines Strukturaufklärungsexperiments mit dem Konstrukt *pStr38*. Die Motive, sowie *VP1-Stopp* und *VP2-Start* sind mit Balken markiert. Die nachfolgend gezeigten Bildausschnitte stammen aus diesem Gelbild.

Für die Strukturanalyse wurde ein Plasmid bestellt, in das die synthetisch hergestellte TURBS-DNA der Mutante *pStr38* hinter einem *SP6-RNA-Polymerase-Promotor* eingefügt war. Flankierend befanden sich *EcoRV*-Erkennungssequenzen, so dass das Insert analog zu dem Konstrukt *pStr* aufgebaut war (vgl. Abb. 3). Somit konnte das Fragment, welches die TURBS mit dem RNA-Polymerase-Promotor enthielt, aus diesem Konstrukt ausgeschnitten und mittels Gelelektrophorese aufgereinigt werden, um als Vorlage für die *in-vitro* Transkription der zu untersuchenden RNA zu dienen. Die Ergebnisse der Experimente sind in Abb. 41, Abb. 42 und Abb. 43 dargestellt. Ein Bild eines vollständigen Acrylamid Gels ist in Abb. 41 gezeigt. In Abb. 42 ist die Region von Position 116-127 dargestellt, welche die *VP1-Stopp*- und *VP2-Start*-Triplets enthält. Zu erkennen ist besonders in den Spuren von *RNase V1* und *RNase T1*, dass der dsRNA-Bereich hier schrumpft. Dies ist analog zu den Ergebnissen mit der Variante *pStr46* bei der die vorgeschlagene Paarung zwischen den Basen 58-61 mit den Basen 120-123 durch eine Punktmutation geschwächt ist (vgl. Abb. 37). Die Paarung der Basen 32-33 mit den Basen 107-108 kann auch in diesem Konstrukt analog zum Wildtyp gefunden werden.

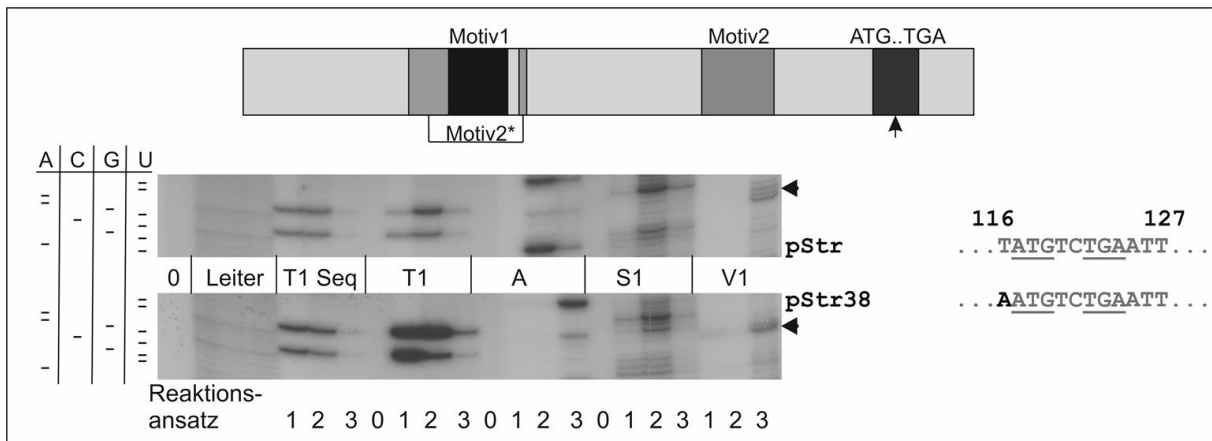


Abb. 42 Vergleich der Basen 116-127 des *pStr38* mit dem Wildtyp. Die veränderte Base ist schwarz hervorgehoben, Start- und Stopp-Triplett sind unterstrichen. Die Lage der gezeigten Sequenzen ist an der schematischen TURBS-Darstellung gezeigt. Die Pfeile zeigen auf die am offensichtlichsten hervortretenden Unterschiede in den Signalen für *pStr* und *pStr38*. Betroffen ist der Bereich der Base 119-123, obwohl sich die Sequenzen dort nicht unterscheiden.

Die Schwächung dieser Interaktion könnte zumindest zum Teil die Reduktion der *VP2*-Produktion erklären. Abb. 43 zeigt den Bereich der Basen 49-82. Es ist deutlich zu sehen, dass ab dem Guanin 64 eine, im Vergleich zum *pStr* deutlich stärkere Spaltung mit *S1-Nuklease* erfolgt. Dies gibt einen Hinweis auf die erfolgreiche Inhibition von Basenpaarungen in diesem Bereich, denn die *S1-Nuklease* Spaltung ist in diesem Bereich viel effizienter als dies beim Wildtyp der Fall ist. Der Bereich von Base 58-60 zeigt mit *RNase V1* immer noch eine dsRNA-Struktur, was nach den Ergebnissen, die für die Start/Stopp-Region erhalten wurden, auch zu erwarten war. Diese Befunde sind ein weiterer deutlicher Hinweis darauf, dass die Basen 58-61 und 120-123 eine Paarung ausbilden. Allerdings ist auch hier das Signal schwächer. Dies spricht für eine schwächere Interaktion oder zwei parallel existierende Strukturen. Auch die im fraglichen Bereich bei der Mutante schwach sichtbaren Signale für *RNase A*, *T1* und *S1-Nuklease* sind im Wildtyp nicht zu detektieren und deuten auf eine weniger stabile Paarung hin. Wenn man das *Motiv 1* betrachtet, fällt auf, dass das Signal für *RNase T1* im Strukturaufklärungsexperiment in *pStr38* deutlich schwächer ist als in *pStr*. Diese Veränderungen könnten den teilweisen Funktionsverlust der TURBS in *pStr38* erklären. Die Signale sind allerdings

deutliche Unterschiede. Die Signale für einzelstrangspezifische Enzyme nehmen im *pStr38* gegenüber dem Wildtyp deutlich zu.

5.2 TURBS-Varianten mit tiefgreifenden Veränderungen der Sequenz

Nachdem die TURBS-Varianten *pExp38* und *pExp50* in den Expressionsexperimenten ihre grundsätzliche Funktionalität bewiesen hatten, sollte überprüft werden, ob auch weitergehende Veränderungen der TURBS toleriert werden können, wenn die für die Sekundärstruktur entscheidenden Positionen unverändert bleiben. Zu diesem Zweck wurden zwei weitere TURBS-Varianten bestellt. Bei diesen wurden zusätzlich zu dem beim Abschnitt 5.1 vorgestellten Konstrukt *pExp50* eingeführten Austausch weitere Positionen verändert. So sind zusätzlich die vorhandenen Cytosine gegen Adenin und umgekehrt mutiert worden, so dass in der TURBS-Region kaum Übereinstimmungen zu *pExp* bestehen, mit Ausnahme der als wichtig für die TURBS-Funktion bekannten Stellen. Die Sequenzen außerhalb der TURBS-Region wurden nicht verändert. Die Sequenzen der TURBS-Regionen dieser Konstrukte sind in Abb. 44 im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. *pExp54* trägt zusätzlich zu *pExp53* vier Substitutionen. Diese befinden sich an den Positionen 16-17 und 89-90.

	3	
pExp	...	<u>CTCAACCACACTCATTGACCTGACTGAACTCATTGACGTACG</u> <u>CCCTGTGGGACC</u> CAG
pExp50	...	<u>CACAACCACACCCAACACCAAACTCATAAACCCACAC</u> <u>CCCTGTGGGACC</u> CAG
pExp53	...	<u>AAACCAACACACCACACAAAACACCCCTCATAAACACCCAA</u> <u>CCCTGTGGGACC</u> CAG
pExp54	...	<u>AAACCAACACACACCACAAAACACCCCTCATAAACACCCAA</u> <u>CCCTGTGGGACC</u> CAG
	61	120
pExp	GCCGTCCAAAAGCACACTCGTGTTC AACCTGGGGGGCACAGCCAATGGCTTTTCTT	<u>ATGT</u> ...
pExp50	GCCG-----GTGAACAACCTGGGGGGCACAAACCAAAGGCCCAACAA	<u>ATGT</u> ...
pExp53	GCCG-----GTGAACAACCTGGGGGGCACAAAAAAGGACCCAACA	<u>ATGT</u> ...
pExp54	GCCG-----GTGAACAACCTGGGGGGCACAAACCAGGACCCAACA	<u>ATGT</u> ...

Abb. 44 Vergleich der Sequenzen von *pExp*, *pExp50* und *pExp53* bzw. *pExp54*. Die Positionen, welche verändert wurden, sind schwarz hervorgehoben. *pExp53* und *pExp54* unterscheiden sich nur an den Positionen 16-17 und 104-105 voneinander. *Motiv 1* und *Motiv 2*, sowie das *VP2-Start* sind unterstrichen. *Motiv 2** ist gestrichelt unterstrichen.

5.2.1 Ergebnisse der transienten Expressionen

In Abb. 45 sind die Ergebnisse der transienten Expressionen mit *pExp53* und *pExp54* dargestellt. Zum Vergleich ist auch nochmal *pExp50* mit aufgeführt, weil dieses Konstrukt durch das Tragen derselben 15 Basen Deletion am ehesten mit *pExp53* vergleichbar ist. Man kann erkennen, dass die VP2-Expression nur etwa 10 % geringer ist, als beim *pExp50*. Die Expressionsrate liegt im Falle der Variante *pExp53* bei 23 % bzw. bei *pExp54* bei 18 % der Wildtyp-TURBS. Dies ist für die großflächigen Substitutionen bemerkenswert effizient und gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass für die Reinitiationseffizienz im VP2-Raster die hier identifizierten Strukturelemente zusammen mit der *Motiv 1*-Sequenz wichtig sind. Schon mit den vorherigen Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass Mutationen in der TURBS-Region sehr leicht zu Störungen der Struktur führen können, welche die Funktion sehr wahrscheinlich beeinflussen. So könnten verschiedene Strukturen parallel existieren und somit die für die TURBS-Funktion relevanten Elemente weniger häufig vorliegen und

damit zu der geringeren Reinitiationsrate führen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden auch mit *pStr53* und *pStr54* Strukturaufklärungsexperimente durchgeführt.

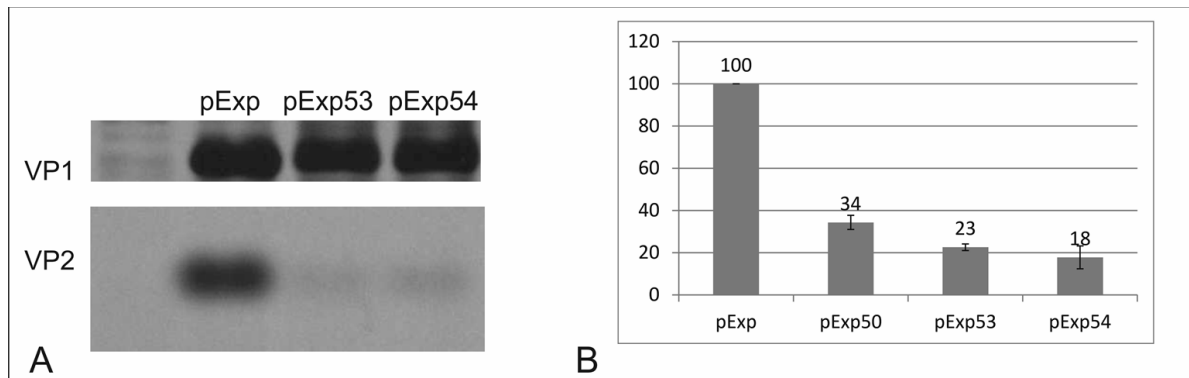


Abb. 45 Ergebnisse der Expressionsexperimente mit den synthetischen Konstrukten *pExp53* und *pExp54*. In (A) sind die Ergebnisse eines Expressionsexperimentes gezeigt. (B) zeigt die Quantifizierung der Ergebnisse von drei unabhängigen Expressionsexperimenten, als Vergleich ist *pExp50* zusätzlich gezeigt. Die Y-Achsen-Werte geben die Menge VP2 im Verhältnis zum Wildtyp (*pExp*) an, der auf 100 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken zeigen die Streuung der Messwerte.

5.2.2 Ergebnisse der Strukturaufklärungsexperimente

Die Strukturaufklärungsexperimente mit *pStr53* sind in den Abbildungen 46, 47 und 48 gezeigt. Die Abb. 46 zeigt ein vollständiges Acrylamid-Gel. Der Bereich um Start/Stop wird in Abb. 47 gezeigt. Die Paarung der Basen an den Positionen 120-123, welche im Wildtyp vorhanden ist, kann man hier kaum noch erkennen. Vielmehr sind in den Spuren, in denen die Produkte der Behandlung mit den einzelstrangspezifischen *RNasen T1* und *A* aufgetragen wurden, im Vergleich zu *pStr* stärkere Signale zu erkennen. Hinweise auf vorliegende dsRNA-Bereiche gibt ein leichter Schatten in der Spur von *RNase V1*, sowie das fehlende Signal für *S1-Nuklease* und den noch relativ schwachen Signalen bei *RNase T1* und *A*. Beides wird deutlich wenn man mit den Ergebnissen für die Variante *pStr47* in Abb. 38 vergleicht, bei der erheblich stärkere Signale zu sehen sind. Es könnte also auch hier mindestens zwei parallele Strukturen zu geben.

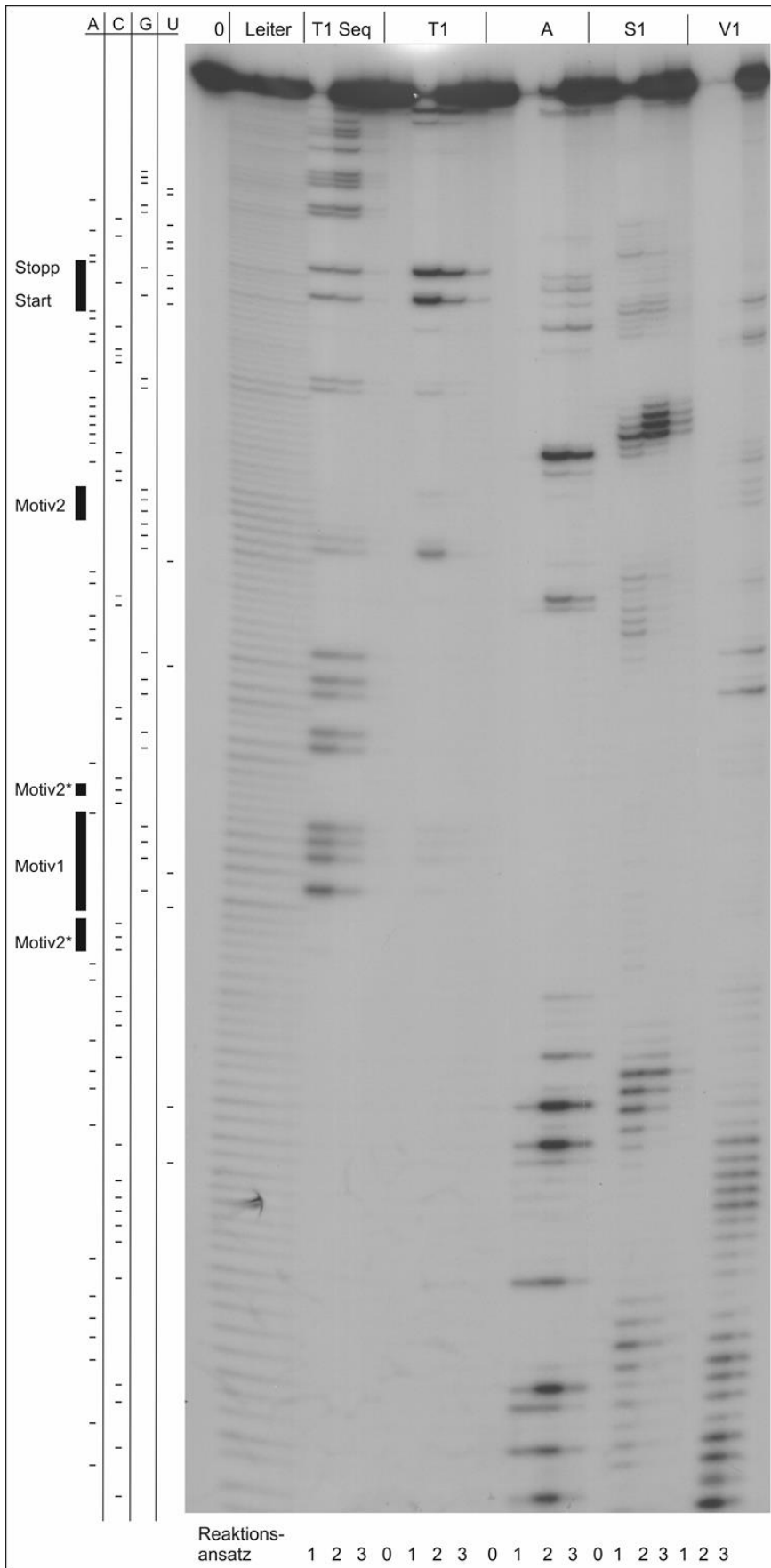


Abb. 46 zeigt das Ergebnis eines Strukturaufklärungsexperiments mit dem Konstrukt *pStr53*. Die Motive, sowie *VP1-Stopp* und *VP2-Start* sind mit Balken markiert. Die nachfolgend gezeigten Ausschnitte stammen aus diesem Gelbild.

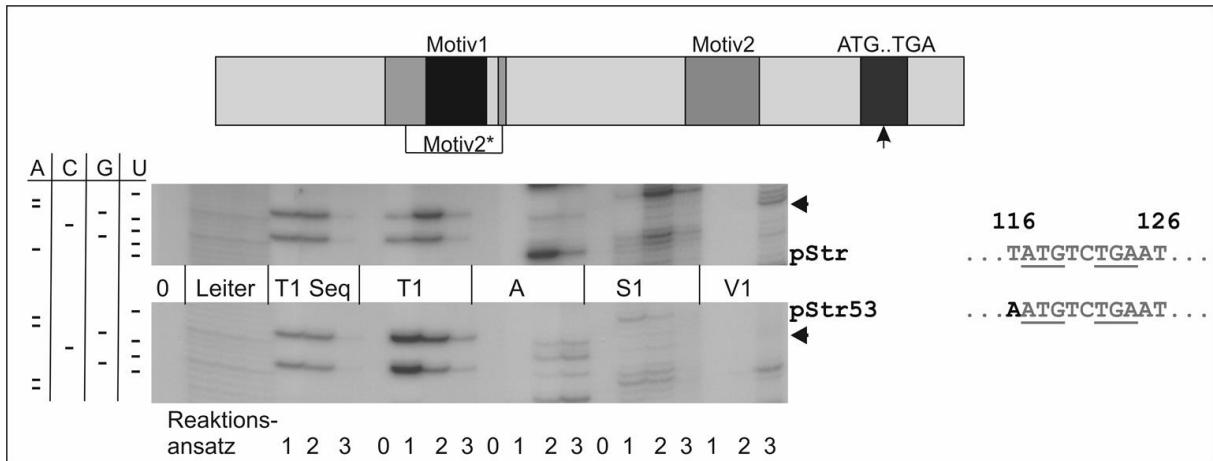


Abb. 47 Vergleich der Basen 116-127 des *pStr53* mit dem Wildtyp. Die veränderte Base ist schwarz hervorgehoben, Start- und Stopp-Triplett sind unterstrichen. Im Vergleich der Spuren in denen die Produkte der Behandlung mit *RNase V1* aufgetragen sind, ist zu erkennen, dass die im Wildtyp deutlichen Indizien für eine Interaktion im Bereich der Basen 120-123 in *pStr53* nicht mehr zu sehen ist (siehe Pfeile). Allerdings gibt es auch für die ssRNA spezifischen Enzyme keine eindeutigen, starken Signale.

Einen weiteren Hinweis auf unterschiedliche Strukturen findet sich in Abb. 48. Dort kann man zwei Auffälligkeiten beobachten. Zum einen ist auch im Bereich von *Motiv 1*, besonders für die drei Guanine an den Positionen 52-54 für die gefaltete RNA mit *RNase T1* ein im Vergleich zum Wildtyp sehr stark abgeschwächtes Signal zu sehen. Zum anderen ist in der Spur der *RNase V1* auf Höhe der Basen 58-61 ein stark geschwächtes Signal zu erkennen, welches zu dem schwachen Signal für die Positionen 120-123 passen würde. Sowohl nach den Ergebnissen der Expressionsexperimente mit der deutlichen Funktionsreduktion der TURBS, als auch schwachen Signalen für im Wildtyp wichtige Interaktionen, kann vermutet werden, dass ein Großteil der TURBS-Regionen in einer nicht funktionalen Faltung vorliegt.

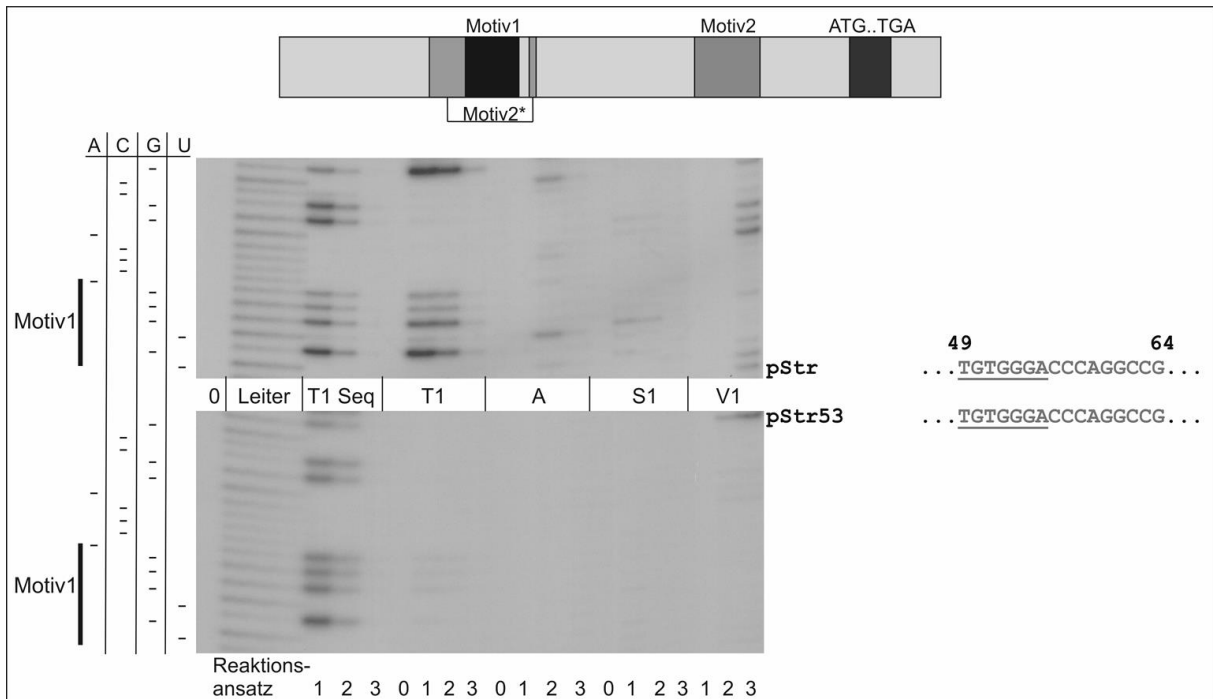


Abb. 48 zeigt die Basen 49 bis 64. Es gibt an diesen Positionen keinen Unterschied in den Sequenzen der Konstrukte. Direkt anschließend liegt jedoch bei *pStr53* eine 15 Basen Deletion. Die Strukturen in dem Bereich unterscheiden sich deutlich. So sind in der *RNase T1*-Spur in *pStr53* die Guanine von *Motiv 1* in der gefalteten RNA kaum zu erkennen, dies

spricht für dsRNA zumindest beim überwiegenden Teil der Moleküle. Die Guanine 60 und 61 zeigen weiterhin dsRNA Eigenschaften und wenn man in diesem Bereich die Spur der *RNase V1* betrachtet, kann man auch schwache Signale für den Rest der im Wildtyp vorhandenen dsRNA von 58-61 erkennen. Aber auch hier scheint eine nicht-Wildtyp Faltung zu dominieren. Betrachtet man das Guanin 64 (1.Signal von oben) zeigt sich dieses in *pStr53* als gepaart, was im *pStr* nicht der Fall ist.

Zuletzt wurde in dieser Arbeit das Konstrukt *pStr54* untersucht. Dieses wurde ursprünglich nur erstellt um nachzuweisen, dass die vier Basen, welche im Vergleich zum Wildtyp in *pExp53* nicht verändert wurden, keinen Einfluss auf die Faltung haben. In den Abb. 49 und 50 ist zu sehen, dass dem nicht so ist. Diese Bilder vergleichen *pStr53* und *pStr54* und man kann sehen, dass sich die Faltung in *pStr54* ändert und zwar eindeutig in Richtung der Wildtyp-Struktur. Dies unterstreicht einmal mehr die Probleme, welche in dieser Arbeit zu bewältigen waren. Kleine Änderungen, irgendwo in der RNA, führen zu Effekten, welche zumindest durch die Sekundärstruktur nicht zu erklären sind. Der Bereich um die Start/Stopp-Region, welche in Abb. 49 gezeigt wird, ist noch überwiegend gleich. Wobei die Zugänglichkeit der Guanine für *RNase T1* bei *pStr54* erhöht erscheint. Dagegen sind die Basen dazwischen nicht besser zugänglich für *RNase A* und *S1-Nuklease*, man könnte eher von einer schlechteren Zugänglichkeit sprechen.

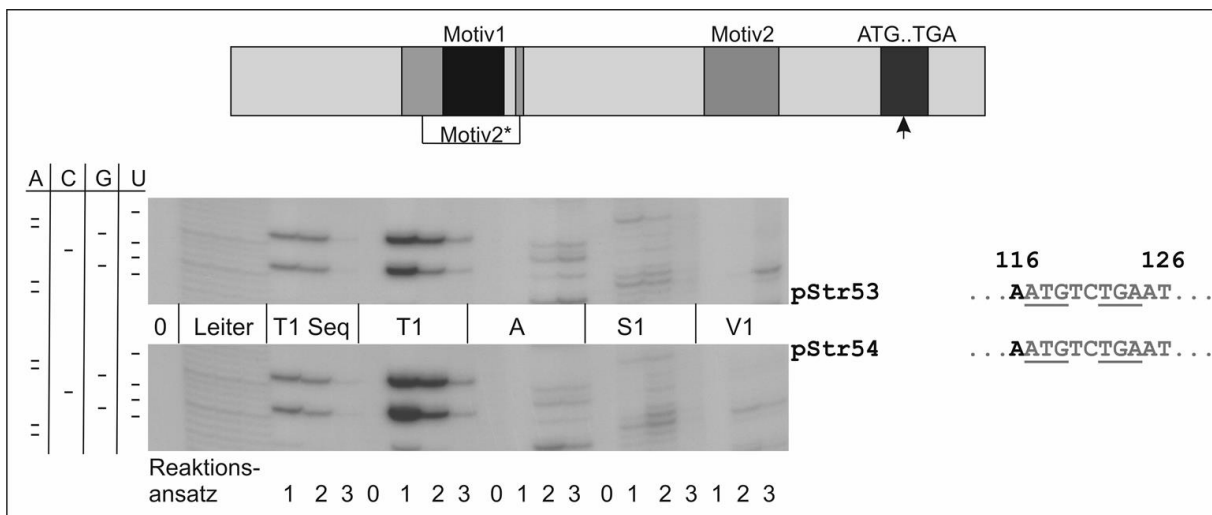


Abb. 49 Vergleich der Basen 116-127 des *pStr53* mit *pStr54*. Die gegenüber dem Wildtyp veränderte Base ist schwarz hervorgehoben, Start- und Stopp-Triplett sind unterstrichen. In beiden Varianten kann das im Wildtyp beobachtete Signal für dsRNA von *RNase V1* nicht beobachtet werden (vgl. Abb. 41). Allerdings ist auch kein klares Signal für die ssRNA spezifischen Enzyme zu sehen.

Abb. 50 zeigt den Bereich ab *Motiv 1*, welches hier eindeutig besser für *RNase T1* zugänglich ist, also ungepaart vorliegt. Im Vergleich zum Wildtyp sind die Signale aber auch hier schwächer. Genauso verhält es sich mit den Basen an den Positionen 58-61, auch diese sind etwas deutlicher als dsRNA zu erkennen als in *pStr53*, aber dennoch schwächer als im Wildtyp. Generell scheint es auch hier mindestens zwei verschiedene Strukturen zu geben, wobei das Gleichgewicht eher in Richtung des Wildtyps verschoben wird, wenn man *pStr53* zum Vergleich heranzieht. Auf die VP2-Expression hatte dies jedoch keinen Einfluss.

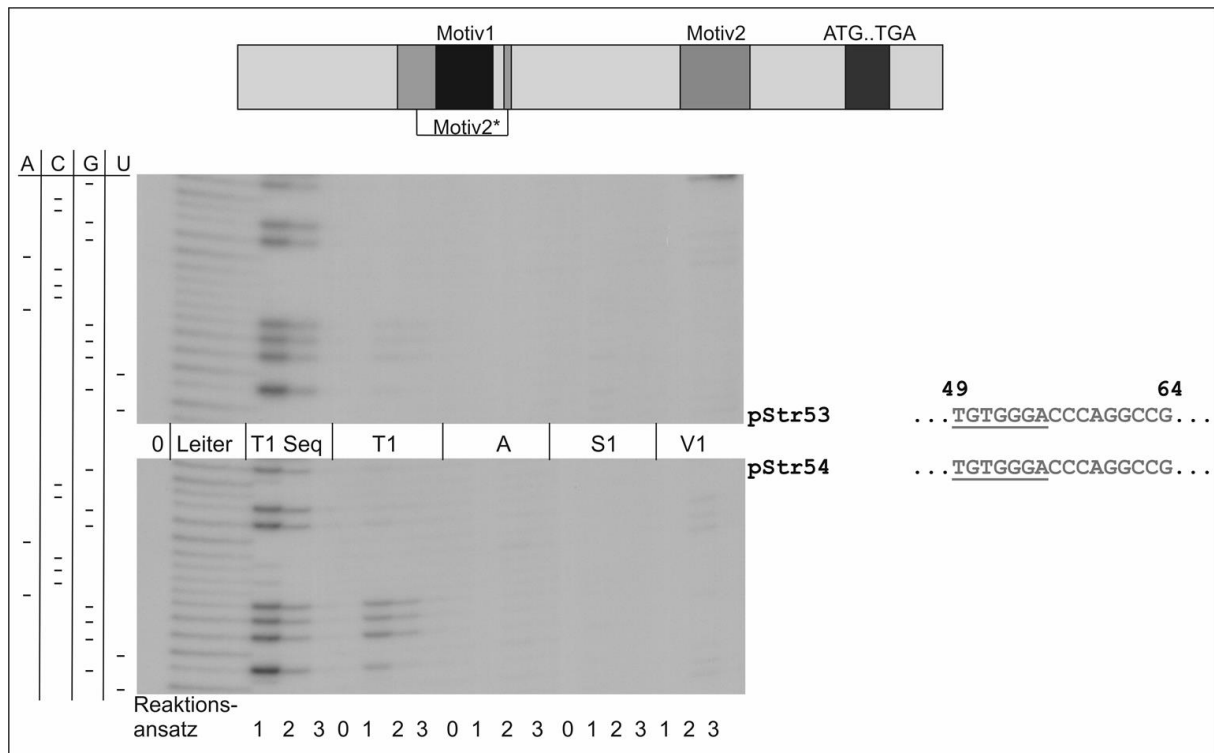


Abb. 50 zeigt die Basen 49 bis 64, es gibt an diesen Positionen keinen Unterschied zwischen den Konstrukten. Die Strukturen in dem Bereich unterscheiden sich jedoch. So sind in der *RNase T1*-Spur in *pStr53* die Guanine von *Motiv 1* in der gefalteten RNA kaum zu erkennen, während diese für *pStr54* deutlich zu sehen waren. Die Guanine 60 und 61 zeigen bei beiden dsRNA Eigenschaften. Wenn man in diesem Bereich die Spur der *RNase V1* betrachtet, kann man auch schwache Signale für den Rest der im Wildtyp vorhandenen dsRNA von 58-61 erkennen, wobei dies für *pStr54* leichter fällt.

Diskussion

Die Umsetzung, der in den Nukleinsäuren gespeicherten genetischen Information in Proteine, als die Haupteffektoren der Zelle, erfolgt durch die Translation und stellt eine entscheidende Fähigkeit von Lebewesen dar. Durch diesen Mechanismus können die für das Leben notwendigen Proteine synthetisiert werden. Viren nutzen die Maschinerie ihrer Wirtszellen aus, um ihre genetische Information in Proteine zu übertragen. Dabei gibt es verschiedene zelluläre Hindernisse, welche durch die Viren umgangen werden müssen.

Eines dieser Hindernisse ist der Wettbewerb bei der Translation zwischen viralen und zellulären mRNAs. Die zellulären prä-mRNAs werden im Zellkern auf verschiedene Arten prozessiert und modifiziert, wodurch die mRNAs entstehen [Review (Lee and Young 2000, Keene 2007)], die vom Translationssystem als Substrat akzeptiert werden. So müssen sowohl ein 5' G-Cap als auch ein 3' Poly-A-Schwanz angefügt werden, damit die RNA effizient translatiert werden kann. Dabei ermöglicht die Cap-Struktur über die Interaktion mit eukaryotischen Initiationsfaktoren die Translationsinitiation, wohingegen der Poly-A-Schwanz vor allem für die Stabilität der RNA benötigt wird, jedoch auch an der Translationsinitiation beteiligt ist. Im Normalfall geht bei Eukaryoten der am 5' Ende gebundene Präinitiationskomplex, bestehend aus der kleinen Untereinheit des Ribosoms und Initiationsfaktoren, in den sogenannten „Scanning“ Modus über und erreicht dadurch das Startcodon, an dem die Translation startet und bis zum Stoppcodon fortgeführt wird [Review

(Sonenberg and Hinnebusch 2009)]. Die mRNAs sind in der Regel monocistronisch, codieren also nur für ein Protein.

Im Gegensatz zum zellulären mRNA Reifungssystem findet die Replikation und mRNA Synthese von RNA-Viren meist im Cytoplasma statt. Somit stehen die zellulären RNA Modifikationssysteme, die für das Capping und die Polyadenylierung sorgen, nicht zur Verfügung. Viren haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um dennoch translatierbare RNAs zu generieren, die zudem bevorzugt translatiert werden. Am bekanntesten sind wohl interne Ribosomenbindungsstellen [Internal Ribosome Entry Sites (IRES)] (Jang, Krausslich et al. 1988, Pelletier and Sonenberg 1988), welche die Translationsinitiation unabhängig von Cap-Strukturen und fernab vom 5'Ende erlauben. Die Funktion der IRES-Elemente ist von ihrer RNA-Struktur abhängig. So können diese Strukturen direkt mit der 40 S Untereinheit des Ribosoms oder bestimmten Initiationsfaktoren interagieren und damit die Translation initiieren. Auf manche Initiationsfaktoren, welche für die Translation von mRNAs mit G-Cap benötigt werden, können einige IRES-Elemente verzichten. Beispielsweise benötigt die Hepatitis C Virus (HCV)-IRES nur den 43 S Komplex, bestehend aus der 40 S ribosomalen Untereinheit und den Faktoren eIF2 und eIF3 [Review in (Pestova, Kolupaeva et al. 2001)]. Eine weitere Möglichkeit, welche von einigen Viren praktiziert wird, ist das Übertragen von zellulären Cap-Strukturen auf die virale RNA („Cap-snatching“ (Bouloy, Plotch et al. 1978)). Caliciviren verwenden als funktionellen Ersatz für eine Cap-Struktur zur Translationsinitiation ein als VPg bezeichnetes Protein (Daughenbaugh, Fraser et al. 2003, Goodfellow, Chaudhry et al. 2005, Chaudhry, Nayak et al. 2006), welches ca. 15 kDa Masse besitzt und kovalent am 5' an die RNA gebunden ist (Meyers, Wirblich et al. 1991, Herbert, Brierley et al. 1997). Zusätzlich wird von diesen Viren für die Expression des minoren Casidproteins VP2 eine weitere Strategie verwendet, um Translation unabhängig von Cap-Strukturen und weit vom 5' Ende der RNA entfernt zu starten. Dies geschieht über einen Reinitationsmechanismus, der nur nach erfolgreicher Termination der Translation des stromaufwärts gelegenen Leserasters erfolgen kann.

Dieser bei Eukaryoten ungewöhnliche Vorgang wird bei Caliciviren über die sogenannte „Termination Upstream Ribosome Binding Site“ (TURBS) vermittelt. Nach der Translation des VP1 kann eine Reinitiation im VP2-Leseraster erfolgen. Die Reinitiationsrate im VP2-Leseraster ist deutlich niedriger als die Initiation im VP1-Leseraster. Sie beträgt im Falle der in der vorliegenden Arbeit untersuchten TURBS des RHDV in etwa 15 %, so dass auch noch eine Regulation der VP2-Expression abhängig von der Expression des VP1 erfolgt. Eine *de-novo* Initiation am VP2-Startcodon unabhängig von der VP1 Translation ist nicht möglich (Meyers 2003). Die sg mRNA besitzt einen 5' ORF, welcher vom 5' terminal gebundenen VPg gesteuert in das VP1 translatiert wird und einen 3' ORF, der abhängig von der Translation des 5' ORF translatiert wird und für die Expression des VP2 sorgt. Die TURBS ermöglicht die Initiation an einem 2. Startcodon, das weit vom 5' Ende der RNA entfernt liegt und vom Ribosom über die Translation des 1. Rasters erreicht wird. Es konnte gezeigt werden, dass das *Motiv 1* der TURBS mit der 18S rRNA interagiert und dass diese Interaktion essentiell für die Reinitiation ist (Luttermann and Meyers 2007). Die Modellvorstellung für die TURBS-Funktion geht davon aus, dass das Ribosom über diese Interaktion an der RNA gehalten wird und dadurch die Möglichkeit besteht, dieses für einen Neustart verfügbar zu machen und somit eine Initiation im VP2-ORF zu ermöglichen (Luttermann and Meyers 2007). Ob die Interaktion schon vor oder erst nach Termination der Translation des VP1 ausgebildet wird, ist bisher nicht geklärt.

Aufgrund der bereits bei vielen funktionellen RNAs, beispielsweise IRES-Elementen und tRNAs, nachgewiesenen Bedeutung der RNA-Struktur für deren Funktionalität, stellte sich die der Frage nach

der Bedeutung von Strukturen für die TURBS-Funktion. Vor Beginn der hier beschriebenen Arbeiten war lediglich die Rolle eines Strukturelements der TURBS mittels Mutationsanalyse nachgewiesen worden. Es handelt sich dabei um die *Motiv2/2** Interaktion (Luttermann and Meyers 2009).

Zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von weiteren Sekundärstrukturelementen der RHDV-TURBS und die Überprüfung von deren funktioneller Bedeutung. Theoretisch kann die RNA Sekundärstruktur berechnet werden. Die verfügbaren Algorithmen basieren im Wesentlichen auf einer Minimierung der freien Energie. Abweichungen der berechneten von der realen Struktur sind üblich, weil die RNA Faltung unter anderem auch kinetisch kontrolliert ist. Die Berechnung der Struktur über einen Webserver (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py>) mit dem Programm mfold (M. Zuker 1999) ergab die in Abb. 51 gezeigte Struktur. Diese war jedoch nicht mit ersten experimentell erhaltenen Daten zur RHDV-TURBS vereinbar (Kreher 2009).

In der berechneten Struktur liegt das *Motiv 1* zum größten Teil gepaart vor. Dies kann auf Basis der sowohl in vorhergehenden als auch in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten ausgeschlossen werden. Eine Paarung von *Motiv 2/2**, wie ebenfalls bereits für FCV beschrieben und durch Daten für RHDV untermauert, ist in der berechneten Struktur ebenfalls nicht zu finden. Des Weiteren widerspricht auch der große Anteil an gepaarten Basen eindeutig den experimentellen Daten aus dieser Arbeit. Diese Diskrepanz von experimentellen Daten und berechneten Strukturen war auch schon Bestandteil von Veröffentlichungen (Deigan, Li et al. 2009). Berechnete Strukturen sollten also immer mit experimentellen Daten untermauert werden.

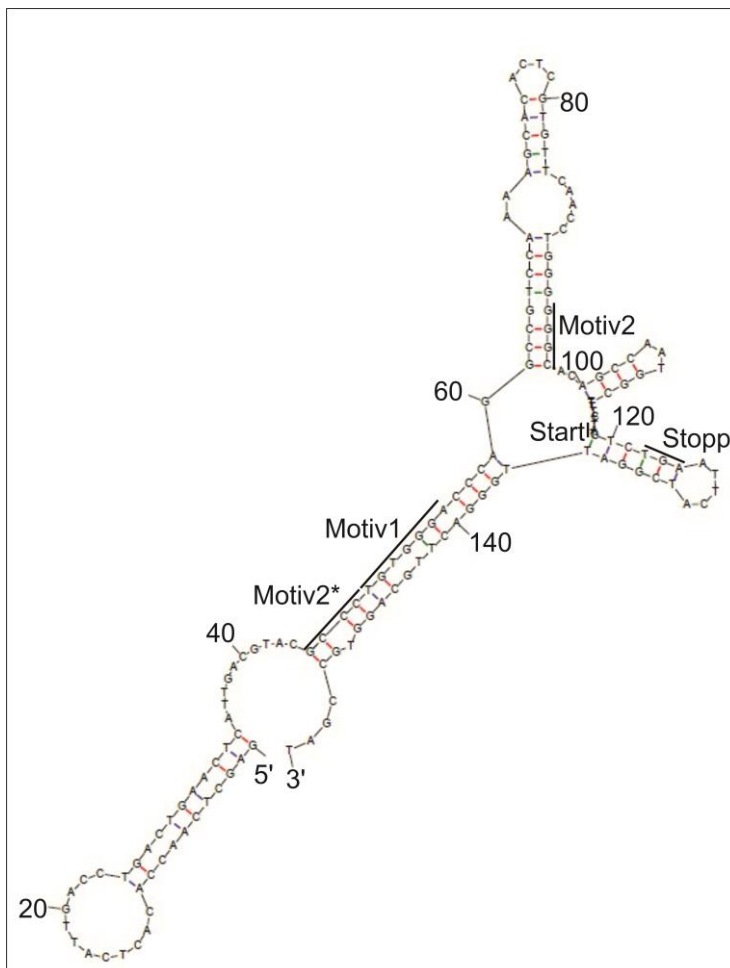


Abb. 51 Berechnetes Modell der TURBS-Sekundärstruktur mit dem Programm mfold (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py>). Die Motive, VP2-Startcodon und VP1-Stoppcodon sind nachträglich durch Striche kenntlich gemacht und beschriftet worden. Entsprechend der Berechnung stellt dies die energetisch günstigste Struktur dar.

1 Analyse der TURBS-Sekundärstruktur mittels 5' markierter RNA

1.1 Die Wildtyp-TURBS

Die zu Beginn dieser Arbeit verwendete Technik der Strukturaufklärung von 5' markierter RNA mittels limitierter Spaltung durch Enzyme lieferte ein Produktmuster der gesamten untersuchten RNA. Aus diesem Muster konnte darauf geschlossen werden, welche Regionen der TURBS gepaart und welche einzelsträngig vorliegen. Wie im Ergebnisteil (Abschnitt 2.2) zu sehen ist, besteht die TURBS vor allem aus ungepaarter RNA. Die Signale für dsRNA, repräsentiert durch Spaltung mit *RNase V1*, sind eindeutig in der Minderheit. Es gab des Weiteren Bereiche, in denen sowohl Einzelstrang- als auch Doppelstrang-RNA Signale erhalten wurden. Dies ist beispielsweise am Abschnitt zwischen den Guaninen 64 und 72 zu sehen, welcher sowohl Signale für *S1-Nuklease* und *RNase A* (beide einzelstrangspezifisch) als auch für *RNase V1* (doppelstrangspezifisch) liefert. Als Erklärung kommen entweder parallel existierende alternative Strukturen in Frage oder in diesem Bereich auftretendes „base-stacking“ durch Interaktion der Ringsysteme benachbarter Basen, das *RNase V1* auch erkennt und schneidet. Aufgrund der Spaltung durch zwei einzelstrangspezifische Enzyme scheint das „base-stacking“ als Erklärung für das V1-Signal wahrscheinlicher. Es waren außerdem an verschiedenen Stellen des Gels, mehr oder weniger ausgeprägt, einzelne Spaltbanden für *RNase V1* zu sehen. Diese fielen zum Teil mit Signalen für einzelstrangspezifische Enzyme zusammen. Aufgrund dieser Signale, sowohl für Einzel- als auch Doppelstrang spaltende Enzyme, wurden diese Positionen nicht als eindeutig dsRNA betrachtet, sondern als nicht auswertbar identifiziert. Unterstützt wurde diese Klassifikation durch die nicht stricte Doppelstrangspezifität von *RNase V1* und die verbreitete Annahme, dass isolierte Basenpaare nicht stabil sind. Die Bereiche stromabwärts der Start/Stopp-Region wurden nicht in das Strukturmodell einbezogen, weil die Kernstruktur der TURBS auch bei Analyse der 3' terminal verkürzter RNA unverändert erhalten bleibt. So führte die Analyse einer nach *EcoRI*-Spaltung des Konstrukts *pStr* erhaltenen RNA zu keiner Veränderung der Signale im 5' seitigen Bereich der RNA (vgl. Ergebnisteil Abschnitt 4.2 Abb. 13). Dies hat zur Folge, dass die stromabwärts gelegenen Bereiche nicht mit den Sequenzen aus dem TURBS Bereich interagieren können, weil *EcoRI* direkt hinter der Start/Stopp-Region schneidet. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass ein kürzlich publiziertes Ergebnis einer Modell-Computersimulation von RNA-Strukturen in der RHDV-TURBS, das eine potentielle Haarnadelstruktur, welche die Paarung des Start/Stopp-Bereiches mit stromabwärts gelegenen Sequenzen zeigt, nicht zutreffend sein kann (Haß, Luttermann et al. 2014). Diese Ergebnisse zeigt die Tücken der Simulation von RNA-Strukturen über Computerprogramme, denn obwohl die Interaktion theoretisch möglich ist konnten in dieser Arbeit durch die 3' Verkürzung Daten gewonnen werden, welche die Bildung dieser Haarnadelstruktur ausschließen. Diese Erkenntnis basiert darauf, dass die stromabwärts gelegenen potentiellen Interaktionspartner vor der Strukturanalyse entfernt werden konnten, ohne dass sich die Struktur des stromaufwärts gelegenen Bereiches der TURBS änderte. Diese Schlussfolgerung passt gut zu Daten aus der zuvor genannten Publikation, die zeigen, dass eine Störung der potentiellen Haarnadelstruktur keinen Einfluss auf die Translationsinitiation hat.

Diejenigen Bereiche der RNA besitzen aufgrund ihrer endständigen Lage in dem untersuchten Fragment einen höheren Freiheitsgrad, den sie in der vollständigen sg mRNA nicht besitzen. Dadurch könnte ihr Verhalten in Strukturanalysen von der natürlichen Situation abweichen. Ebenso wurden

die kürzesten Spaltfragmente der Sekundärstrukturanalysen, die dem 5' terminalen Abschnitt der RNA entsprechen, wegen ihrer terminalen Lage nicht betrachtet. Das Konstrukt *pStr* wurde von vornherein so geplant, dass diese Elemente außerhalb des publizierten minimalen TURBS Bereiches liegen (Meyers 2003).

Entsprechend der obigen Ausführungen beschränkte sich der Bereich der *pStr*-RNA, der für die Strukturanalyse ausgewertet wurde, auf die Basen 30-125. Die Strukturanalyseexperimente lieferten für diesen Bereich zwar Daten ob die Basen gepaart oder ungepaart vorlagen, ließen aber keine direkten Rückschlüsse auf die jeweiligen Interaktionspartner eines dsRNA Bereiches zu. Aus diesem Grund wurden ausgehend von den Daten aus den Strukturaufklärungsexperimenten und den Sequenzdaten Modelle erstellt, welche die wahrscheinlichsten Interaktionen abbilden (siehe Abb.52).

1.2 Mutageneseexperimente

Das aufgrund der Daten aus der Sekundärstrukturanalyse der Wildtyp-TURBS erstellte Modell wurde anschließend mittels Mutageneseexperimenten verifiziert. Dabei war das Ziel, die prognostizierte Interaktion mit einer primären Substitution zu zerstören und dann sowohl auf Strukturebene, als auch auf der Funktionsebene zu testen, ob Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Mutante festzustellen waren. Wenn in den Strukturdaten die Änderung einer Seite der postulierten Interaktion keinen Einfluss auf den möglichen Interaktionspartner zeigten, musste eine neue Hypothese aufgestellt werden (vgl. Ergebnisteil Abschnitt 4.2 mit *EcoRI* verkürzte Variante). Wenn sich durch die Substitution von Basen, welche als dsRNA vorlagen, auch bei den vermuteten Partnern Änderungen im Strukturanalyseexperiment einstellten, wurde die jeweilige Partnersequenz komplementär zum ersten Austausch substituiert, so dass wieder eine Interaktion möglich sein sollte. Entsprechende Analysen waren schon für das FCV für die Motiv 2/2* Interaktion erfolgreich durchgeführt worden (Luttermann and Meyers 2009), so dass im Rahmen der hier beschriebenen Analysen des RHDV auf Änderungen in diesen Sequenzen verzichtet wurde. Eindeutig funktioniert hat dieser Ansatz bei der Untersuchung der restlichen Interaktionen nur für die im Ergebnisteil unter Abschnitt 4.3 beschriebene Variante *pExp16/pStr16* und ihre komplementäre Variante *pExp24/pStr24* (Ergebnisteil Abschnitt 4.4). Hier war sowohl auf Strukturebene, als auch auf Funktionsebene eine eindeutige Komplementierung möglich. Im Falle der postulierten Interaktion der Basen 34-36 mit den Basen 80-82 (*pExp18/pStr18* und komplementär *pExp35/pStr35*) war dagegen schon in den Strukturaufklärungsexperimenten ersichtlich, dass keine Komplementation stattgefunden hatte. In der transienten Expression zeigte sich schon bei der Variante *pExp18* nur eine geringe Funktionsbeeinträchtigung der TURBS, mit einer VP2-Expression von 86 % des Wildtypniveaus. Die an beiden vorgeschlagenen Interaktionssequenzen veränderte Variante *pExp35* zeigte mit 88 % des Wildtypniveaus ähnliche Funktionalität. Dies korreliert mit den Daten aus dem Strukturaufklärungssystem, welches ebenfalls keine Komplementierung zeigte. Mit diesen Ergebnissen ist aber eine Paarung der beiden vorgeschlagenen Partner nicht grundsätzlich auszuschließen. Entscheidend festzuhalten bleibt aber, dass die Bedeutung dieser potentiellen Interaktion für die Reinitiation sehr gering ist, so dass diese Paarung nur eine untergeordnete Rolle in der TURBS-Funktion spielen kann. Interessanter ist die in dieser Arbeit gefundene Interaktion der Basen 58-61 mit den Basen 120-123. Die Basen 58-61 liegen nahe des *Motivs 1*, während ihre möglichen Interaktionspartner im Bereich des *VP1-Stopp-* und *VP2-Startcodons* lokalisiert sind. Diese Interaktion bringt in der gefalteten TURBS das *Motiv 1* in die Nähe des Start/Stop-Bereiches. Allerdings kann die Interaktion sich nicht ausbilden, während das translatierende Ribosom im Bereich

des *Start-/Stoppcodons* gebunden ist und damit die Reinitiation nicht direkt beeinflussen. Sie könnte aber auf andere Art involviert sein. Wichtig ist festzuhalten, dass diese Interaktion in jedem Fall eine Erklärung dafür liefern könnte, warum die Translation am *VP2-Startcodon* nicht unabhängig von der *VP1-Expression de-novo* initiiert werden kann [Luttermann, Meyers nicht publizierte Daten und (Meyers 2003)], weil der Zugang zum *VP2-Startcodon* durch die Interaktion blockiert würde. Schon in vorangegangenen Arbeiten konnte mit Deletionsmutanten die Bedeutung der Basen 58-61 nachgewiesen werden (Meyers 2007).

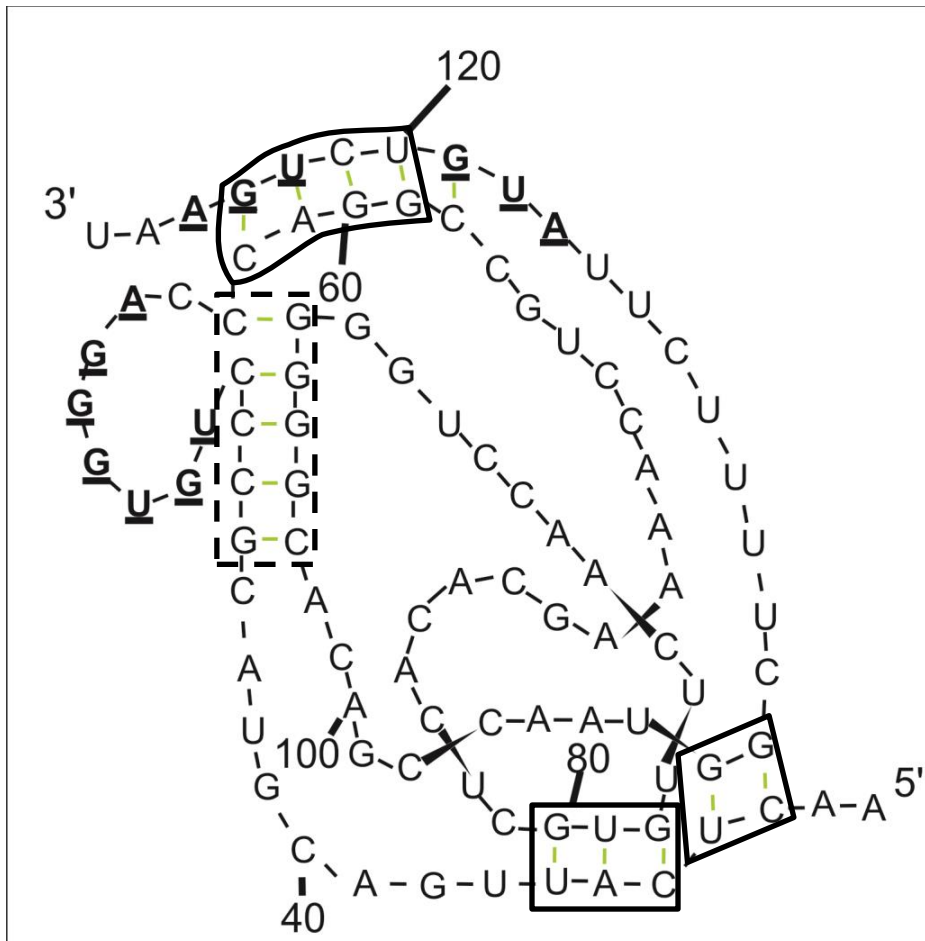


Abb. 52 Modell-Darstellung der TURBS-Region mit der bereits zuvor nahegelegten und hier bestätigten Interaktion der *Motive 2* und *2** (gestrichelter Kasten) und den neu gefundenen dsRNA Bereichen, die durch schwarze Kästchen hervorgehoben sind. Die Sequenzen des *Motiv 1*, sowie das *VP1-Stoppcodon* und *VP2-Startcodon* sind fett und unterstrichen dargestellt.

Die Untersuchung der postulierten Interaktion der Basen 58-61 mit den Basen 120-123 gestaltete sich schwierig, weil letztere das *UG* des *VP1-Stoppcodons* enthalten und somit hier auch die Primärsequenz funktionell wichtig ist. Zudem wurden Substitutionen der Basen 58-61 nur sehr schlecht toleriert. Sie führten immer zu einem fast vollständigen Funktionsverlust der TURBS, was auf die Bedeutung dieser Basen für die Reinitiation hindeutet. So wurde bei den Varianten *pExp15*, *pExp19* und *pExp20*, bei denen die Basen 58-61 gegen verschiedene andere Basen ausgetauscht wurden, eine *VP2-Expression* von weniger als 7 % des Wildtyps beobachtet (vgl. Ergebnissteil Abschnitt 4.5). Die Strukturanalysedaten der Konstrukte *pStr15* und *pStr19* (nicht gezeigt) stimmten mit den mit *pStr36* gewonnenen Ergebnissen weitestgehend überein (vgl. Ergebnissteil Abschnitt 4.4).

1.3 Weitergehende Untersuchungen der Interaktion der Basen 58-61 mit der Start/Stopp-Region

Die Experimente mit den zuvor beschriebenen Konstrukten hatten ergeben, dass eine Mutation der Basen 58-61 zu einer Umfaltung der TURBS-Struktur führte. Aus dieser Erkenntnis leitete sich ein neuer Ansatz ab. Die Interaktion der beiden potentiellen Interaktionspartner sollte mit Einzelaustauschen gestört werden. Für den Bereich der Basen 120-123 existierte bereits das Konstrukt *pStr7*, bei diesem war das Cytosin 121 durch ein Adenin ersetzt worden (vgl. Ergebnisteil Abschnitt 4.2). Für den Bereich der Basen 58-61 wurde die Konstrukte *pExp46/pStr46* erstellt. Diese trugen an Position 60 ein Uracil anstatt eines Guanins. Damit waren zwei Konstrukte vorhanden, welche die Interaktion des postulierten Basenpaares Guanin 60 mit Cytosin 121 durch einseitige Substitution störten. Diese Konstrukte zeigten unabhängig voneinander im transienten Expressionssystem eine VP2-Expression von 53 % (*pExp7*) bzw. 56 % (*pExp46*) des Wildtypniveaus. Die Tatsache, dass die Beeinflussung der VP2-Expression durch Veränderungen in den beiden vorgeschlagenen Interaktionspartnern ein, im Rahmen der Messgenauigkeit, identisches Ausmaß hatte, spricht für die prognostizierte Interaktion. Ebenso zeigten die Strukturanalysen der mutierten Sequenzen eine Beeinflussung des jeweils nicht veränderten Bereichs der postulierten Interaktion. Die Kombination der Substitutionen aus *pExp7/pStr7* und *pExp46/pStr46* in den Konstrukten *pExp47/pStr47* in einem Molekül, generierte ein Adenin-Uracil-Paar anstelle des Guanin-Cytosin-Paares der Wildtyp-TURBS. Das Konstrukt *pExp47* zeigte in der transienten Expression allerdings keine Komplementierung. Stattdessen sank die VP2-Expression auf 7 % des Wildtypniveaus ab. Eine Erklärung für dieses Ergebnis lieferte die Strukturanalyse mit dem Konstrukt *pStr47*. Diese zeigte nämlich eine deutliche Änderung der RNA-Sekundärstruktur anstelle der zunächst erwarteten Restaurierung der Wildtypstruktur. Die weitere Reduzierung der VP2-Expressionsrate bei *pExp47*, im Vergleich zu *pExp46*, könnte also am, in der Strukturanalyse beobachteten Verlust der untersuchten Interaktion liegen. Dagegen kann der Umstand, dass *Motiv 1* in dieser Mutante nicht mehr für einzelstrangspezifische Enzyme zugänglich ist, nicht die entscheidende Rolle spielen, weil diese Veränderung schon bei *pExp46* zu sehen war und dieses Konstrukt noch deutlich mehr VP2-Expression zeigte. Hinweise auf eine Interaktion der Bereiche der Basen 58-61 mit den Basen 120-123 konnten also mit den Einzelaustauschen in *pStr7* und *pStr46* gefunden werden. Dort bewirkt die Änderung bei einem der postulierten Interaktionspartner die Änderungen der Spaltmuster im Bereich des vermuteten anderen Interaktionspartners.

1.4 Konstrukte mit synthetischer DNA

Die beschriebenen Analysen hatten Hinweise darauf ergeben, dass die TURBS vier Sekundärstrukturelemente enthält. Diese sind, neben der *Motiv 2/2**-Paarung, die Interaktionen der Basen 32-33 mit den Basen 107-108, der Basen 33-35 mit den Basen 80-82 und die Interaktion der Basen 58-61 mit den Basen 120-123. In einem weiteren Schritt sollte überprüft werden ob die Anwesenheit dieser Elemente zusammen mit dem als Primärstrukturmotiv wirksamen *Motiv 1* sowie dem VP1-Stopp- und VP2-Startcodon in einer weitgehend veränderten Sequenzumgebung ausreicht, um eine Reinitiation der Translation zu ermöglichen. Dazu wurden die im Ergebnisteil unter dem Abschnitt 2.8 behandelten TURBS-Varianten *pExp38/pExp50* erstellt. In diesen wurden Basen, welche nicht an Interaktionen beteiligt sein sollten bzw. nicht zu den *Motiven 1* und *2/2** gehörten, zu Adenin bzw. Cytosin mutiert. Dies wurde durchgeführt, um Basenpaarungen unter Beteiligung anderer Bereiche der Sequenzen und somit die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern,

welche nicht den postulierten Interaktionen entsprachen. Bei *pExp50* wurden zusätzlich 15 Basen in der Region zwischen *Motiv 1* und *Motiv 2* deletiert. Die TURBS-Funktionalität wurde durch die Austausch in *pExp38* auf 36 % des Wildtypniveaus gesenkt. Die zusätzliche Deletion in *pExp50* hatte keine zusätzliche Reduktion der Expression zur Folge (34% des Wildtypniveaus, die 2 % Abweichung gegenüber *pExp38* liegen innerhalb der Messungenauigkeit). Der deletierte Bereich kann also als unwichtig für die Funktion der TURBS angesehen werden. Daraus kann allerdings keine Verzichtbarkeit dieser Sequenz für das Virus abgeleitet werden, denn die Deletion betrifft fünf Aminosäuren des VP1. Der Verlust dieser fünf Aminosäuren könnte dessen Funktionalität erheblich stören. In dieser Arbeit wurden keine Versuche zur Funktionsfähigkeit dieses Proteins im Virus gemacht, so dass dazu keine Aussage getroffen werden kann. Für beide *pExp*-Varianten ist festzustellen, dass diese vor dem Hintergrund des Ausmaßes der Veränderungen eine sehr gute Reinitiationsrate zeigten. Viele Varianten mit deutlich geringeren Eingriffen in die Primärstruktur wiesen sehr viel stärkere Effekte auf (Meyers 2003, Meyers 2007, Kreher 2009). In vorangegangenen Arbeiten haben Deletionen von jeweils drei Basen in dem in *pExp50* deletierten Bereich starke Funktionsbeeinträchtigungen gezeigt. Dagegen wurden Deletionen von größeren Bereichen interessanterweise besser toleriert (Kreher 2009). Bei Untersuchungen dieser aus der Arbeit von F.Kreher stammenden TURBS-Varianten, sowohl der Deletion von drei Basen als auch der Deletion von neun Basen (die die erwähnte Deletion von drei Basen enthielt) konnte jedoch keine vom Wildtyp abweichende Sekundärstruktur festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Zusammen mit den Daten, die vor allem im Bereich zwischen *Motiv 1* und *Motiv 2* konnte in *pStr38* eine bessere Zugänglichkeit für *S1-Nuklease* zeigten (Dieses Enzym ist mit 29 kDa in etwa doppelt so schwer wie die anderen Enzyme und müsste durch sterische Hinderung stärker blockiert werden). Könnte dies ein Hinweis auf mögliche Tertiärstrukturen sein, welche sich mit den verwendeten Methoden nicht untersuchen lassen.

Nachdem die Funktionalität der Varianten *pExp38* und *pExp50* nachgewiesen worden war, wurden die Konstrukte *pExp53* und *pExp54* erstellt. Diese sollten die Veränderungen in dem zugrundeliegenden Konstrukt *pExp50* noch weiterführen. Die Deletion, die in *pExp50* vorhanden war, wurde übernommen und zusätzlich zu den bisherigen Substitutionen wurden die vorhandenen Adenine zu Cytosin und umgekehrt mutiert. Natürlich wurden auch hier die bekannten für die Funktionalität wichtigen Bereiche ausgespart. Die VP2-Expressionsrate der beiden Konstrukte war im Bezug auf die Wildtyp-TURBS mit 23 % bei *pExp53* bzw. 18 % bei *pExp54* (dieses entspricht *pExp53* bis auf den Austausch von vier Basen Positionen: 16-17 und 89-90, vgl. Ergebnissteil Abschnitt 5.2) noch einmal um etwa 10 % geringer als bei dem Konstrukt *pExp50*. Dass allerdings trotz der einschneidenden Veränderungen immer noch eine VP2-Expression nachgewiesen werden konnte, ist bemerkenswert. Es konnte im Strukturaufklärungssystem beobachtet werden, dass bei diesen Varianten die Signale für die wichtigen Interaktionen im Vergleich zu dem Konstrukt *pStr38* deutlich schwächer waren. Dieses muss zum Vergleich herangezogen werden, weil für *pExp50* keine Strukturaufklärung betrieben worden war. Die offensichtliche Schwächung der in der Arbeit identifizierten Sekundärstrukturen kann die Reduzierung der Reinitiationsrate bedingen, ist aber aus den Sequenzänderungen nicht erklärbar. Ein denkbarer Grund für die beobachtete Schwächung der Interaktionen könnte sein, dass die bereits erwähnten Tertiärstrukturen durch die weitergehende Sequenzveränderung noch stärker gestört wurden. Auch die Beeinträchtigung von Faltungsmitteln (Woodson 2010) kann nicht ausgeschlossen werden. Diese würden dazu führen, dass eine geringere Anzahl an RNA-Molekülen eine funktionelle Faltung aufwies. Die

Akkumulation von fehlgefalteter RNA könnte sowohl die schwächeren Signale für die dsRNA Bereiche als auch den verstärkten Funktionsverlust der TURBS erklären.

2 Analyse der TURBS-Sekundärstruktur mittels Primer Extension

Die Analyse von 5' markierter RNA mittels partieller Nukleasespaltung hat eine Vielzahl wichtiger Erkenntnisse gebracht. Diese Methode kann aber nicht in Verbindung mit Chemikalien angewandt werden, welche die RNA Sekundärstrukturspezifisch modifizieren aber nicht spalten. Deshalb wurden „Primer Extension“-Versuche durchgeführt. Mit dieser Methode kann zum einen eine Markierung von der 3' Seite der RNA erreicht werden (über am 3'Ende bindenden markierten Primer) und zum anderen die chemische Modifikation der RNA für die Strukturaufklärung verwendet werden.

Um eine möglichst gute cDNA-Synthese mit geringer Frequenz spontaner Kettenabbrüche und hoher Sensitivität zu erreichen, wurden verschiedene *Reverse Transkriptasen* getestet, sowie die Bedingungen für die *in-vitro* Transkription optimiert. Dessen ungeachtet konnten mit der TURBS-RNA jedoch keine qualitativ erreichte werden. Am besten funktionierte das unter Material und Methoden beschriebene Protokoll, welches eine modifizierte Variante aus einem Nature Protokoll ist (Wilkinson, Merino et al. 2006). Die Hauptproblematik bei dieser Methode war das starke Hintergrundsignal der TURBS-RNA, das nicht hinreichend reduziert werden konnte. Dies ist jedoch offensichtlich ein immanentes Problem dieser speziellen RNA, weil bei einer parallel getesteten Kontroll-RNA (Eine codierende Sequenz aus einem Pestivirus) nur ein deutlich schwächeres Hintergrundsignal zu beobachten war. Eine Erklärung für dieses Phänomen konnte leider nicht gefunden werden. Weder die Temperatur bei der Transkription, noch verschiedene Primer-Annealing- bzw. Denaturierungsschritte brachten eine Verbesserung. Mit dem Zusatz von Betain konnte immerhin ein Fortschritt erzielt werden, so dass die partielle Auswertung der Analysen ermöglicht würde. Die Methode blieb jedoch immer mit dem Makel des hohen Hintergrundes behaftet, welcher die Auswertung beeinträchtigte, weil schwache Signale nicht sichtbar bzw. nur schwierig vom Hintergrund zu unterscheiden waren. Bei der „Primer-Extension“- Analyse der TURBS-RNA besteht somit noch weiterer Optimierungsbedarf. Die Sequenz könnte beispielsweise um eine optimierte Primerbindungsstelle erweitert werden (Wilkinson, Merino et al. 2006). Damit wäre eine Auswertung näher am 3' Ende möglich, mit dem zusätzlichen Vorteil einer stabileren Oligonukleotidbindung. Ob mit diesem Schritt das Problem des Hintergrundes vollständig gelöst werden kann, ist allerdings fraglich. Hinzu kommt, dass sich die angefügte Sequenz auf die Faltung der TURBS auswirken könnte, wodurch Artefakte die Auswertung beeinträchtigen würden. Die Methode konnte in der limitierten Zeit in der vorliegenden Doktorarbeit nicht weiter optimiert werden. Ebenso fehlte die Zeit, dieses System auch für die synthetischen RNAs *pStr38*, *pStr53* und *pStr54* zu testen.

Die durchgeführten Optimierungsschritte der „Primer Extension“ Methode erlaubten aber zumindest, dass die Basisstruktur der TURBS bestätigt und mit Hilfe der RNA-Spaltung durch Chemikalien zusätzliche Informationen über die TURBS-Struktur erhalten werden konnten. So wurde das Ergebnis aus der Strukturanalyse mit 5' markierter RNA, dass *Motiv 1* ungepaart vorliegt bestätigt. Mit der Modifikation der RNA mit DMS konnte auch erstmals gezeigt werden, dass das Adenin (Base 55) des *Motiv 1* nicht in Basenpaarungen involviert ist. Gleiches gilt für das darauffolgende Cytosin (Base 56). Generell ergänzten die Ergebnisse der chemischen Modifikationen die Strukturanalysedaten der TURBS vor allem in Regionen, in denen die Enzyme aufgrund sterischer

Hinderung nicht schneiden konnten, beispielsweise nahe von dsRNA Bereichen. Vor allem für die Adenine in der TURBS konnten mit DMS-Behandlung und nachfolgender „Primer-Extension“-Analyse große Datenlücken geschlossen werden. Auch im Falle von unklaren Datenlagen zum Beispiel im Falle der unter Abschnitt 1.1 diskutierten Basen zwischen den Positionen 64 bis 72 konnte mit Hilfe der chemischen Modifikation zusätzliche Hinweise darauf gefunden werden, dass diese Basen ungepaart vorlagen. Somit konnte die „Primer-Extension“-Methode trotz der technischen Probleme als Ergänzung der Analyse 5' markierter RNA dienen. Wie schon im Ergebnisteil (Abschnitt 3.1) beschrieben war die Auswertung der 3' gelegenen Bereiche der TURBS wegen des Hintergrundes nicht möglich. Somit konnten für den Bereich der Start-Stopp-Region keine sicheren Daten mit der „Primer-Extension“-Methode generiert werden.

3 Strukturmodelle

Die Sekundärstruktur der RHDV-TURBS besteht nach den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen interessanterweise zu großen Teilen aus einzelsträngiger RNA. Zudem werden viele Basenpaare, die von der Basensequenz ausgehend theoretisch möglich erscheinen, nicht ausgebildet. Dies ist eine interessante Feststellung, denn aus thermodynamischer Sicht sollte ein vermehrtes Ausbilden von Basenpaaren vorteilhaft sein. Beim Vergleich der mit mfold berechneten Sekundärstruktur der TURBS konnte keine nennenswerte Übereinstimmung mit der experimentell ermittelten Struktur festgestellt werden (vgl. Abb. 51 mit Abb. 52). So findet man z.B. in den Berechnungen oftmals das *Motiv 1* als dsRNA vorliegend. Auch die Paarung von *Motiv 2/2** wird nicht vorhergesagt. Somit kann die thermodynamische Stabilität alleine die in den Experimenten gefundenen Strukturen nicht erklären. In Abb. 53 ist eine TURBS-Modellstruktur gezeigt. An dieser sind die Spalt- bzw. Modifizierungsstellen aufgeführt, welche im Verlauf dieser Arbeit mit beiden Strukturaufklärungssystemen gefunden wurden. Für manche Basen waren keine Daten bzw. keine eindeutigen Ergebnisse zu erhalten. Dies kann in Teilbereichen auch zu geringfügigen Abweichungen von der vorgeschlagenen Struktur führen. Beispielsweise lieferte das Guanin 45 (im Modell Teil von *Motiv 2**) mit *RNase T1* im gefalteten Zustand noch ein schwaches Signal. Eine Deutung war hier nicht ohne weiteres möglich. In den Konstrukten mit synthetischer Sequenz wurde die Paarung von Guanin 45 verhindert. Daraufhin ergab sich keine Änderung der Struktur für den Bereich *Motiv 2/2**.

Auch die Interaktion des Start/Stop-Bereiches mit Sequenzen nahe des *Motivs 1* (Basen 58-61) könnte um eine Base länger bzw. um eine Position verschoben sein. Die genaue Einordnung war nicht möglich, weil für die beiden an den Kernbereich angrenzenden Basen Guanin bzw. Cytosin keine eindeutigen Signale zu erhalten waren, obwohl sie prinzipiell in der Lage wären, eine Basenpaarung auszubilden. Das vorliegende Modell mit lediglich vier Basenpaaren basiert auf der Tatsache, dass die *RNase V1*-Spaltung nur Signale für vier Basenpaare lieferte. Aus den erhaltenen Daten scheint somit die gezeigte Lage der Interaktion wahrscheinlicher, als die Variante mit der Interaktion von 119-122. Dies kann man deutlich am Cytosin an Position 58 sehen, welches auch ein starkes *RNase V1*-Signal lieferte, also gepaart vorliegen muss.

Spaltstellen/Modifikationen

- ▶ : RNase T1(nur denaturiert)
- ⇨ : Einzelstrangspezifische Spaltung
- ★ : Doppelstrangspezifische Spaltung

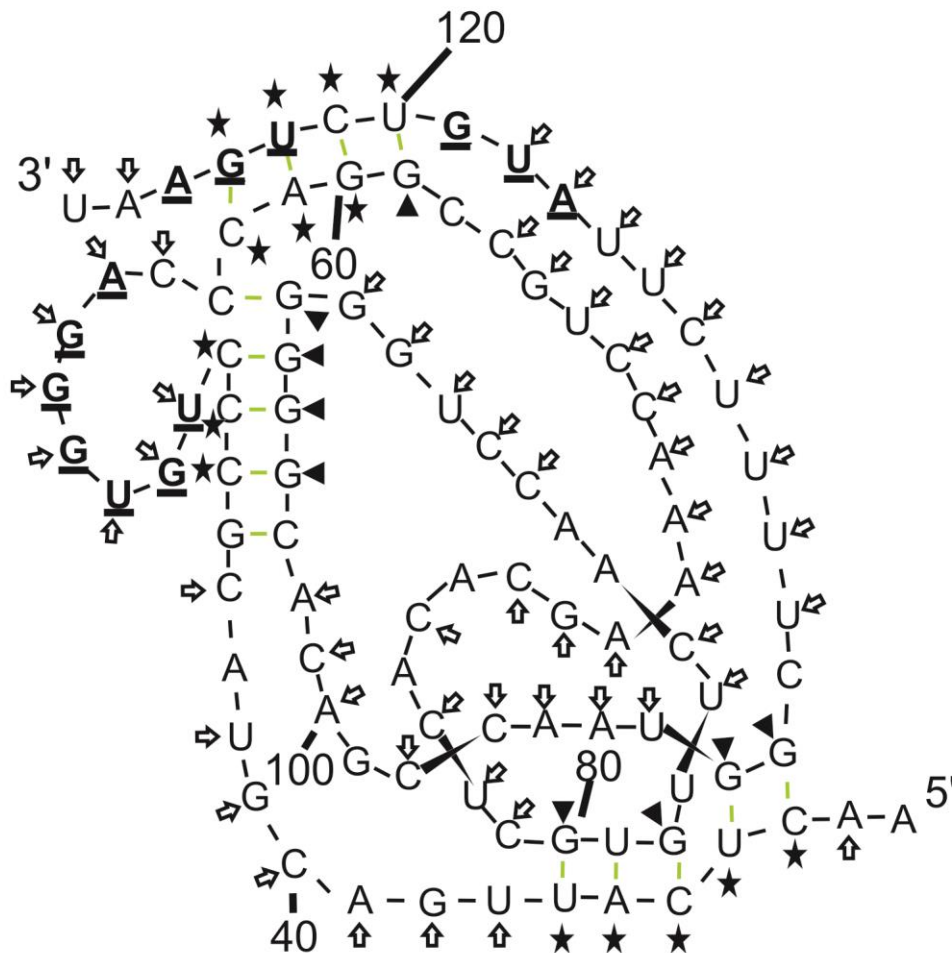


Abb. 53 TURBS-Modell mit Spalt-/Modifikationsstellen aus den kombinierten Strukturanalyseexperimenten. *Motiv 1* und *VP2-Start-* bzw. *VP1-Stoppocodon* sind fett geschrieben und durch Unterstreichen hervorgehoben. Die eingeführten Markierungen unterscheiden nur ssRNA/dsRNA spezifische Signale. Die ssRNA-Signale setzen sich aus den Spaltungen mit *RNase A*, *T1*, *S1-Nuklease* und den Daten für *DMS-* und *CMCT-Modifikation* der gefalteten RNA zusammen. Die Signale für dsRNA setzen sich aus Spaltung mit *RNase V1* und den im gefalteten Zustand fehlenden Spaltungen von Guanin mit *RNase T1* zusammen.

In Abb. 52 und 53 ist das experimentell bisher am besten belegte Modell gezeigt. Wie bereits diskutiert gibt es jedoch Alternativen zu den beschriebenen Interaktionen (Abb. 54) die im Folgenden diskutiert werden. Die beiden fraglichen Interaktionen sind Guanin/Cytosin Paare, welche direkt angrenzend an dsRNA Bereichen liegen würden. Aus thermodynamischer Sicht wären die Interaktionen wahrscheinlich. Der naheliegenste Grund für die Nichtausbildung dieser Paarungen könnte ein Konflikt mit der Tertiärstruktur sein, deren Bildung die Entstehung dieser Interaktionen ausschließen und zusätzlich energetisch günstiger sein müsste. Dies erscheint unwahrscheinlich, so

dass die Ausbildung dieser Interaktionen plausibel ist, auch wenn sie nicht in den Ergebnissen der Strukturanalysen gefunden wurden.

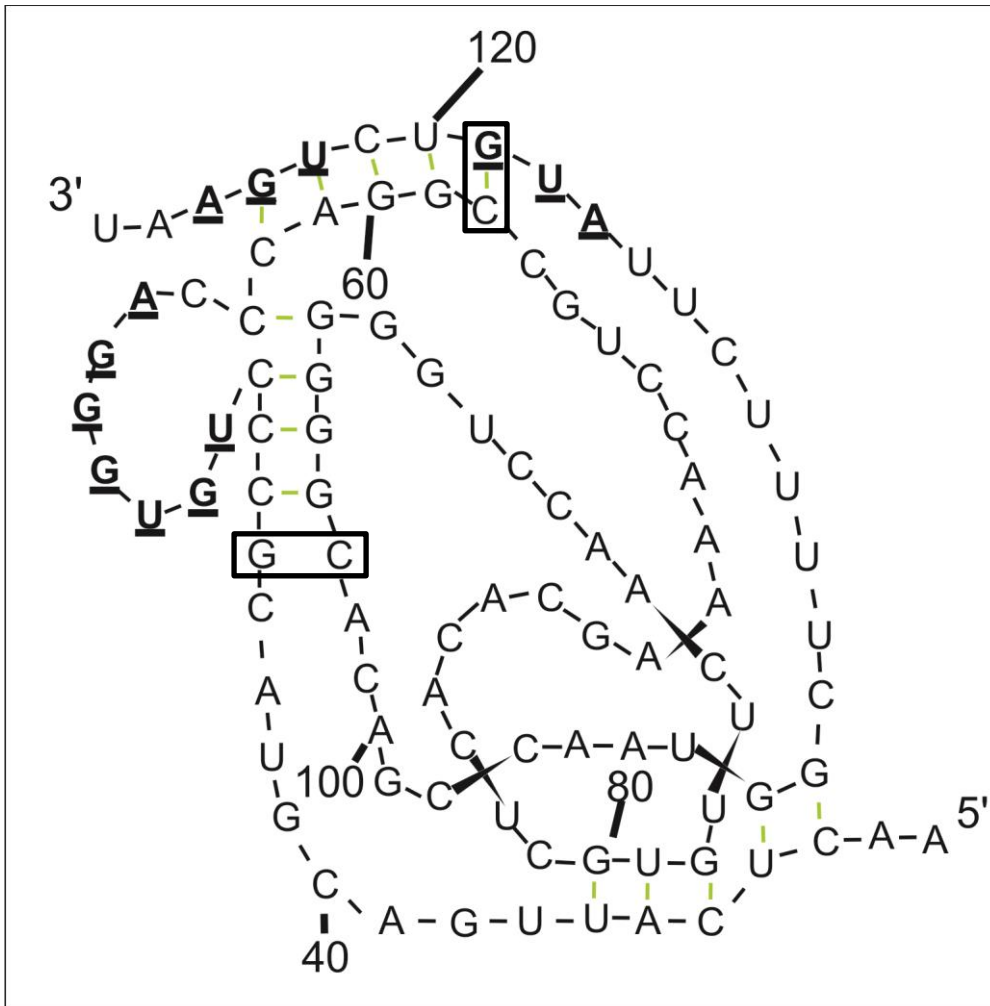


Abb. 54 TURBS-Modell mit alternativen dsRNA Bereichen. Die Positionen 45 und 97 bilden in diesem Modell keine Paarung aus und die Interaktion im Bereich der Start/Stoppsignale ist um ein Basenpaar verlängert. Die Änderungen gegenüber den vorher gezeigten Modellen sind umrahmt. *Motiv 1*, das VP1-Stoppcodon und das VP2-Startcodon sind fett und unterstrichen dargestellt.

Ausgehend von den vor dieser Arbeit erhaltenen Daten (Meyers 2003, Meyers 2007, Kreher 2009) und den Ergebnissen der Strukturanalyseexperimente aus der vorliegenden Arbeit wurde ein Strukturmodell für die RHDV-TURBS erstellt. Dieses Modell enthält auch die Interaktion der Basen 34-36 mit 80-82. Denn auch wenn diese Interaktion nach den Ergebnissen mit *pExp18* nicht kritisch für die TURBS-Funktion zu sein scheint, konnten doch im Strukturaufklärungssystem deutliche Hinweise auf das Vorhandensein der Interaktion erhalten werden. Als gesichert und wichtig für die Funktionalität der TURBS kann die Interaktion der Basen 32-33 mit 107-108 gelten, denn der Austausch in *pExp16* hatte eine deutliche Reduktion der VP2-Expression zur Folge und die Komplementierung im Konstrukt *pExp24* war ebenfalls erfolgreich. Die Interaktion der Basen 58-62 mit den Basen 119-123 wurde mit den Konstrukten *pExp7* bzw. *pExp46* analysiert, die sowohl auf Ebene der Expression als auch auf Strukturebene auf eine Interaktion der beiden Bereiche hinweisen. Der einzelne Basenaustausch auf jeweils einer Seite der postulierten Interaktion führte zur vergleichbaren Reduktion der VP2-Mengen. Die VP2-Expression entsprach etwa 50 % der Wildtyp-Expression und auch die Beeinträchtigung der jeweils anderen Seite der Interaktion durch die

Mutationen konnte im Strukturanalysesystem erfolgreich gezeigt werden. Der abschließende Beweis durch die Komplementierung gelang jedoch nicht.

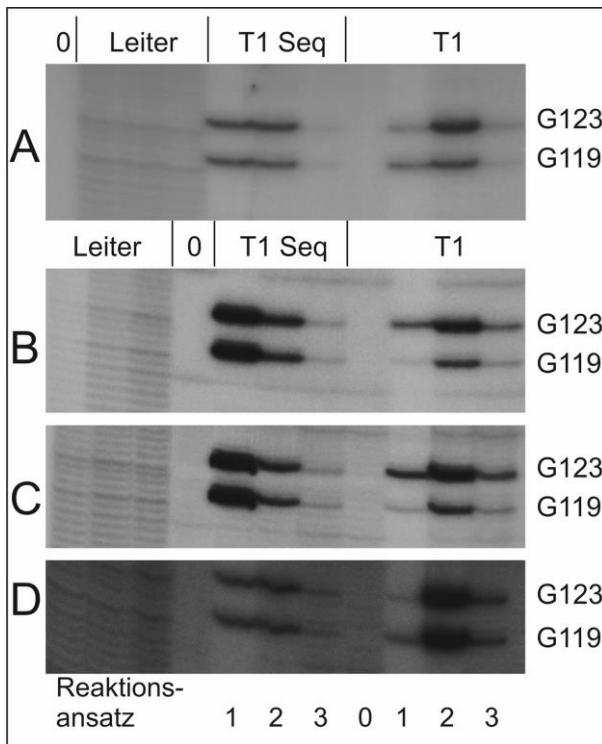


Abb. 55 zeigt die Ausschnitte aus vier Gelbildern mit den Guaninen 119 und 123 und soll das unterschiedliche Spaltverhalten von *RNase T1* an dieser Position beim Vergleich von entfalteter RNA gegenüber gefalteter RNA verdeutlichen. (A) zeigt den betreffenden Ausschnitt aus dem im Ergebnisteil gezeigten Gelbild von *pStr*. (B) und (C) zeigen zwei Strukturanalyseergebnisse mit *pStr* und D ein Ergebnis mit *pStr7*. Beim Konstrukt *pStr7* ist das Cytosin vor dem *VP1-Stoppcodon* zu einem Adenin mutiert. Dies interferiert mit der Ausbildung eines dsRNA Bereichs. Deutlich zu sehen ist bei (B) und (C) die schlechtere Spaltbarkeit der Guanine 119 und 123 in der gefalteten, im Vergleich zur entfalteten RNA. Bei *pStr7* dreht sich der Effekt um und die Guanine werden in der gefalteten RNA stärker gespalten als im entfaltenen Zustand, weil dort die Paarung dieser Region durch eine Substitution behindert wird.

Die Verlängerung des dsRNA-Bereichs um eine Base in Abb. 54, im Vergleich zum Arbeitsmodell (Abb. 52) geschah aufgrund der thermodynamischen Prinzipien, nach denen gepaarte Basen ein niedrigeres Energieniveau haben als einzelsträngige, womit die nicht-Bildung des terminalen G-C-Paars unwahrscheinlich erscheint. Es gab zudem keine Ergebnisse, die die Bildung dieses Paares ausschließen würden. Das von der Wildtyp-TURBS gezeigte Gelbild (vgl. Abb. 8 Ergebnisteil 2.2) zeigt keine signifikante Abschwächung der Guanin-Spaltung in der strukturierten gegenüber der entfalteten RNA, was einer Basenpaarung der fraglichen Guanine widersprechen würde. Dies war aber im Vergleich mit anderen derartigen Experimenten eine Ausnahme. Um dies zu verdeutlichen sind in Abb. 55 zwei weiteren Strukturanalyseergebnisse der Wildtyp-TURBS gezeigt. Zu beachten ist dabei, dass es sich um die gleiche RNA handelt wie die, die für das im Ergebnisteil in Abb. 8 gezeigte Gel verwendet wurde. Dieses Gel zeigt also leider in dieser Position eine Abweichung vom allgemein beobachteten Spaltmuster, wurde aber aufgrund seiner sonstigen Qualität für die zentrale Abbildung ausgewählt. Zum besseren Vergleich ist auch hier nochmal die Datenlage für die Mutante *pStr7* angeführt, bei der ein Einzelaustausch an Position 121 die Interaktion verhindern sollte. Dies führte in der Analyse der gefalteten RNA (Spur T1) zu deutlich stärkeren Signalen für die Guanine, als sie in *pStr* zu beobachten waren. Die stärkere Spaltung in der gefalteten RNA bei *pStr7* wird vor allem beim Vergleich mit den Signalen der Sequenzierreaktion deutlich und kann dadurch erklärt werden, dass in diesem Zustand gepaart vorliegende Guanine nicht mehr spaltbar waren und somit die nicht gepaarten Guanine vermehrt gespalten wurden. Analog zum vorher beschriebenen Fall sollte aus thermodynamischen Gründen auch das G-C-Paar der Basen 45 und 97 in *Motiv 2/2** gebildet werden.

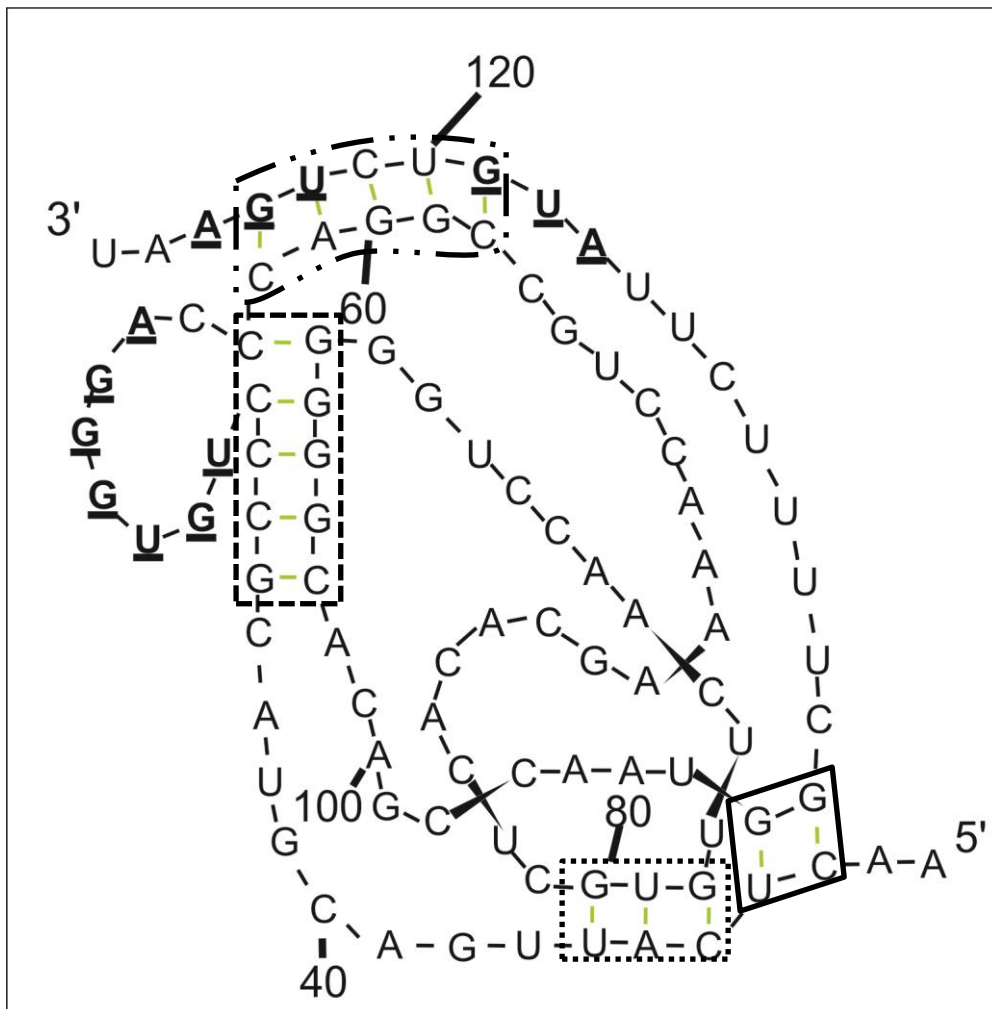


Abb. 56 finales Modell der Sekundärstruktur der RHDV-TURBS. Die Basen, die *Motiv 1* und *VP1-Stopp-* bzw. *VP2-Startcodon* bilden, sind unterstrichen und fett dargestellt. Die interagierenden Basen sind in Kästchen gefasst. *Motiv 2/2** ist mit einem gestricheltes Kästchen umrahmt. Die neu gefundene Interaktionen der Basen 32-33 und 107-108 ist mit einem durchgehenden Kasten kenntlich gemacht. Der Kasten, der aus Strichen und Punkten besteht, zeigt die Interaktion der Basen 58-62 mit den Basen 119-123. Die Interaktion der Basen 34-36 mit den Basen 80-82 ist in dem gepunkteten Kasten eingefasst.

Die Abbildungen 56 und 57 zeigen das finale Strukturmodell der RHDV-TURBS in unterschiedlichen Darstellungen. Abb. 56 hebt die gepaarten Sequenzen übersichtlich hervor, während in Abb. 57 die Kontinuität der RNA-Sequenz klarer zum Ausdruck kommt. Den Kern der Struktur bildet die Interaktion des *Motiv 2* (Basen 94-97) mit *Motiv 2** (Basen 45-48 und 57), in welche der einzelsträngige Bereich des *Motiv 1* eingebettet ist. Zusätzlich sind drei Pseudoknoten enthalten, welche durch die Interaktionen der Basen 32 -33 mit den Basen 107-108, der Basen 34-36 mit den Basen 80-82 und schließlich der Paarung der Basen 58-62 mit den in der Start/Stopp-Region liegenden Basen 119-123 gebildet werden. Abgesehen von den beschriebenen Paarungen liegt die gesamte TURBS einzelsträngig vor.

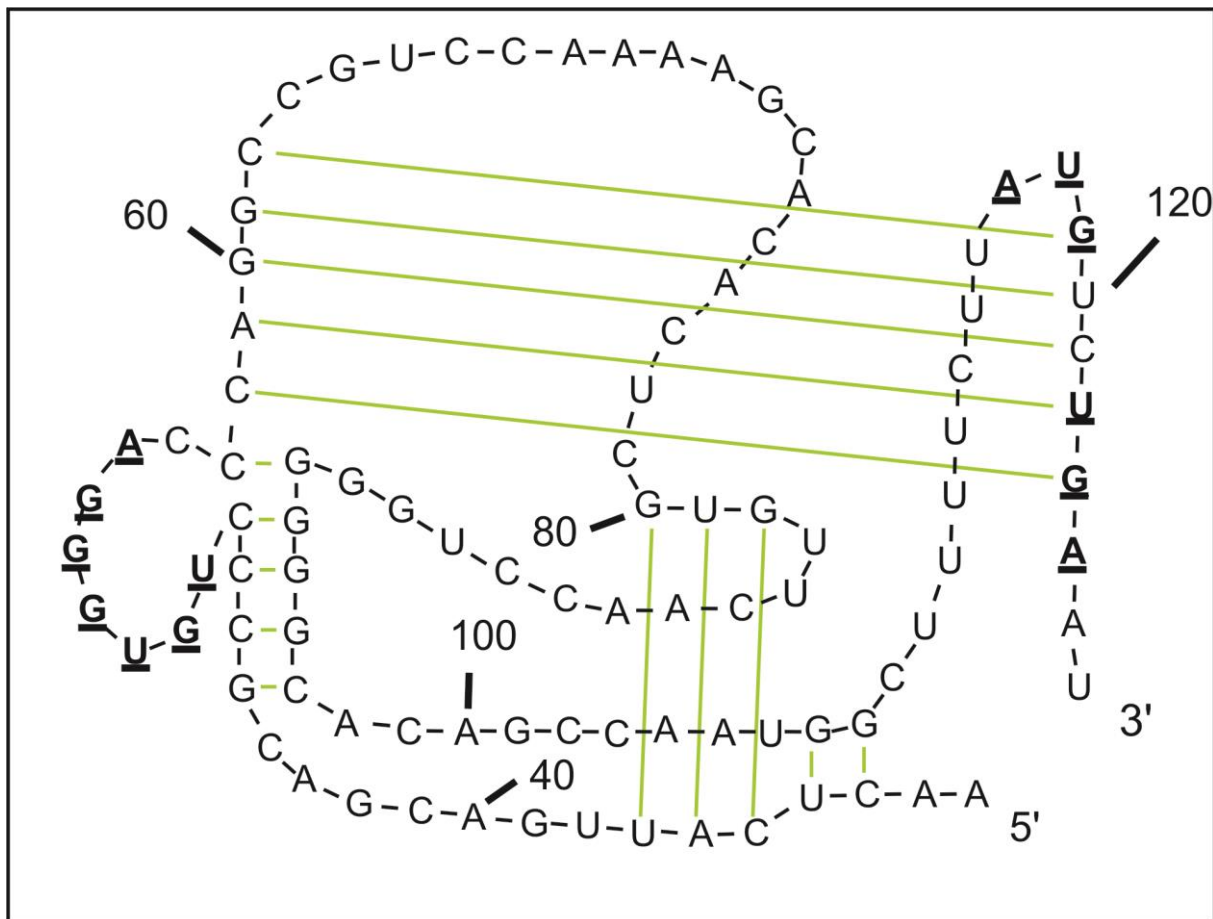


Abb. 57 alternative Darstellung der in Abb. 56 gezeigten finalen TURBS-Struktur. *Motiv 1*, VP2-Startcodon und VP1-Stoppocodon sind fett und unterstrichen dargestellt.

4 Struktur-Funktionsbeziehungen der RHDV-TURBS

Aus den in dieser Arbeit präsentierten Daten wird ersichtlich, dass die RHDV-TURBS erstaunlicherweise zum größten Teil aus ssRNA besteht. Nachdem dies festgestellt worden war, wurden die wenigen gefundenen dsRNA Bereiche besonders genau untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Substitutionen, welche die Bildung der dsRNA Bereiche zwischen den Basen 32-33 und den Basen 107-108 sowie zwischen den Basen 58-61 mit den Basen 120-123 störten, schwerwiegende Beeinträchtigungen der TURBS-Funktion mit sich brachten. Dagegen hatte eine Beeinträchtigung der Paarung der Basen 34-36 und 80-82 keinen nennenswerten Effekt. Die Auswirkungen der Substitutionen erreichten Funktionseinschränkungen, die bis an Deletionen von drei Nukleotiden im gleichen Bereich herankamen. Dies ist deutlich beim Vergleich der VP2-Expressions-level der TURBS-Varianten *pExp4* und *pExp5* (vgl. Ergebnisteil Abschnitt 4.1) mit *pExp15*, *pExp19* und *pExp20* (vgl. Ergebnisteil Abschnitt 4.5) zu erkennen.

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits die Auswirkungen von Deletionen von drei Basen an unterschiedlichen Positionen auf die Reinitiationsrate untersucht (Meyers 2007). Bei diesen Deletionen, die abseits der beschriebenen Motive und der dsRNA-Bereiche lagen, waren die Einflüsse der Veränderungen weniger schwerwiegend als die hier untersuchten Substitutionen in dsRNA Bereichen. Allerdings wurden vor allem in der Schlaufe aus größtenteils einzelsträngiger RNA im Bereich zwischen *Motiv 2** und *Motiv 2* Deletionen von drei Nukleotiden gefunden, die zu schweren

Beeinträchtigungen der TURBS-Funktion führten. Diese Beeinträchtigungen waren größer als bei Deletion von neun Basen, welche die zuvor untersuchten Deletionen der drei Basen enthielten. Es war also in diesen Fällen schädlicher für die TURBS-Funktion wenn nur drei anstatt neun Basen deletiert wurden (Kreher 2009).

Bei der Untersuchung der Sekundärstrukturen in dieser Arbeit konnten jedoch für diese Deletionsmutanten keine Änderungen gefunden werden, die diese Effekte erklären könnten (Daten nicht gezeigt). Diese Tatsache, zusammen mit dem ungünstigen Energiegehalt der Sekundärstruktur durch die Nichtausbildung von theoretisch möglichen Basenpaaren führt zu der Frage, welchen Einfluss übergeordnete Strukturen der TURBS haben. Die Ausbildung der Tertiärstruktur könnte die notwendige Energie bereitstellen, um die Faltung der TURBS in die vorliegende Sekundärstruktur zu erklären (Thirumalai 1998). Ebenso wäre sie als Erklärung für die zuvor beschriebenen Fälle von Funktionsverlusten ohne nachweisbare Änderung der Sekundärstruktur geeignet. Die Sequenz der deletierten RNA kann dafür nicht ursächlich sein, weil die Deletion der gleichen Basen mitsamt flankierender Bereiche deutlich besser toleriert wurde (Kreher 2009).

Die Änderung der Tertiärstruktur der TURBS könnte auch eine Erklärung dafür liefern, dass die Sekundärstruktur bei der Komplementationsmutante *pStr47/pExp47* trotz Komplementarität der Sequenzen an den richtigen Positionen nicht wieder ausgebildet wurde und somit auch die Funktion nicht wieder hergestellt werden konnte. Für eine vollständige Aufklärung der strukturellen Anforderungen, welche die TURBS-Region für ihre Funktion benötigt, ist eine Untersuchung der übergeordneten Tertiärstruktur unerlässlich. Diese kann jedoch nicht unabhängig von der hier untersuchten Sekundärstruktur betrachtet werden, weil sich beide Strukturebenen wechselseitig beeinflussen.

Bei der Betrachtung der in dieser Arbeit ermittelten TURBS-Sekundärstruktur fällt auf, dass relativ wenige Basen gepaart vorliegen. Die identifizierten Paarungen sind jedoch zum größten Teil funktionell wichtig, was aus den Ergebnissen der Substitutionsexperimente eindeutig abzuleiten war. Vergleicht man die Struktur der TURBS mit anderen funktionellen RNA-Strukturen wie z.B einer IRES, dann fallen zunächst einmal einige Parallelen auf. Beide Elemente sind exklusiv aus RNA aufgebaut und vermitteln die Möglichkeit einer alternativen Translationsinitiation, indem sie direkt oder über Initiationsfaktoren mit der kleinen Untereinheit der Ribosomen interagieren. Für die TURBS wurde bewiesen, dass diese Interaktion wesentlich über eine Hybridisierung zwischen *Motiv 1* und der 18S rRNA vermittelt wird (Luttermann and Meyers 2007, Meyers 2007). Auch für einen bestimmten Typ von IRES, wie er beim humanen Hepatitis C Virus vorkommt, wird eine Interaktion mit der 18S rRNA diskutiert. (Pestova, Shatsky et al. 1998, Luttermann and Meyers 2007, Meyers 2007). Auffälliger sind jedoch die Unterschiede zwischen diesen Elementen. So ist das Kriterium für eine IRES ihre Funktion als (eigenständiger) Translationsinitiator. Das heißt, dass ein IRES-Element die Translation eines ORFs durch Rekrutierung der erforderlichen Faktoren und der kleinen ribosomalen Untereinheit direkt aus der Lösung, ohne Beteiligung des 5' Endes der RNA initiieren kann (Jang, Krausslich et al. 1988). Dies ist bei der TURBS nicht der Fall. Sie kann kein Ribosom aus der Lösung binden, sondern nur durch Translation herangeführte Ribosomen recyceln (Meyers 2003). Ein weiterer Unterschied ist, dass IRES-Elemente deutlich stärker strukturiert sind (Honda, Beard et al. 1999, Fletcher and Jackson 2002, Schuler, Connell et al. 2006). Dadurch sind sie eher rigide und erfüllen ihre Funktion als eine Art Gerüst, welches über funktionale Bereiche, meist ssRNA, mit den für die Translationsinitiation notwendigen Faktoren interagiert. Die IRES wird dabei während der Translation nicht entfaltet. Zudem besitzt sie nur eine funktionelle Bedeutung und codiert nicht zusätzlich für Proteine [Review

(Pestova, Kolupaeva et al. 2001)]. Die TURBS hingegen codiert für den C-terminalen Bereich des Hauptstrukturproteins der Caliciviren VP1 und die ersten Aminosäuren des VP2. Die RNA Sequenz der TURBS muss somit sowohl die Bildung eines funktionsfähigen Strukturproteins gewährleisten, als auch die strukturellen Voraussetzungen für die TURBS-Funktion erfüllen. Daraus folgt, dass die TURBS bei jedem Translationsvorgang entfaltet werden und danach in relativ kurzer Zeit wieder die Faltung einnehmen muss, die für die Reinitiation der Translation zwingend notwendig ist. Eine zu starke Strukturierung dieser Region könnte dabei also hinderlich sein, weil sie bei jedem Translationsvorgang mit hohem Energieaufwand aufgelöst werden müsste, um sich kurz danach erneut auszubilden. Im Grenzfall würde eine zu stabile Struktur somit zu Fehlern bei der Translation (z.B. Rasterverschiebungen) oder gar zum Abbruch der Translation führen. Die TURBS stellt also ein dynamisches Element dar, das eine relativ wenig komplexe Funktion erfüllt, nämlich das Festhalten und Positionieren eines Ribosoms, das mittels Translation herangeführt wird. Die Funktion einer IRES ist dagegen ungleich komplexer weil sie die Komponenten mit hoher Effizienz *de-novo* rekrutieren muss. Möglicherweise ist diese Aufgabe nur mit einem großen, statischen und stabil strukturierten RNA-Element zu erfüllen. Dies würde auch erklären, warum viele Viren mit kleinem RNA-Genom und mit deutlich eingeschränkter Kodierkapazität bis zu ca. 8 % ihres Genoms für eine IRES verwenden.

4.1 Potentielle Aufgaben der gefundenen Interaktionen

Die in dieser Arbeit untersuchte Struktur der TURBS bezieht sich nur auf das RNA-Molekül, das in Lösung vorliegt. Sie repräsentiert somit nicht die Struktur, die während der Translationsinitiation oder kurz nach der Rückfaltung vorliegt. Denn die hier als interagierend identifizierten Basenpaare können sich zum Teil nicht ausbilden, während sich ein translatierendes Ribosom in der Start/Stopp-Region befindet, da diese Basen bedingt durch die Größe des Ribosoms getrennt sein müssten. Ein Beispiel dafür ist die nicht mehr mögliche Interaktion der Basen 58-62 mit der Start/Stopp-Region, weil der zuletzt genannte Interaktionspartner durch das Ribosom blockiert wird. Die anderen neu gefundenen Interaktionen könnten sich aber ausbilden, wobei vor allem die Interaktion der Basen 32-33 mit 107-108 eine Rolle zu spielen scheint, während die Interaktion der Basen 34-36 mit 80-82 bestenfalls eine untergeordnete Rolle spielt. *Motiv 2/2** sollten in der Phase der Termination-Reinitiation ebenfalls miteinander interagieren können, weil sie durch das Ribosom nicht blockiert werden. Die Bedeutung der Paarung von *Motiv 2/2** könnte darin bestehen, das translatierende Ribosom im Bereich des *Motiv 1* abzubremsen und damit die Interaktion mit der 18S rRNA erst zu ermöglichen, beziehungsweise das Zeitfenster für eine erfolgreiche Ausbildung einer solchen Interaktion zu vergrößern. Für dieses Abbremsen würde zusätzlich die neu gefundene Interaktion der Basen 58-62 mit den Basen 119-123 in Frage kommen. Der von dieser Interaktion gebildete Pseudoknoten schließt an die *Motiv 2/2**-Paarung an, so dass beide Elemente zusammenwirken könnten. Es wäre auch denkbar, dass die *Motiv 2/2**-Paarung das *Motiv 1* in einzelsträngiger und somit interaktionsbereiter Form hält, nachdem das Ribosom die Region bereits überquert hat. In diesem Fall wäre es vorstellbar, dass sich die Interaktion von *Motiv 1* mit der 18S rRNA erst später, also z.B. erst nach Termination der Translation, ausbildet. Die Ausbildung der *Motiv 2/2**-Paarung würde in diesem Fall das *Motiv 1* aus der Ebene der linearen RNA herausheben, wodurch sich eine Bewegung in die Ribosomenstruktur hinein und auf den Interaktionsbereich in der 18S rRNA Sequenz zu ergeben würde. Damit würde das *Motiv 1* für die Hybridisierung positioniert, was auch erklären würde, warum der Abstand *Motiv 2* von der Start/Stopp-Region absolut kritisch für die Reinitiation ist. Die Funktion der Basenpaarung zwischen den Basen 32-33 und 107-108 ist wahrscheinlich zu schwach, um Einfluss auf die Translationsgeschwindigkeit zu nehmen. Eine Funktion im Bereich der

Stabilisierung und Fixierung der TURBS scheint hier eher wahrscheinlich. So könnte im Zusammenspiel mit der Interaktion des *Motiv2/2**, nämlich zum einen die richtige Positionierung von *Motiv 1* mit gebundenem Ribosom und zum anderen die Positionierung des VP2 Startcodons, die Aufgabe dieser Interaktion sein.

4.2 Publierte TURBS-Strukturen anderer Viren

Es gibt bereits publizierte Strukturen für die TURBS-Regionen des Influenza B Virus (Michael L. Powell 2008, Powell, Leigh et al. 2011) und des Murinen Norovirus (Naphine, Lever et al. 2009). Die Strukturmodelle aus diesen Veröffentlichungen entsprechen allerdings nicht vollständig den erhaltenen und gezeigten experimentellen Daten in diesen Arbeiten. Vielmehr handelt es sich um am Computer simulierte Strukturen, an welchen die erhaltenen Ergebnisse der Strukturanalysen hervorgehoben wurden. Bei diesen Abbildungen sind dadurch große Diskrepanzen zwischen den gezeigten Strukturen und den experimentellen Daten festzustellen. Die experimentellen Daten geben bei diesen Arbeiten eher einen Hinweis auf weitgehend einzelsträngige RNA Bereiche, wie sie auch für die RHDV-TURBS in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurden. Damit deckt sich die Schlussfolgerung, die Powell und Mitarbeiter aus ihren Analysen zum Influenza B System gezogen haben, nämlich dass die TURBS größtenteils unstrukturiert vorliegt (Michael L. Powell 2008).

Durch näheren Vergleich der Primärdaten aus den erwähnten Veröffentlichungen kann man versuchen, Parallelen bzw. Unterschiede zur RHDV-TURBS zu finden. Die nun folgenden Annahmen beziehen sich dabei nur auf die (eigene) Auswertung der in den Veröffentlichungen gezeigten Bilder; sie sind also mit deutlichen Unsicherheiten behaftet. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass die Qualität der Abbildungen bei weitem nicht an die der Originale heranreichen dürfte und zum anderen die Auswertung durch relativ hohen Hintergrund erschwert wird. Hinzu kommt, dass für die Auswertung jeweils nur das Ergebnis eines Experimentes zur Verfügung stand.

4.2.1 Influenza B Virus

Bei der Betrachtung der Ergebnisse des in Abb. 5 gezeigten Strukturanalyseexperimentes in der Veröffentlichung von Powell und Mitarbeitern (Michael L. Powell 2008), , fallen einige mögliche Parallelen zu der Struktur der RHDV-TURBS auf. Das *Motiv 1*, welches in der untersuchten RNA an den Positionen 47-54 liegt und die Sequenz *UAUGGGAA* aufweist, können *RNase T1*-Signale beobachtet werden, so dass die drei Guanine des *Motivs* ungepaart vorliegen sollten. Ebenso sind mit *RNase U2* für die Adenine und Guanine Signale zu sehen. Auch dieser Befund deutet auf ssRNA hin. Es wurde von den Autoren kein Enzym mit der Spaltspezifität Uracil verwendet. Daher kann über diese keine Aussage getroffen werden. Für das Guanin 50 gibt es allerdings auch ein *RNase V1*-Signal, welches nicht zu den Signalen für *RNase T1* passt. Imidazol scheint über den gesamten Bereich zu spalten, dagegen spalten die Bleiionen nur einem Teilbereich des *Motiv 1*. Mindestens für einen Teilbereich von *Motiv 1*, die Basen 51-54, liegt die RNA höchstwahrscheinlich, ebenso wie beim RHDV, einzelsträngig vor. Des Weiteren ist im Bereich der Start/Stopp-Region (Basen 81-85, Sequenz *UAAUG*) eine Abschwächung des Signals für die Spaltung mit Bleiionen zu beobachten, was für dsRNA Bereiche typisch ist, weil Bleiionen vorwiegend ssRNA Bereiche spalten (W. J. Krzyzosiak 1988). Dies könnte ein Hinweis auf eine Interaktion zwischen der Start/Stopp-Region und der das *Motiv 1* flankierenden Region sein, die bei RHDV den Interaktionen der Basen 58-62 mit den Basen 119-123 entsprechen würde. Als Interaktionspartner stromabwärts des *Motivs 1* käme bei der Influenza RNA der Bereich um die Basen 57-58 in Frage. Diese liefern ein auch in der Veröffentlichung notiertes Signal für *RNase V1*, scheinen also gepaart zu sein. Im Falle der TURBS des Influenza B Virus kann

man auch stromaufwärts des *Motiv 1* ein einzelnes *RNase V1* Signal entdecken, welches ebenfalls in der Veröffentlichung angesprochen wurde. Dieses tritt zusammen mit einer Abschwächung der Bleiionen-Spaltung auf. Diese Ergebnisse könnten für eine gepaarte Region ähnlich dem *Motiv 2** des RHDV sprechen. Über die Partner der *Motiv2** ähnlichen Interaktion, entsprechend dem *Motiv 2* des RHDV, ist jedoch ohne weitere Untersuchungen keine Aussage möglich.

4.2.2 Murines Norovirus

Im Falle des MNV, das in der Veröffentlichung von Naphthine und Kollegen (Naphthine, Lever et al. 2009) behandelt wurde, zeigt die Abb. 3 das Ergebnis eines Strukturanalyseexperimentes. Das *Motiv 1* umfasst in der untersuchten MNV-RNA die Basen 57-64, die Sequenz ist *UGUGGGAA*. In dem Bereich sind für *RNase T1* und *RNase U2* Spaltprodukte zu sehen. Dies spricht dafür, dass auch bei dieser TURBS für ein einzelsträngiges *Motiv 1* vorliegt. Für die Start/Stopp-Region (Basen 94-98, Sequenz *UAAUG*) können bei diesem Virus für die Positionen 94-96 Signale für *RNase CL3* (Spaltet einzelsträngige RNA, bevorzugt Cytosin, aber auch Adenin und Uracil) und *RNase U2* gefunden werden. Diese Basen liegen also ungepaart vor. Stromabwärts direkt angrenzend ist jedoch eine Abschwächung der Spaltung durch Bleiionen und Imidazol zu beobachten. Dies weist auf dsRNA hin. Es könnten also auch hier Basen im Bereiche des Start/Stopp-Bereichs gepaart vorliegen. Als Bindungspartner kommen dabei die drei Uracile an den Positionen 66-68 in Frage, für diese Basen im flankierenden Bereich zu *Motiv 1* gibt es klare Signale für dsRNA mit *RNase V1*. Diese Signale wurden auch in der Veröffentlichung notiert. Die Paarung könnte beispielsweise mit den Basen 98-100 erfolgen. Aus dem veröffentlichten Material geht nicht hervor ob die Interaktion vielleicht auch einen größeren Bereich umfasst. Eine dem *Motiv 2** des RHDV entsprechende gepaarte Region stromaufwärts des *Motivs 1* zu finden ist bei der Datenlage sehr schwierig. Es gibt in diesem Bereich eine Abschwächung der Spaltung mit Bleiionen und Imidazol somit auch einen Hinweis auf dsRNA, aber auch eine in der Veröffentlichung notierte Spaltung von vier Basen mit *RNase T1*. Die Spaltung durch *RNase T1* weist auf ssRNA hin, aber dort sind auch Signale für Positionen zu sehen, an denen die Base Cytosin vorliegt. *RNase T1* spaltet exklusiv Guanine, die Daten für *RNase T1* sind also nicht schlüssig. Mangels weiterer Daten kann das Vorhandensein einer *Motiv 2**-ähnlichen Struktur weder bestätigt noch ausgeschlossen werden, vom auffinden eines möglichen Interaktionspartners ganz zu schweigen.

4.2.3 Felines Calicivirus

Für FCV liegen noch keine Strukturdaten vor. Dadurch können hier keine Rückschlüsse auf eine eventuell vorhandene Interaktion von Bereichen nahe *Motiv 1* mit der Start/Stopp-Region gezogen werden. Die *Motiv 2/2** Paarung existiert jedoch und wurde bei diesem Virus zuvor bereits mittels Mutationsanalysen nachgewiesen (Luttermann and Meyers 2009).

5. Bedeutung der TURBS im RHDV Lebenszyklus

Über die Funktion von VP2 für den RHDV Lebenszyklus ist noch nichts bekannt. Es gibt Veröffentlichungen, in denen gezeigt wurde, dass VP2 bei RHDV nicht notwendig ist, um in Zellkultur infektiöse Viruspartikel zu bilden (Guangqing Liu 2008). Dies steht im Gegensatz zu Veröffentlichungen zum Felinen Calicivirus, bei dem VP2 essentiell für die Bildung infektiöser Partikel ist (Sosnovtsev, Belliot et al. 2005). Es gibt des weiteren Hinweise darauf, dass VP2 an der Regulation der RHDV-Replikation und VP1-Expression beteiligt ist (Chen, Liu et al. 2009). Dies erklärt jedoch nicht den nachgewiesenen Einbau von VP2 in die Viruscapside (Wirblich, Thiel et al. 1996). Diese

möglichen regulatorischen Aufgaben könnten allerdings den Grund für die Expression in Abhängigkeit von der VP1-Translation darstellen, welche durch die Verwendung des Reinitiationsmechanismus vermittelt wird. Zumindest bei Experimenten mit FCV in Zellkultur wurde beschrieben, dass die VP2-Expression nicht in einem bestimmten Verhältnis zu VP1 stehen muss, sondern über einen relativ großen Konzentrationsbereich variierende VP2-Mengen die Bildung von infektiösen Viren erlauben. Allerdings haben diese Arbeiten auch gezeigt, dass Abweichungen oberhalb bzw. unterhalb bestimmter Maximal- und Minimallevel an VP2 die Virusproduktion beeinträchtigen oder verhindern (Haß, Luttermann et al. 2014). Aus diesen teilweise konträren Ergebnissen für die verschiedenen Caliciviren folgt ein weiterer Forschungsbedarf, um die biologische Bedeutung des VP2 und den für dessen Expression verwendeten Mechanismus zu ergründen.

6. Die Termination-Reinitiation als potentieller Expressionsmechanismus in eukaryotischen Zellen

Die Termination-Reinitiation wird bei Caliciviren und auch beim Influenza B Virus für die Expression von bestimmten Strukturproteinen verwendet. Dabei ist herauszustellen, dass diese Viren untereinander nicht verwandt sind, jedoch trotzdem einen solchen Mechanismus zur Proteinexpression nutzen. Bisher ist diese Art der Proteinexpression vor allem für virale Systeme beschrieben. Eine neue Veröffentlichung legt jedoch nahe, dass auch in eukaryotischen Zellen eine Reinitiation nach der Translation eines langen stromaufwärts gelegenen ORF (uORF) möglich ist (Gould, Dyer et al. 2014). Dabei unterscheidet sich der Mechanismus allerdings von dem der TURBS, so konnte keine Sequenz gefunden werden, welche mit der 18S rRNA interagiert. Bisher war nur die Reinitiation nach kurzen uORFs bekannt (Kozak 1987).

Als Kandidaten für eine Expressionkontrolle der Zelle über einen Termination-Reinitiation Mechanismus könnte man sich beispielsweise regulatorische Proteine vorstellen, deren Konzentration in der Zelle in Abhängigkeit der Menge eines anderen Proteins reguliert werden muss. Die Nutzung der Termination-Reinitiation durch verschiedene Virusfamilien spricht jedenfalls für einen weiter verbreiteten grundlegenden Mechanismus der Proteinexpression, dessen Untersuchung wichtige Einblicke die die Funktion von Zellen liefern kann.

Durch die Identifizierung der grundlegend notwendigen Elemente für die Funktion einer RNA als TURBS kann die vorliegende Arbeit die Basis für die Suche nach Kandidaten für Proteinexpression über Termination-Reinitiation im zellulären sowie anderen viralen Systemen liefern. Somit könnte sich die Möglichkeit bieten, tieferen Einblick in grundlegende Expressions-/Regulationsmechanismen in Zellen zu erlangen. Diese könnten in Zukunft helfen, sowohl virale als auch genetisch bedingte Erkrankungen besser zu verstehen und möglicherweise neue Therapieansätze liefern.

Literaturverzeichnis

Boniotti, B., et al. (1994). "Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus." J Virol **68**(10): 6487-6495.

Bouloy, M., et al. (1978). "Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 4886-4890.

Capucci, L., et al. (1996). "Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic." J.Virol. **70**(12): 8614-8623.

Chaudhry, Y., et al. (2006). "Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components." J.Biol.Chem. **281**: 25315-25325.

Chen, L., et al. (2009). "Minor structural protein VP2 in rabbit hemorrhagic disease virus downregulates the expression of the viral capsid protein VP60." Journal of General Virology **90**: 2952-2955.

Cruse, W. B. T., et al. (1994). "Structure of a Mispai red Rna Double Helix at 1.6-Å Resolution and Implications for the Prediction of Rna Secondary Structure." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(10): 4160-4164.

Daughenbaugh, K. F., et al. (2003). "The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment." EMBO J. **22**(11): 2852-2859.

Deigan, K. E., et al. (2009). "Accurate SHAPE-directed RNA structure determination." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(1): 97-102.

Draper, H. B. L. a. D. E. (1986). "On the Recognition of Helical RNA by Cobra Venom VI Nuclease." J Biol Chem **261**(April 25): 5396-5403.

Ehresmann, C., et al. (1987). "Probing the Structure of RNAs in Solution." Nucleic Acids Research **15**(22): 9109-9128.

Ehresmann, D. W. and F. L. Schaffer (1977). "RNA synthesized in calicivirus-infected cells is atypical of picornaviruses." J.Virol. **22**(2): 572-576.

Fletcher, S. P. and R. J. Jackson (2002). "Pestivirus internal ribosome entry site (IRES) structure and function: elements in the 5' untranslated region important for IRES function." J Virol **76**(10): 5024-5033.

Goodfellow, I., et al. (2005). "Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPG and eIF 4 E." EMBO Rep. **6**(10): 968-972.

Gould, P. S., et al. (2014). "Cellular mRNAs access second ORFs using a novel amino acid sequence-dependent coupled translation termination-reinitiation mechanism." Rna-a Publication of the Rna Society **20**(3): 373-381.

Guangqing Liu, Z. N., Tao Yun, Bin Yu, Liu Chen, Wei Zhao, Jionggang Hua and Jianping Chen (2008). "A DNA-launched reverse genetics system for rabbit hemorrhagic disease virus reveals that the VP2 protein is not essential for virus infectivity." Journal of General Virology **89**: 3080-3085.

Haß, M., et al. (2014). "Feline calicivirus can tolerate gross changes of its minor capsid protein expression levels induced by changing translation reinitiation frequency or use of a separate VP2-coding mRNA." Plos One **9**(7).

Herbert, T. P., et al. (1997). "Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation." J.Gen.Virol. **78 (Pt 5)**: 1033-1040.

Honda, M., et al. (1999). "A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation." JOURNAL OF VIROLOGY **73**(2): 1165-1174.

Jaeger, J. A., et al. (1993). "Determination of Rna Structure and Thermodynamics." Annual Review of Biochemistry **62**: 255-287.

Jang, S. K., et al. (1988). "A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation." J Virol **62**(8): 2636-2643.

Keene, J. D. (2007). "RNA regulons: coordination of post-transcriptional events." Nat Rev Genet **8**(7): 533-543.

König, M., et al. (1998). "Detection of viral proteins after infection of cultured hepatocytes with rabbit hemorrhagic disease virus." J Virol **72**(5): 4492-4497.

Kozak, M. (1987). "Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes." Mol Cell Biol **7**(10): 3438-3445.

Kreher, F. (2009). RNA structure/function analysis of a calicivirus RNA element promoting reinitiation of translation after termination. Interfaculty Institute of Biochemistry University of Tübingen, Germany.

Lee, T. I. and R. A. Young (2000). "Transcription of eukaryotic protein-coding genes." Annual Review of Genetics **34**: 77-137.

Liu, G. Q., et al. (2006). "Recovery of infectious rabbit hemorrhagic disease virus from rabbits after direct inoculation with in vitro-transcribed RNA." Journal of Virology **80**(13): 6597-6602.

Luttermann, C. and G. Meyers (2007). "A bipartite sequence motif induces translation reinitiation in feline calicivirus RNA." J Biol Chem **282**(10): 7056-7065.

Luttermann, C. and G. Meyers (2009). "The importance of inter- and intramolecular base pairing for translation reinitiation on a eukaryotic bicistronic mRNA." Genes Dev **23**(3): 331-344.

M. Zuker, D. H. M. a. D. H. T. (1999). "Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide." RNA Biochemistry and Biotechnology NATO ASI Series Vol 90: 11-43.

McFadden, N., et al. (2011). "Norovirus Regulation of the Innate Immune Response and Apoptosis Occurs via the Product of the Alternative Open Reading Frame 4." Plos Pathogens **7**(12).

Meyers, G. (2003). "Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism." J.Biol.Chem. **278**(36): 34051-34060.

Meyers, G. (2007). "Characterization of the sequence element directing translation reinitiation in RNA of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus." J.Virol. **81**(18): 9623-9632.

Meyers, G., et al. (1991). "Genomic and Subgenomic Rnas of Rabbit Hemorrhagic-Disease Virus Are Both Protein-Linked and Packaged into Particles." Virology **184**(2): 677-686.

Meyers, G., et al. (1991). "Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles." Virology **184**(2): 677-686.

Meyers, G., et al. (2000). "Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs." Virology **276**(2): 349-363.

Michael L. Powell, S. N., Richard J. Jackson, Ian Brierley and T. David K. Brown (2008). "Characterization of the termination–reinitiation strategy employed in the expression of influenza B virus BM2 protein." RNA **14**: 2394-2406.

Morales, M., et al. (2004). "Synthesis in vitro of rabbit hemorrhagic disease virus subgenomic RNA by internal initiation on (-)sense genomic RNA: mapping of a subgenomic promoter." J Biol Chem **279**(17): 17013-17018.

Napthine, S., et al. (2009). "Expression of the VP2 Protein of Murine Norovirus by a Translation Termination-Reinitiation Strategy." Plos One **4**(12).

Ohlinger, V. F., et al. (1990). "Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease." J.Virol. **64**(7): 3331-3336.

Pelletier, J. and N. Sonenberg (1988). "Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA." Nature **334**(6180): 320-325.

Pestova, T. V., et al. (2001). "Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98**(13): 7029-7036.

Pestova, T. V., et al. (1998). "A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs." Genes Dev. **12**(1): 67-83.

Peterson, J. E. and M. J. Studdert (1970). "Feline picornavirus. Structure of the virus and electron microscopic observations on infected cell cultures." Arch Gesamte Virusforsch **32**(2): 249-260.

Powell, M. L., et al. (2011). "Further Characterisation of the Translational Termination-Reinitiation Signal of the Influenza B Virus Segment 7 RNA." Plos One **6**(2).

Prasad, B. V., et al. (1994). "Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids." J.Virol **68**(8): 5117-5125.

Schaffer, F. L., et al. (1980). "A protein, VPg, covalently linked to 36S calicivirus RNA." J.Gen.Virol. **47**(1): 215-220.

Schuler, M., et al. (2006). "Structure of the ribosome-bound cricket paralysis virus IRES RNA." Nat Struct Mol Biol **13**(12): 1092-1096.

Sonenberg, N. and A. G. Hinnebusch (2009). "Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets." Cell **136**(4): 731-745.

Sosnovtsev, S. V., et al. (2005). "Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions." J.Virol. **79**(7): 4012-4024.

Strive, T., et al. (2010). "The non-pathogenic Australian lagovirus RCV-A1 causes a prolonged infection and elicits partial cross-protection to rabbit haemorrhagic disease virus." Virology **398**(1): 125-134.

Studdert, M. J. (1978). "Caliciviruses. Brief review." Arch Virol **58**(3): 157-191.

Thirumalai, D. (1998). "Native secondary structure formation in RNA may be a slave to tertiary folding." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(20): 11506-11508.

Thumfart, J. O. and G. Meyers (2002). "Rabbit Hemorrhagic Disease Virus: Identification of a Cleavage Site in the Viral Polyprotein That Is Not Processed by the Known Calicivirus Protease." Virology **304**(2): 352-363.

Vazquez, A. L., et al. (1998). "Expression of enzymatically active rabbit hemorrhagic disease virus RNA-dependent RNA polymerase in Escherichia coli." J.Virol **72**(4): 2999-3004.

W. J. Krzyzosiak, T. M., M. Wiewiorowski, P. Romby, J. P. Ebe and R. Giegé (1988). "Characterization of the Lead(II)-Induced Cleavages in tRNAs in Solution and Effect of the Y-Base Removal in Yeast tRNA^{phe}." Biochemistry **27**: 5771-5777.

Walsh, D. and I. Mohr (2011). "Viral subversion of the host protein synthesis machinery." Nature Reviews Microbiology **9**(12): 860-875.

Wilkinson, K. A., et al. (2006). "Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution." Nature Protocols **1**(3): 1610-1616.

Wirblich, C., et al. (1996). "Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies." J.Virol. **70**(11): 7974-7983.

Woodson, S. A. (2010). "Compact intermediates in RNA folding." Annu Rev Biophys **39**: 61-77.

Yost, S. A. and J. Marcotrigiano (2013). "Viral precursor polyproteins: keys of regulation from replication to maturation." Current Opinion in Virology **3**(2): 137-142.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gregor Meyers am Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesinstitut für Tiergesundheit, in Tübingen und auf der Insel Riems angefertigt.

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während der Zeit in der diese Arbeit entstanden ist unterstützt haben.

Mein herzlicher Dank gilt:

Prof. Dr. Gregor Meyers für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe meine Dissertation anzufertigen und für die Überlassung dieses äußerst interessanten Themas. Ich möchte mich außerdem für die ständige Diskussionsbereitschaft und die gute und kompetente Betreuung bedanken. Auch für die Freiheit meine eigenen Ideen umzusetzen möchte ich mich herzlich bedanken.

Prof. Dr. Stefan Stevanovic möchte ich für seine Bereitschaft danken das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen und für seine Bereitschaft diese Arbeit gegenüber der Fakultät zu vertreten.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei der gesamten Arbeitsgruppe Meyers bedanken, für die gute Zeit am FLI, die kollegiale Atmosphäre und die stete Diskussionsbereitschaft.

Außerdem möchte ich noch bei all den Anderen am FLI danken die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Im Einzelnen möchte ich mich bedanken bei:

Gaby ohne die ich nur die Hälfte der Dinge gefunden hätte, die ich gesucht habe. Außerdem für die exzellente technische Unterstützung.

Daniel für die lustige Zeit als Labornachbar, die ständige Diskussionsbereitschaft und vielen nützlichen Anregungen. Außerdem für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Kay der als Labornachbar ebenfalls zu der guten Stimmung im Labor beigesteuert und mit seiner Diskussionsbereitschaft zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Tine für ihre Diskussionsbereitschaft und nützlichen Anregungen.

Natürlich möchte ich mich auch bei Freunden und Familie für die großartige Unterstützung bedanken, die ich erfahren durfte. Die Aufmunterungen, wenn es mal nicht so gut lief. Ich bin froh euch an meiner Seite zu wissen.