

**Identifizierung und Charakterisierung von  
Interaktionspartnern des humanen RNA-  
Bindungsproteins La**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von Gritta Tettweiler

Hamburg, 2004

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. WILLL  
Weitere Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. G. ADAM

Tag der Disputation: 16. Juli 2004

Hamburg, den 23. Juni 2004



Professor Dr. Arno Frühwald  
Dekan

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Das La-Protein.....	3
1.2 Funktionen des La-Proteins.....	6
1.2.1 RNA-Prozessierung und RNP-Formation.....	8
1.2.2 Translationskontrolle.....	9
1.3 Subzelluläre Lokalisierung des La Proteins.....	10
1.4 Interaktion von La mit anderen Proteinen.....	12
1.5 La und das Hepatitis B Virus.....	12
1.5.1 Das Hepatitis B Virus.....	12
1.5.2 Interaktion von La und HBV-RNA.....	16
1.6 Aufgabenstellung.....	19
2 Material.....	21
2.1 Chemikalien.....	21
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.3 Gebrauchsfertige Lösungen und Reagenziensätze (Kits).....	22
2.4 Enzyme.....	22
2.5 Größenstandards.....	23
2.6 Antikörper.....	23
2.7 Plasmide.....	24
2.8 Bakterienstämme und Zelllinien.....	25
2.9 Bakterien- und Zellkultur-Medien.....	25
2.10 Oligonukleotide.....	26
2.10.1 Oligonukleotide zur Umklonierung von DNA-Sequenzen in eukaryotische Vektoren.....	26
2.10.2 Oligonukleotide zur Amplifikation von prägenomischer RNA.....	27
2.10.3 Oligonukleotide für die Generierung von <i>templates</i> zur <i>in vitro</i> Transkription.....	27
2.10.4 Oligonukleotide zur Sequenzierung.....	27
2.11 Geräte.....	28
2.12 Herstellernachweis.....	29
3 Methoden.....	30
3.1 Mikrobiologische Methoden.....	30
3.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	30

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl von Bakterienflüssigkulturen.....	30
3.1.3 Vorbereitung von <i>E. coli</i> -Zellen für die Calciumtransformation .....	30
3.1.4 Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien (Transformation).....	31
3.1.5 Expression von rekombinanten Proteinen in Prokaryoten .....	31
3.2 Zellbiologische Methoden.....	32
3.2.1 Auftauen von Zellen, Ansetzen und Umsetzen einer Zellkultur .....	32
3.2.2 Einfrieren von Zellen.....	33
3.2.3 Bestimmung der Zellzahl von adhärent wachsenden Zellen.....	33
3.2.4 Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische adhärente Zellen (Transfektion) .....	34
3.2.5 Fixierung von eukaryotischen adhären Zellen für Immunfluoreszenz-Analysen .....	35
3.2.5.1 Fixierung mittels Methanol/ Aceton.....	36
3.2.5.2 Fixierung mittels Methanol/ Aceton nach Prä-Extraktion.....	36
3.2.5.3 Fixierung mittels Paraformaldehyd .....	36
3.2.6 Immunfluoreszenz .....	37
3.3 Proteinbiochemische Methoden.....	38
3.3.1 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus Prokaryoten .....	38
3.3.1.2 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus Prokaryoten unter nativen Bedingungen mittels Ni-NTA-Technologie.....	39
3.3.1.3 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus Prokaryoten unter denaturierenden Bedingungen mittels Ni-NTA-Technologie.....	39
3.3.2 Aufreinigung von Rekombinanten aus Eukaryoten .....	41
3.3.2.1 Aufreinigung von Rekombinanten aus Eukaryoten unter nativen Bedingungen mittels Ni-NTA-Technologie .....	42
3.3.3 Auftrennung eines Proteingemisches in der SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	42
3.4 Detektion von Proteinen.....	44
3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	44
3.4.2 Färbung von SDS-PA Gelen .....	44
3.4.2.1 Coomassie-Brilliant-Blue Färbung.....	44
3.4.2.2 Silberfärbung .....	45
3.4.3 Färbung von Proteinen auf Membranen .....	46
3.4.3.1 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot).....	46
3.4.3.2 Färben mit Amidoschwarz .....	47
3.4.4 Immunodetektion.....	47

3.4.4.1 Western-Blot.....	47
3.4.4.2 Abbott-ELISA ( <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> ) .....	49
3.5 Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion.....	49
3.5.1 Koelution mit His <sub>6</sub> - markiertem rekombinanten hLa in Zellen.....	49
3.5.2 Identifizierung von Proteinen – Massenspektroskopie.....	50
3.5.3 Koimmunpräzipitation.....	51
3.5.4 Säugetierzellen-2-Hybrid-System .....	53
3.5.4.1 CAT ELISA.....	55
3.6 Gentechnische Methoden .....	56
3.6.1 Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA .....	56
3.6.1.1 Isolierung von DNA .....	56
3.6.1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	56
3.6.1.3 Agarosegelelektrophorese und anschließende Ethidiumbromid-Färbung zur Detektion von DNA .....	56
3.6.1.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	57
3.6.2 Klonierung .....	58
3.6.2.1 Umklonierung einer cDNA in ein Plasmid .....	58
3.6.2.2 Überprüfen der Klonierung mittels "Cracking".....	60
3.6.2.3 Überprüfen der Klonierung mittels PCR.....	61
3.6.3.4 DNA-Sequenzierung .....	61
3.7 Versuche mit RNA.....	62
3.7.1 Vektoren für <i>in vitro</i> Transkriptionen und die Synthese der Matrizen DNA.....	62
3.7.2 Synthese von RNA-Sonden durch <i>in vitro</i> Transkription .....	64
3.7.3 Berechnung der Konzentration der <i>in vitro</i> transkribierten, radioaktiven RNA-Sonde. ....	64
3.7.4 EMSA – <i>electrophoretic mobility shift assay</i> .....	65
3.7.4.1 Auswertung von EMSAs mittels Phosphorimager.....	68
3.7.4.2 Auswertung von EMSAs mittels Autoradiogramm .....	68
3.7.5 Isolierung von Gesamt-RNA.....	69
3.7.6 Ein-Schritt RT-PCR.....	69
4 Ergebnisse .....	70
4.1 Verteilung des hLa-Proteins in zytoplasmatischen und nukleären Kompartimenten .....	70
4.2 Aufreinigung von His <sub>6</sub> -hLa aus Eukaryoten und Koelution interagierender Proteine .....	72
4.2.1 Aufreinigung von His <sub>6</sub> -hLa aus eukaryotischen Zellen .....	72

4.2.2	Identifizierung von koeluiierenden Proteinen im SDS-PA-Gel durch Bandenmustervergleich .....	74
4.2.3	Identifizierung von ko-eluiierenden Proteinen durch Massenspektroskopie .....	75
4.2.4	Identifizierung von ko-eluiierenden Proteinen durch Western- Blotanalyse .....	78
4.3	Nachweis der Interaktion von hLa und PSF durch Koimmunpräzipitation.....	81
4.4	Kolokalisierung von hLa und PSF .....	88
4.5	Nachweis der La/ PSF Interaktion durch Säugetierzellen-2-Hybrid-System .....	95
4.6	Interaktion von PSF und HBV-RNA.B.....	100
4.6.1	Aufreinigung von His <sub>6</sub> -PSF aus Prokaryoten.....	100
4.6.2	PSF bindet an HBV-RNA.B.....	102
4.6.3	Spezifität der Bindung von PSF an HBV-RNA.B.....	105
4.7	Bindung von PSF und hLa an HBV-RNA.B <i>in vitro</i> .....	107
4.8	<i>In vivo</i> Interaktion des PSF-Proteins mit HBV-RNA .....	109
4.8.1	Lokalisierung von GFP-PSF und GFP-La in HBV transfizierten Zellen.....	109
4.8.2	Einfluß der Überexpression von PSF auf die prägenomische RNA des HBV .....	111
4.8.3	Einfluß der Überexpression von PSF auf die Bildung von HBsAg .....	113
5	Diskussion.....	117
5.1	Identifizierung von PSF als potentiellen Interaktionspartner des hLa-Proteins.....	118
5.2	Bestätigungen der Interaktion von hLa und PSF .....	122
5.3	Oligomerisierungsstatus des hLa-Proteins.....	126
5.4	Interaktion von PSF mit HBV-RNA.B .....	127
5.5	Interaktion von PSF und hLa mit HBV-RNA.B .....	129
5.6	Einfluß einer Überexpression von GFP-PSF auf die HBV- Genexpression.....	131
5.7	Weiterführende Experimente .....	134
	Literatur.....	136
	Anhang.....	144

# Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>amino acid(s)</i> = Aminosäure(n)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriophosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> = Rinder-Serum-Albumin
cDNA	<i>copy DNA</i> = DNA-Kopien der mRNA, die keine Introns enthalten
cpm	<i>counts per minute</i> = gezählte Signale pro Minute
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP(s)	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat(e)
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraaceticacid</i> = Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIS	Histidin
HIV	humanes Immundefizienz Virus
hLa	humanes La-Protein
IPTG	isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
kB	kilo Basenpaare (1000 Basenpaare)
kD	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth Medium
M	Mol
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation- time of flight</i>
min	Minute(n)
MG	Molekulargewicht
mLa	Maus La-Protein
mRNA	<i>messenger</i> (Boten-) Ribonukleinsäure
NiNTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure

NLS	Nukleus Lokalisierungs Signal
NoLS	Nukleolus Lokalisierungs Signal
NRE	<i>nuclear retention elements</i>
nt	Nukleotide
NTP	Nukleosidtriphosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pI	isoelektrischer Punkt
p-La	phosphoryliertes La-Protein
PRE	posttranskriptionelles regulatorisches Element
PSF	PTB assoziierter Spleißfaktor
PTB	<i>polypyrimidine-tract-binding-protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
Rpm	<i>rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
RRM	<i>RNA recognition motif</i> = RNA Erkennungs-Motiv
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>S.pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TOP	5'-terminalen <u>O</u> ligopyrimidin Sequenz
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
tRNA	<i>transfer</i> Ribonukleinsäure
U	Unit(s)
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i> = Volumen pro Volumen
WAM	<i>Walker-A-Motif</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> = Gewicht pro Volumen
w/w	<i>weight per weight</i> = Gewicht pro Gewicht
<i>X.laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>

## Zusammenfassung

Es wird angenommen, daß das hLa-Protein an die Hepatitis-B-Virus RNA (HBV-RNA) bindet und sie stabilisiert. Weiterhin liegen Daten vor, die zeigen, daß das La-Protein nicht allein an die virale RNA bindet, sondern mit weiteren Faktoren ein Ribonukleoproteinkomplex (RNP) bildet. Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stand daher die Suche nach einem Interaktionspartners des hLa- Proteins. Die Identifizierung eines Interaktionspartners sollte zu einem tieferen Verständnis der Interaktion zwischen zellulären Proteinen und der viralen RNA führen, Ansatzpunkte zur Entwicklung antiviraler Strategien liefern und das Verständnis der Funktionen des La-Proteins erweitern. Eine Charakterisierung der Funktionen des Interaktionspartners sollte weiterhin Einblicke in den Einfluß zellulärer Faktoren auf den viralen Lebenszyklus gewähren.

In der vorliegenden Arbeit konnte der PTB assoziierter Spleißfaktor PSF erfolgreich als ein neuer Interaktionspartner des hLa-Proteins identifiziert werden. Durch Affinitätschromatographie, Koimmunpräzipitation und im Säugetierzellen-2-Hybrid System konnte bestätigt werden, daß diese Interaktion tatsächlich in lebenden Zellen stattfindet. Die Studien zur Kolo-kalisierung führten zu dem Befund, daß lediglich das phosphorylierte hLa mit dem PSF-Protein assoziiert ist.

Unter Verwendung verschiedener GFP-hLa-Fusionsproteine, die sich durch eingefügte Deletionen in ihrer Lokalisierung vom GFP-hLa der vollen Länge unterscheiden, konnten durch Koimmunpräzipitationsexperimente Hinweise dafür erbracht werden, daß die Interaktion der beiden Proteine im Nukleoplasma stattfindet. Diese Ergebnisse wurden im Säugetierzellen-2-Hybrid System unter Verwendung verschiedener mutierter Gal4-hLa-Fusionsproteine bestätigt.

Funktionelle Analysen bezüglich der Bindung an HBV-RNA zeigten, daß rekombinantes PSF spezifisch an eine Teilsequenz der viralen RNA bindet. Diese Region (HBV-RNA.B, nt 1243-1333) umfaßt die La-Bindungsstelle, endoribonukleolytische Spaltstellen und die  $\alpha$ -Domäne des posttranskriptionell regulatorischen Elementes (PRE), welche wichtig für die posttranskriptionelle Kontrolle der viralen Genexpression ist. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß das rekombinante hLa-Protein und rekombinantes PSF um die Bindung an die virale RNA.B konkurrieren. Diese Experimente zeigen, daß mit PSF ein neuer zellulärer Faktor identifiziert wurde, der, außer den Proteinen La und PTB, ebenfalls an das PRE der HBV-RNA bindet.

Erste Studien mit der Fragestellung, ob PSF auch in lebenden Zellen in den viralen Lebenszyklus eingreift, führten zu der interessanten Beobachtung, daß die Überexpression von PSF zu einer Verstärkung des Spleißens der viralen prägenomischen RNA führt. Hierbei spielt das PRE, an

dessen  $\alpha$ -Domäne das PSF-Protein vermutlich bindet, eine entscheidende Rolle beim Spleißen. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von PSF zu einer erhöhten HBsAg-Expression führt. Somit konnte ein neuer Wirtsfaktor, das PSF-Protein, identifiziert werden, der im Lebenszyklus des Hepatitis B Virus eine entscheidende Rolle spielt. Interessanterweise interagiert PSF mit dem hLa-Protein, welches ebenfalls von großer Bedeutung für den Lebenszyklus des HBV ist.

Zusammenfassend tragen die vorliegenden Daten wesentlich zum erweiterten Verständnis der Wirts-Virus-Interaktionen bei und bilden eine potentielle Basis für die Entwicklung einer neuen antivirale Strategie, die durch Modulation von zellulären RNA-Bindungsproteinen zur Degradation der hepadnaviralen RNA und damit der Viruseliminierung führen könnte.

In Abb. 1 ist das mögliche Zusammenspiel von hLa und PSF als Modell dargestellt: PSF und hLa interagieren miteinander im Nukleoplasma. Trifft eine HBV-RNA auf diesen Komplex, wird die Interaktion aufgelöst, da beide Proteine um die Bindung an die RNA konkurrieren. Die RNA kann nun einerseits durch das hLa-Protein stabilisiert werden oder andererseits durch PSF gespleißt werden. Beide Proteine beeinflussen so den viralen Lebenszyklus.

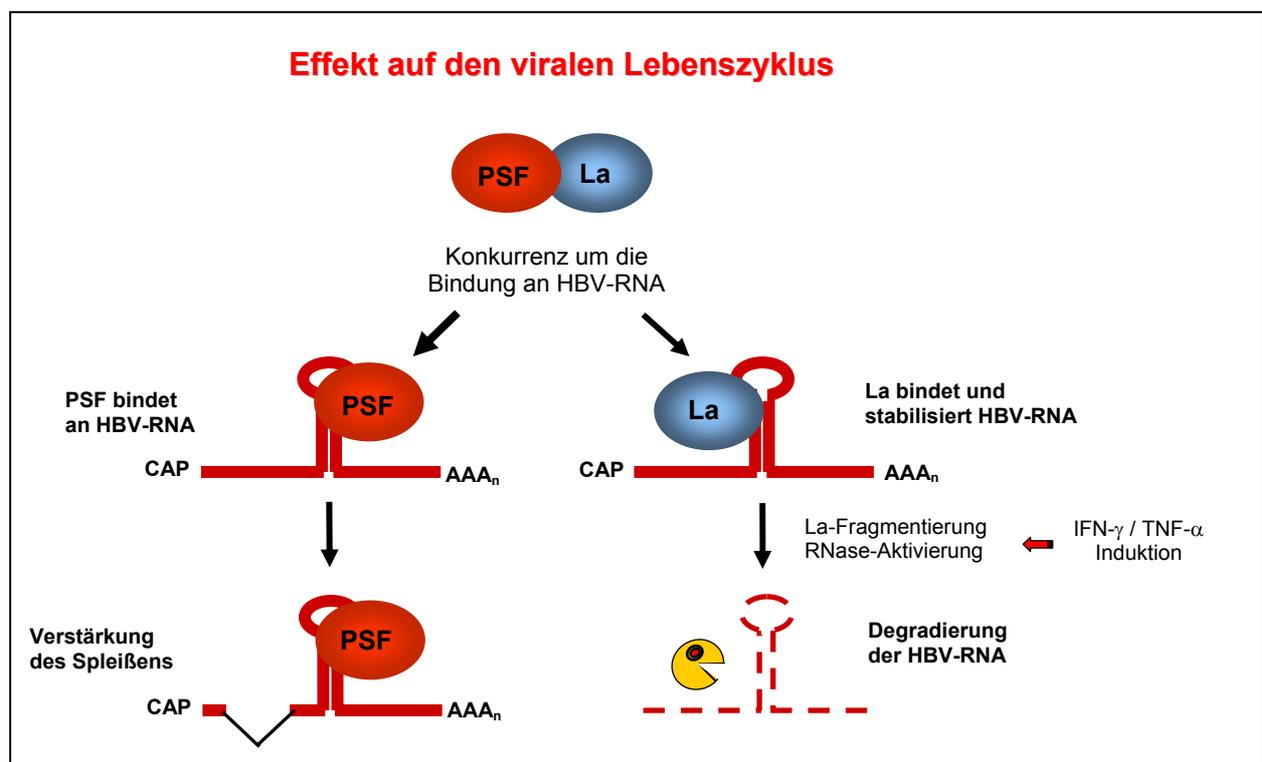


Abb. 1: Modell des Zusammenspiels der Proteine La und PSF im Kontext einer HBV Infektion

# 1 Einleitung

## 1.1 Das La-Protein

In der Erstbeschreibung des La-Proteins, das auch mit SS-B bezeichnet wird, wurde es als Autoantigen in Patienten identifiziert, die an rheumatischen Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses und dem Sjögren Syndrom leiden ((91), (9)). Die Bezeichnung "La" ist auf die Initialen des Patienten zurückzuführen, aus welchem die Antikörper gegen dieses Autoantigen isoliert wurden. Das nukleäre Phosphoprotein La ist das erste Protein, das mit neu-synthetisierten RNA-Polymerase III-Transkripten assoziiert ((46),(47)).

Das humane La-Protein ist in ungefähr  $2 \times 10^7$  Kopien pro Zelle vorhanden und damit in ähnlich großen Mengen, wie für ribosomale Proteine beschrieben (47).

Das 408 Aminosäuren (aa – *amino acid*) lange humane La-Protein ist ein RNA-bindendes Protein, welches sich durch die Präsenz von sogenannten RNA-Erkennungsmotiven (RRMs, engl.: *RNA recognition motif*) auszeichnet ((20), (73)). Die RRM sind ca. 100 Aminosäuren lange Proteinregionen, die zwei konservierte Sequenzmotive, sogenannte Ribonukleoprotein-Konsensus-Sequenzen (RNP1 und RNP2), enthalten, die essentiell für die RNA-Bindung sind. Die Struktur der RRM in anderen Proteinen wurde durch Röntgenstrukturanalysen von Kristallen aufgeklärt. Das RNP-1 und RNP-2 von La liegen als Oktamer bzw. Hexamer vor und sind durch einen etwa 30 Aminosäuren langen Abstandshalter (*Spacer*) getrennt. Das gesamte RRM nimmt eine  $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4$ -Struktur ein, wie es für andere RRM enthaltende Proteine gezeigt wurde ((96), (24)). Die RNP-Sequenzen liegen in den  $\beta 1$ - und  $\beta 3$ -Strukturen in einer Ebene nebeneinander, wobei extern orientierte aromatische Reste in diesen Sequenzen die RNA-Bindung vermitteln (45).

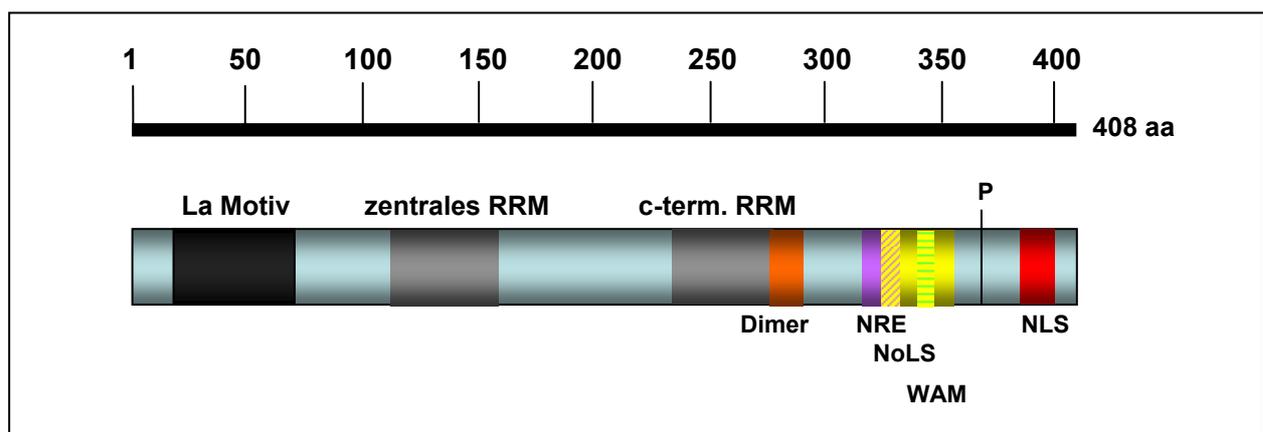
Der amino-terminale Teil des La-Proteins ist hoch konserviert und enthält ein ca. 60 aa langes Motiv, welches auch als La-Domäne oder RRM-1 (*RNA recognition motif-1*) bekannt ist (130). Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur führte zu der Erkenntnis, daß es sich hierbei nicht um ein RRM handelt, sondern um eine lange helikale Struktur, einem sogenannten *winged Helix-Turn-Helix* Motiv der Struktur  $\alpha 1-\beta 1-\alpha 3-\alpha 5-\beta 2-\beta 3$  (wHRH, (30), (6)). Strukturanalysen des mittleren RRM (zentrales RRM) und carboxy-terminalen RRM bestätigten, daß es sich um zwei RRM handelt, wobei das carboxy-terminale ein untypisches RRM ist, das nicht an der Erkennung der RNA beteiligt ist, sondern an 5'-Triphosphate und interne Sequenzen in RNA Molekülen bindet ((6), (70)). Aufgrund der Strukturanalysen geht man davon aus, daß das

konservierte La-Motiv zusammen mit dem zentralen RRM eine funktionelle RNA-Bindungsdomäne bildet ((6), (30)). Diese Domäne determiniert vermutlich die Spezifität des Proteins zu bestimmten Sequenzelementen der Vorläufer von RNA-Polymerase (Pol) III-Transkripten ((132), (87)). Das carboxy-terminale RRM vermittelt wahrscheinlich die Interaktion des nicht-phosphorylierten La-Proteins mit 5'-terminalen Oligopyrimidin (TOP) Sequenzen von mRNAs, die für ribosomale Proteine und Translationsfaktoren kodieren (69).

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß eine Deletion der RNP-2 Motive im zentralen RRM oder des carboxy-terminalen RRM die Bindung von prä-tRNA und HBV-RNA *in vitro* komplett verhindert bzw. stark beeinträchtigt (63).

Ob und wie die drei verschiedenen RNA-Bindungsstellen an der Bindung eines RNA-Moleküls beteiligt sind, und ob sie synergistisch oder autark funktionieren ist bisher nicht vollständig geklärt.

Neben den drei RNA-Bindungsstellen sind noch weitere Motive im La Protein beschrieben worden: eine Multimerisierungsdomäne ((25), (62)), mindestens ein Nukleus-Lokalisierungs-Signal (NLS, (119)), ein Nukleolus-Lokalisierungs-Signal (NoLS; (63)), und vermutlich zwei Sequenzmotive, welche das La Protein im Kern zurückhalten (engl.: *nuclear retention elements* (NREs); (119), (67)). Darüber hinaus scheint es ein Kernexportsignal zu geben (diskutiert in (67)), mehrere Phosphorylierungsstellen (hauptsächlich Serin-366, (35), (16)), sowie im carboxy-terminalen Bereich eine kurze, sehr basische Region (SBM, (44)) und ein potentielles Walker-A-Motiv (125), welches möglicherweise eine ATP-Bindungsstelle darstellt (Abb. 2; siehe auch Übersichtsartikel (86), (132)).



**Abb. 2: Struktur des humanen La-Proteins.** Die Länge in Aminosäuren (aa 408) ist oberhalb angegeben. RRM - RNA-Erkennungs-Motiv (grau); Dimer - Dimerisierungs-Domäne (orange); NRE – *nuclear retention signal* (lila); NoLS - Nukleolus-Lokalisierungs-Signal (gelb); WAM – Walker-A Motiv (grün); NLS - Nukleus-Lokalisierungs-Signal (rot). Referenzen finden sich in Tabelle 1

In Tabelle 1 sind die jeweiligen Domänen zusammen mit ihrer jeweiligen Lokalisierung im humanen La-Protein in einer Übersicht zusammengefaßt.

**Tabelle 1 : Übersicht über die bisher beschriebenen Domänen und Regionen des humanen La Proteins.**

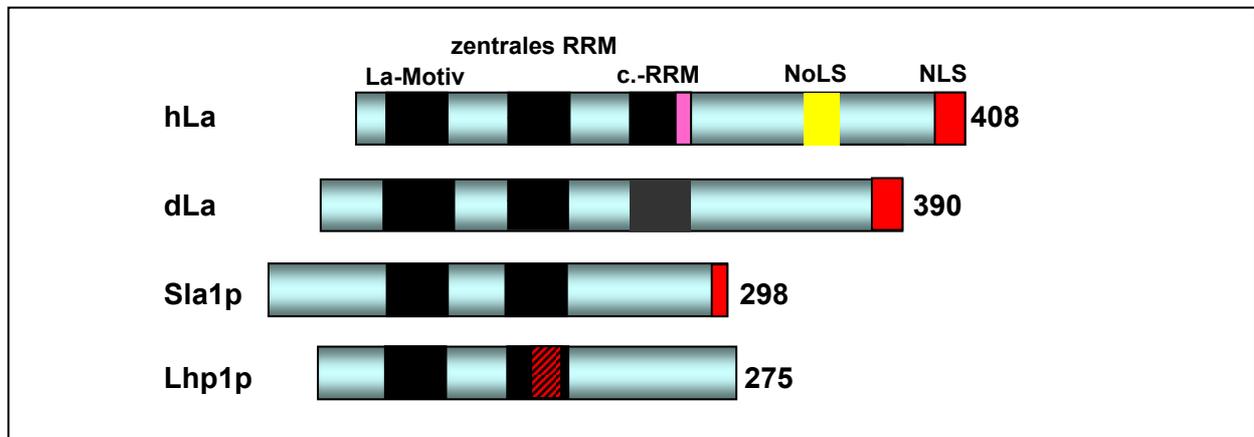
Bezeichnung der Domäne	Position (Aminosäuren)	Referenzen
La-Motiv, RNP-2	aa 20 – 25	(86), (87)
La-Motiv, RNP-1	aa 64 – 69	(86), (87)
zentrales RRM, RNP-2	aa 113 – 118	(86), (87)
zentrales RRM, RNP-1	aa 151 – 158	(86), (87)
c-terminales RRM, RNP-2	aa 235 – 240	(71), (70), (86), (87)
c-terminales RRM, RNP-1	aa 268 – 276	(71), (70), (86), (87)
NRE	aa 165 – 337, insbesondere 266 – 269	(119)
NRE	aa 316 – 332	(67), gegensätzlich zu (119)
Multimerisierung	aa 298 – 348	(25)
Multimerisierung	aa 274 – 291	(62)
NoLS	aa 323 – 354	(63)
WAM	aa 333 – 339	(125)
PBS (konservierte, basische Region)	aa 348 – 368	BLOCKS-Programm, (59)
NLS	aa 383 – 400	(119)

Dargestellt sind die verschiedenen Regionen des hLa, welche bislang funktionell und/oder durch strukturelle Vorhersagen beschrieben sind. Die entsprechenden Referenzen sind angegeben; für die RRM's wurden teilweise Übersichtsartikel genannt. RRM – RNA-Erkennungs-Motiv; RNP - Ribonukleoprotein-Partikel-Konsensussequenz; NRE - *nuclear retention element*; NoLS - Nukleolus-Lokalisierungs-Signal; WAM - Walker-A-Motiv (potentielles ATPase Motiv); PBS - Phosphat-Bindungsstelle; NLS - Nukleus-Lokalisierungs-Signal; ATP - Adenosintriphosphat; aa - Aminosäure.

Das La-Protein und homologe Proteine konnten in verschiedenen Säugetieren und weiteren Spezies nachgewiesen werden, wie z.B. in Ciliaten (4), in den Hefen *S.pombe* (Slap1) und *S.cerevisiae* (Lhp1p; (134)), in *Drosophila melanogaster* (dLa; (134)), *Trypanosoma brucei* (131), *Xenopus laevis* ((115), (113)). Außerdem wird vermutet, daß La auch in *Caenorhabditis elegans* exprimiert wird (diskutiert in (132)).

Dabei unterscheidet sich das Protein in seiner Länge und in der Anzahl an beschriebenen Proteindomänen je nach Spezies, wobei allen Proteinen die amino-terminale Domäne, die man als La-Motiv bezeichnet, gemein ist. Interessanterweise fehlen den homologen Proteinen in Hefen, aus denen viele der Ergebnisse zum La-Protein stammen, die carboxy-terminale Domäne, und somit möglicherweise Funktionen, die über diese vermittelt werden. Gegenüber dem humanen La-Protein ist es in anderen Spezies deutlich verkürzt (aa 298 bzw. aa 275 für *S. pombe*

bzw. *S. cerevisiae* gegenüber aa 408 für das humane La; (87); siehe Abb. 3). Es wird diskutiert, ob diese Verlängerung des hLa-Proteins mit zusätzlichen Funktionen des Proteins assoziiert ist ((109), (87)).



**Abb. 3: Schematische Darstellung des humanen La-Proteins (hLa) im Vergleich zu La-Proteinen aus anderen Spezies.** Das amino-terminale La-Motiv ist hoch konserviert, während die carboxy-terminale Hälfte hoch variabel ist. dLa – La-Protein von *D. melanogaster* (aa 390); Sla1p – La-Protein von *S. pombe* (aa 298); Lhp1p – La-Protein von *S. cerevisiae* (aa 275); Die jeweilige Länge der Proteine in aa (*amino acids* – Aminosäuren) ist rechts angegeben. (adaptiert aus (86))

## 1.2 Funktionen des La-Proteins

Das La-Protein gehört zur Familie der RNA-Erkennungsmotiv-haltigen Superfamilie RNA-bindender Proteine. Es ist bekannt, daß das La-Protein an verschiedene zelluläre und virale RNAs bindet und mit ihnen interagiert (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Funktionen des La-Proteins

		<b>Bindungsstelle</b>	<b>Funktion der Interaktion</b>	<b>Referenzen</b>
<b>zelluläre RNAs</b>	prä-tRNA	3'-UUU-OH	Stabilisierung; tRNA Reifung	(34), (68), (107), (135)
	prä-5S RNA	3'-UUU-OH	Stabilisierung; 5S-RNA Reifung	(107), (118)
	Telomerase RNA	3'-UUU-OH	Chaperon zur Telomerase RNP Bildung	(4), (36)
	Histon mRNA	3'-UUU-OH	Stabilisierung	(92)
	mdm2 mRNA	5'-UTR	Translationskontrolle	(126)
	snRNAs	3'-UUU-OH	Stabilisierung	(98), (14), (106), (133)
	snoRNAs	3'-UUU-OH	Stabilisierung	(76)
	RPS25 mRNA	?	Translationskontrolle	(2)
	BiP mRNA	IRES im 5'-UTR	Translationskontrolle	(75)
	<i>vault</i> RNA	3'-UUU-OH	Chaperon zur <i>vault</i> RNP-Formierung	(74)
	XIAP mRNA	IRES im 5'-UTR	Translationskontrolle	(60)
	sc Y RNA	3'-UUU-OH	Zurückhalten im Kern	(101)
	TOP mRNAs	TOP im 5'-UTR	Translationskontrolle	(137), (3)
<b>virale RNAs</b>	HIV Typ-I mRNA	TAR im 5'-UTR	Translationskontrolle	(21), (124)
	HBV-RNA	PRE	Stabilisierung	(56, 58, 62)
	HCV mRNA	IRES im 5'- NCR	Translationskontrolle	(7), (8), (122)
		3'-UTR	Stabilisierung	
	Poliovirus mRNA	IRES im 5'-UTR	Translationskontrolle	(93), (123), (54)
	Dengue Virus RNA	3'-UTR	Chaperon zur Replikation	(27)
Norwalk Virus RNA	3'-UTR	Replikation/ Translation?	(53)	

RNP – Ribonukleoprotein-Komplex; UTR – nicht-translatierte Region; TOP – terminales Oligopyrimidin; snRNA – *small nuclear RNA*, snoRNA – *small nucleolar RNA*; RPS – ribosomales Protein S; BiP – *immunoglobulin heavy chain binding protein*; IRES – *internal ribosome entry site*; XIAP – *X-linked inhibitor of apoptosis*; scRNA – *small cytoplasmic RNA*; HIV – *human immunodeficiency virus*; TAR – *trans-activation response element*; HBV – Hepatitis B Virus; PRE – posttranskriptionelles regulatorisches Element; HCV – Hepatitis C Virus; NCR – nicht-codierende Region

### 1.2.1 RNA-Prozessierung und RNP-Formation

Das La-Protein ist ein wichtiger Faktor von Ribonukleoproteinkomplexen (RNPs) und agiert dort hauptsächlich als RNA-Chaperon, um die korrekte Prozessierung von RNA-Polymerase (Pol) III-Transkripten, wie 5S rRNA, tRNA, U6 und RNase P snRNA, snoRNAs und sc Y RNA, durch die Assoziation mit deren 3'-UUU-OH Ende zur Reifung funktioneller Moleküle zu beeinflussen ((132), (85), (87)). Diese Interaktionen dienen vor allem dem Schutz der Transkripte vor unspezifischer Degradation durch Exonukleasen ((133), (76), (88), (135), (98), (34)).

Die Bindung des La-Proteins an Pol III-Transkripte hat verschiedene Auswirkungen für die RNA. In Experimenten mit Hefen, *X. Laevis*-Extrakten und humanen Zelllinien konnte z.B. gezeigt werden, daß das La-Protein an das 3'-Ende der prä-tRNA bindet, dabei zur Abspaltung des 3'-Endes und zur Reifung der tRNA beiträgt ((135), (82), (34)). Außerdem konnte in Hefezellen gezeigt werden, daß die Bindung des La-Proteins an die prä-tRNA zu dessen korrekter Faltung beiträgt, und so die prä-tRNA gegenüber Degradation aufgrund einer Mißfaltung stabilisiert ((135), (19)).

In Hefezellen wurde außerdem gezeigt, daß das La-Protein auch an Pol II-Transkripte bindet, wie den prä-U1- bis U5-snRNAs und prä-U3-snoRNA ((76), (133)). In diesen Publikationen wurde ebenfalls beschrieben, daß die 3'-Enden dieser Vorläufer-RNAs nach RNase III-Verdau polyuridiniert sind, was eine bevorzugte Bindungsstelle für das La-Protein darstellt. La greift hier nicht direkt in die Reifung der Vorläufer-RNAs ein. Es wird spekuliert, daß die Bindung des La-Proteins die Reifung verlangsamt und somit eine Art "Qualitätskontrolle" in der Prozessierung stattfindet (76). Durch die Stabilisierung des 3'-Endes der prä-U4-snRNA durch das La-Protein wird die Bindung von sogenannten Sm-Proteinen erleichtert (133). Die Bindung von Sm-Proteinen ist wichtig zur weiteren Prozessierung der prä-U4 snRNA. Es ist ebenfalls beschrieben, daß das La-Protein auch an das Pol III-Transkript prä-U6-snRNA bindet und diesen Vorläufer stabilisiert (98). Sogenannte Lsm ("*like Sm*") Proteine verdrängen das La-Protein und binden an prä-U6 snRNA, wodurch diese Vorläufer-RNA gegenüber RNase-Verdau stabilisiert wird, was für die Bildung eines U4/U6-snRNPs notwendig ist ((77), (1)). Sind diese Proteine mutiert, übernimmt das La-Protein die nachfolgenden Aufgaben der Sm- und Lsm-Proteine der Stabilisierung und wird so essentiell für die Formierung eines U4/U6-snRNPs ((133), (132)). Die snRNPs sind wichtige Bestandteile der Spleißosomen, deshalb wird zumindest eine indirekte Beteiligung des La-Proteins am Spleißen von prä-mRNAs immer wieder diskutiert ((105), (38)).

In *X. laevis* Oozyten konnte gezeigt werden, daß das La-Protein und danach auch der Lsm-Proteinkomplex an U6-snRNA bindet (42). In dieser Publikation konnte aber die Bindung des La-Proteins an U4-snRNA nicht bestätigt werden.

Die Bindung von La an die HBV-RNA und dessen Bedeutung wird unter **1.5** im Detail beschrieben.

Da La vor allem an Vorläufer-RNAs bindet, wird diskutiert, ob die Reifung dieser Transkripte nur stattfinden kann, wenn ein La-RNP ausgebildet worden ist (Übersichtsartikel (86), (85)).

### 1.2.2 Translationskontrolle

Das La-Protein spielt auch bei der Translation von zellulären und viralen RNAs eine Rolle. Hierbei kann La auf zwei Wegen in die Translationskontrolle eingreifen: 1) über die Bindung an ein sogenanntes internes Ribosomen-Eintrittselement (engl.: *internal ribosome entry site* – IRES) und 2) über einen IRES-unabhängigen Weg.

Bei der IRES-vermittelten Translationskontrolle wird durch die Hilfe des La-Proteins die Translationsmaschinerie zum internen Initiationscodon der mRNA rekrutiert, sodaß die Proteinsynthese stattfinden kann (89). So bindet das La-Protein z.B. an das IRES-Element der Poliovirus-RNA und stimuliert dadurch die Translation der Virus-RNA ((123), (93)). Die 5'-NTR in der Hepatitis-C-Virus (HCV)-RNA bildet ebenfalls ein IRES-Element. Es ist bekannt, daß La auch hier über diese Struktur mit der RNA interagiert und dadurch die Translation anregt ((8), (7)).

Da die La-mRNA selbst ein IRES Element enthält, wird spekuliert, ob die Synthese des La-Proteins unter bestimmten Bedingungen wie Virusinfektion, Entzündung oder Apoptose eventuell durch einen *Auto-feedback-loop* reguliert sein könnte (17).

Das HIV-1 nutzt zur Translation kein IRES, trotzdem wurde beschrieben, daß das La-Protein auch hier die Translation der viralen mRNAs erleichtert (124). In dieser Publikation ist beschrieben, daß das La-Protein an eine Haarnadelschleifenstruktur am 5'-Ende der mRNAs, dem sogenannten *trans-activation response element* TAR, bindet. Die stabile Sekundärstruktur dieses Elementes wirkt sich reprimierend auf die Translation der HIV-1 mRNA aus, da diese Struktur nicht für die Ribosomen zugänglich ist (99). Die Zugabe von großen Mengen an La-Protein führte in Säugetierzellen *in vitro* nicht zu einer Verstärkung der Bindung, aber zu einer Verstärkung der Translation (124). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde ebenfalls festgestellt, daß es der carboxy-terminale Teil des La-Proteins ist, der die Translation von Poliovirus und HIV-1 stimuliert (25). Hierbei konnte gezeigt werden, daß dieser Teil des La-Proteins vermutlich eine Homodimerisierungsdomäne enthält, die für die Translationskontrolle

essentiell ist. Diese Untersuchungen wurden allerdings mit rekombinant hergestelltem La-Protein durchgeführt und konnten *in vivo* nicht bestätigt werden (siehe 5.3).

Neben diesen viralen RNAs ist das La-Protein auch an der Translationskontrolle verschiedener zellulärer RNAs beteiligt. So ist gezeigt worden, daß das La-Protein an das IRES-Element der XIAP (engl.: *X-linked inhibitor of apoptosis*) mRNA bindet und dessen Translation stimuliert (60). Ebenso wie in Poliovirus- und Herpes-simplex-Virus-infizierten Zellen ((93), (12)) wird das La-Protein auch in der Apoptose gespalten und verliert sein Kernlokalisierungssignal (10). Die Relokalisierung des La-Proteins in das Zytoplasma könnte im Zusammenhang mit seiner Rolle in der Translation der XIAP mRNA darstellen (132).

Wie oben beschrieben, beeinflußt das La-Protein die Translation nicht nur über die Bindung an ein IRES Element. Es wurde ebenfalls gezeigt, daß die Bindung des La-Proteins auch die Translation von mRNAs stimuliert, die ein Oligopyrimidinmotiv am terminalen 5'-Ende (5'TOP mRNAs) tragen (26). In weiterführenden Studien konnte gezeigt werden, daß es das nicht-phosphorylierte La-Protein ist, das mit diesen TOP-mRNAs im Zytoplasma assoziiert ist, während das phosphorylierte La sich im Nukleoplasma befindet und dort an Pol III-Transkripte bindet (69).

Das La-Protein scheint daher in den verschiedenen Zellkompartimenten verschiedene Funktionen auszuüben.

### 1.3 Subzelluläre Lokalisierung des La Proteins

Der größte Teil des endogenen humanen La-Proteins ist im Zellkern lokalisiert. Es gibt aber auch Beschreibungen, in denen eine nukleoläre und zytoplasmatische Lokalisierung dokumentiert ist ((28), (101)). Das GFP-La-Fusionsprotein ist dagegen ausschließlich im Kern lokalisiert (z.B. (63) und eigene Beobachtung). Der Kernimport des La-Proteins erfolgt über einen löslichen Transportfaktor, das Karyopherin Kap108p (109).

Innerhalb des La-Proteins sind einige Domänen identifiziert worden, die die Lokalisierung steuern. Der Eintritt in den Zellkern wird dabei über ein NLS vermittelt, das sich zwischen den Positionen aa 383-400 befindet ((119), gezeigt in *X. laevis* Oozyten). Weiterführende Studien in humanen Zellen haben gezeigt, daß diese Region zwar tatsächlich für die Lokalisierung des La-Proteins im Zellkern verantwortlich ist, aber nicht ausreicht, um das Protein in diesem Kompartiment zu halten (67). In dieser Arbeit konnte ein funktionelles Motiv im La-Protein zwischen den Positionen aa 316-332 identifiziert werden, welches sowohl in Hefen als auch in Metazoen dessen Akkumulation im Zellkern bewirkt und daher als NRE (engl.: *nuclear retention element*) bezeichnet wurde. In dieser Arbeit wird ebenfalls diskutiert, ob eine

Relokalisierung des La-Proteins durch verschiedene Stimuli (siehe unten) eventuell durch eine Maskierung des NRE bedingt ist.

Ein weiteres funktionelles Motiv, das die Lokalisierung des La-Proteins beeinflusst, ist erst seit Kurzem bekannt. Es handelt sich dabei um ein sogenanntes NoLS (engl.: *nucleolar localization signal*), das für die Lokalisierung in Nukleoli verantwortlich ist (63). In dieser Arbeit wurde diskutiert, ob das Pendeln zwischen den subnukleären Kompartimenten durch dieses Motiv und die Bindung an die jeweiligen RNAs reguliert ist.

Eine Phosphorylierung des La-Proteins hat ebenfalls einen Einfluß auf seine subzelluläre Lokalisierung in humanen Zellen. So wurde gezeigt, daß das phosphorylierte La-Protein hauptsächlich im Nukleoplasma zu finden ist, während das nicht-phosphorylierte La-Protein z.T. auch im Zytoplasma und den Nukleoli lokalisiert (69). Des weiteren wurde gezeigt, daß das La-Protein auch in sogenannten Spleißflecken (Spleiß-assoziierte Kerndomänen) angereichert sein kann (12). Hierbei ist anzumerken, daß von einer Arbeitsgruppe die Anreicherung von phosphoryliertem La-Protein in diesen Flecken unter Aussparung der Nukleoli beobachtet worden war (105). Dies steht im Gegensatz zur Beschreibung der Lokalisierung im Zytoplasma und den Nukleoli. Entgegen den hier aufgeführten Publikationen, die einen Einfluß der Phosphorylierung auf die subzelluläre Lokalisierung beschreiben, ist ebenfalls publiziert, daß nach Mutation der Phosphorylierungsstellen und Expression der modifizierten La-Proteine in humanen Zellen keine Veränderung der Lokalisierung zu beobachten war (16).

Weiterhin sind auch einige exogene Faktoren beschrieben, welche die Lokalisierung des La-Proteins beeinflussen können. Es ist z.B. bekannt, daß die Lokalisierung des La-Proteins im Zellzyklus reguliert ist. Während der späten G<sub>1</sub>- und frühen S-Phase kommt es zu einer Anreicherung in den Nukleoli. In der späten S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase lokalisiert das La-Protein wieder vorwiegend im Nukleoplasma (33). Während der durch UV-Bestrahlung und durch Chemikalien induzierten Apoptose wird das carboxy-terminale Ende des La-Proteins durch eine Caspase-3-ähnliche Protease abgespalten. Aufgrund des Verlustes des Kernlokalisierungssignales führt dies zu einer Anreicherung des Proteins im Zytoplasma (10). Weiterhin ist der Einfluß einer Infektion oder Expression mit verschiedenen Viren auf die Lokalisierung des Proteins beschrieben. Die Expression von Poliovirus in Hasenretikulumzellen führt dazu, daß das La-Protein in das Zytoplasma transloziert. Dies wird wahrscheinlich durch die Abspaltung der carboxy-terminalen, NLS-haltigen Hälfte des La-Proteins durch eine virale Polio-Protease bewirkt (93). Eine Infektion mit dem Herpes-Simplex-Virus Typ 1 führt ebenfalls zu einer Relokalisierung des La-Proteins vom Zellkern in das Zytoplasma ((11),(12)).

Die vielen Prozesse, an denen das multifunktionelle La-Protein beteiligt ist (siehe **1.1**), sind auch

---

mit der Lokalisierung des Proteins in den jeweiligen Zellkompartimenten zu korrelieren.

## 1.4 Interaktion von La mit anderen Proteinen

Durch viele Studien konnte gezeigt werden, daß das La-Protein mit verschiedenen RNAs *in vivo* interagiert und z.B. für die Reifung oder die Translation der gebundenen RNA notwendig ist (siehe 1.2). Es ist anzunehmen, daß das La-Protein nicht allein, sondern im Verbund mit anderen Proteinen in den RNA Metabolismus eingreift. Allerdings blieb es oft unklar, über welchen Mechanismus genau das La-Protein seine Funktionen ausübt. Es wird vermutet, daß es z.B. bei der Translationskontrolle der Poliovirus-RNA möglicherweise nicht allein fungiert, sondern an La gebundene Proteine ebenfalls hierzu benötigt werden (13). Es wurde auch angenommen, daß die spezifische Bindung von La an die HBV-RNA durch zusätzliche Proteine reguliert wird ((58), (32)). Bisher sind jedoch nur sehr wenige Proteine identifiziert worden, die mit dem La-Protein interagieren.

Einer der identifizierten Interaktionspartner des La-Proteins ist das nukleoläre Protein Nucleolin. Diese Bindung bewirkt möglicherweise den Export von hY1- und hY3-RNAs in das Zytoplasma (37). Außerdem wurde das La-Protein als ein Calmodulin-bindendes Protein identifiziert. Es wird spekuliert, daß die Bindung von Calmodulin an das La-Protein möglicherweise dessen Funktion als ein RNA-Chaperon moduliert. Genaue Daten, die diese These unterstützen, sind aber bisher nicht erbracht worden (18). Als ein weiterer Interaktionspartner des La-Proteins ist die DEAH-Box RNA-Helikase DDX15 identifiziert worden (38). In dieser Studie konnte die Interaktion durch Koimmunpräzipitation und Kolo-kalisierung belegt werden. Über eine mögliche funktionelle Relevanz wird aber auch in diesem Bericht nur spekuliert. Es wird vermutet, daß das La-Protein die DDX15-RNA-Helikase zu bestimmten RNA-Pol III-Transkripten in die Nukleoli leitet, wo DDX15 diese RNAs prozessieren könnte, oder dass das La-Protein zusammen mit DDX15 am Spleißen beteiligt ist (38). Ein weiterer Hinweis, der diese Hypothese stützt, ist die Beobachtung, daß eine Subpopulation des La-Proteins (phosphoryliertes La) in Spleiß-assoziierten Kerndomänen akkumuliert (105).

## 1.5 La und das Hepatitis B Virus

### 1.5.1 Das Hepatitis B Virus

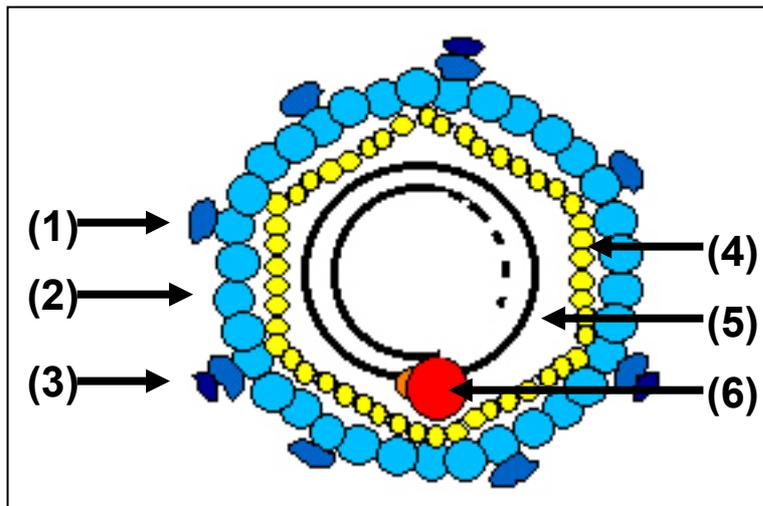
Das humane Hepatitis B Virus (HBV) ist der Hauptvertreter der Familie der *Hepadnaviridae* (hepatotrophe DNA-Viren). Das Genom dieses Virus besteht aus einer teilweise

doppelsträngigen DNA. Das Virus verursacht akute und chronische Formen von Leberentzündungen, wobei die akute Infektion in 0,5% der Fälle in einer fulminanten Leberentzündung enden, während die chronische Entzündung in beinahe 25% der Fälle zu einem hepatozellulären Karzinom führen kann (114). Obwohl seit mittlerweile 20 Jahren ein rekombinanter Impfstoff zur Verfügung steht, sterben weltweit jährlich ca. 1 Millionen Menschen an den Folgen einer HBV-Infektion (siehe Übersichtsartikel (114) und Referenzen in diesem Artikel).

Es stehen zwei Arten der Behandlung zur Verfügung, zum einen eine Immunmodulation (z.B. durch Interferon- $\alpha$ ), zum anderen die virale Suppression durch Nukleoside und Nukleosidanaloga (z.B. Lamivudin 3TC). Die Gabe von Interferon- $\alpha$  bewirkt eine erhöhte Expression von MHC-Klasse I Antigenen an den Hepatozyten, was zu einer Verstärkung der Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten führt. Allerdings erschweren die starken Nebenwirkungen einer Interferon- $\alpha$  Therapie die Behandlung vieler Patienten und ist bei einer fortgeschrittenen Lebererkrankung kontraindiziert. In den letzten Jahren wurde vor allem versucht, die Replikation des Virus durch die Gabe von Nukleosiden und Nukleosidanaloga, die auf die virale Reverse Transkriptase zielen, zu hemmen. Diese Therapie ist im Gegensatz zur Immunmodulation auch bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung möglich, allerdings stellen sich bei einer Monotherapie oft Resistenzen gegen das Medikament durch Mutationen in der viralen Reversen Transkriptase ein (siehe Übersichtsartikel (41)).

Die Therapie einer bereits bestehenden Infektion ist nur relativ selten erfolgreich. Die Entwicklung neuartiger antiviraler Strategien ist daher von großer Bedeutung und eine Herausforderung für die medizinische Forschung.

Die infektiösen Viruspartikel, nach ihrem Entdecker D.S. Dane als Dane-Partikel bezeichnet, haben eine sphärische Gestalt und einen Durchmesser von 42 nm. Die Hüllmembran des Partikels entsteht aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die viralen Hüllproteine L, M und S sind in dieser Hüllmembran verankert. Im Inneren befindet sich das ikosaedrische Capsid, das aus 180 Einheiten des HBcAg (engl.: *hepatitis B virus core antigen*) und dem DNA-Genom besteht (siehe Abb. 4). Neben diesen infektiösen Partikeln existieren noch sphärische und fadenförmige Partikel, welche keine DNA enthalten und nicht infektiös sind.



**Abb. 4: Schematische Darstellung des Dane-Partikel.** In die Lipidmembran des infektiösen HBV sind die Oberflächenproteine L (3), M (1) und S (2) eingelagert. Die Hülle umschließt das aus dem Kapsidprotein (4) aufgebaute Kapsid, welches das partiell-doppelsträngige DNA Genom (5) mit kovalent gebundener Polymerase (6) enthält.

Der Lebenszyklus des HBV ist gekennzeichnet durch die Synthese eines 3,2 kb langen, partiell doppelsträngigen rcDNA-Genoms (engl.: *relaxed circular DNA* – rcDNA) durch die reverse Transkription eines RNA Intermediates, der prägenomischen RNA. Der Mechanismus der RNA-abhängigen DNA-Synthese und der überwiegende Teil der Abläufe während der viralen Replikation sind weitgehend bekannt und ist in mehreren Übersichtsartikeln detailliert beschrieben ((40), (114)). Jedoch sind die frühen Schritte in der viralen Replikation, wie der Eintritt in die Zelle, der Verlust der Hüllmembran nach Eintritt in die Zelle und der Transport des Genoms in den Zellkern nur wenig untersucht. Gründe hierfür liegen unter anderem im Fehlen von infizierbaren Zelllinien.

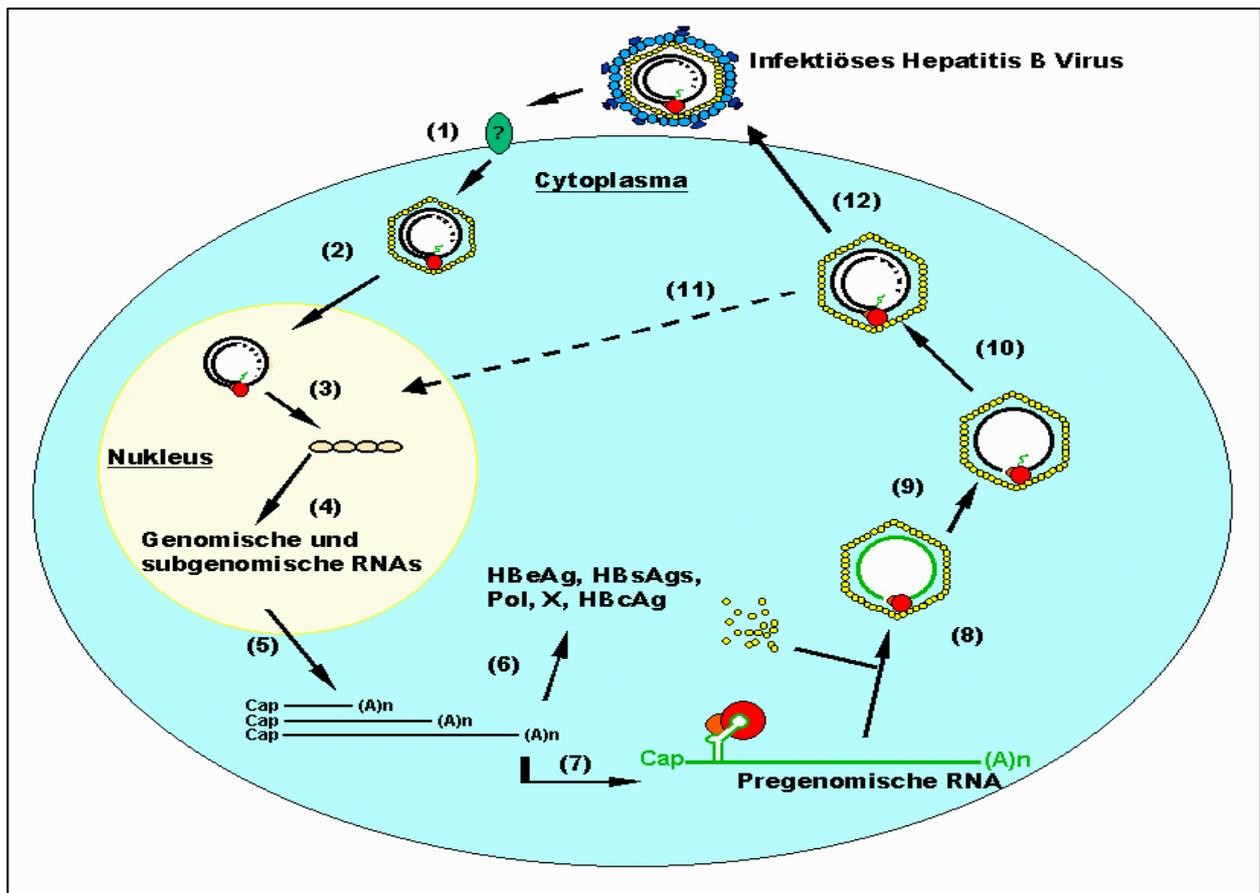
Das Genom des HBV enthält insgesamt vier offene Leseraster (engl.: *open reading frames* – ORF), die in verschiedenen Leserastern abgelesen werden und teilweise überlappen. Die Transkription wird über virale Promotoren gesteuert. Die von der zellulären RNA-Polymerase II transkribierten viralen RNAs sind ca. 3,35 kb, 2,4 kb, 2,1 kb und 0,8 kb lang und weisen alle das gleiche 3'-Ende auf, da das HBV nur ein einziges Prozessierungs-/ Polyadenylierungssignal besitzt. Von den viralen Transkripten werden 7 virale Proteine translatiert: drei Oberflächenproteine (L-, M-, und S-HBsAg) von den 2,4 und 2,1 kb RNAs, ein Kapsidprotein (HBcAg) und die Polymerase von der prägenomischen RNA, ein sezerniertes Protein (HBeAg) von der prä-Kapsid RNA, sowie das HBx-Protein, welches Transkriptions-modulierende Funktionen hat, von der 0,8 kb RNA.

Das Polymerase-Protein enthält im aminoterminalen Bereich die Sequenzen für das Protein TP, das im infektiösen Viruspartikel kovalent am 5'-Ende des vollständigen Stranges gebunden ist. Der übrige Teil des P-Proteins umfasst Domänen für die Reverse Transkriptase und die DNA-abhängige Polymerase, sowie eine Domäne für die RNase H ((95), (114)). Die Polymerase bindet über eine weitere, amino-terminale Domäne, die sogenannte terminale Proteinregion TP,

an das Enkapsidierungssignal  $\varepsilon$  der prägenomischen RNA und initiiert somit die Verpackung der viralen RNA und die Minusstrangsynthese als *primer* ((114), (95)).

Die Reverse Transkriptase-Aktivität der viralen Polymerase und Ähnlichkeiten bei der Replikation sind Charakteristika der Retroviren.

Wie das HBV in die Wirtszelle gelangt, ist ungeklärt. Es wird aber vermutet, daß das Virus über humane Hepatozyten-sepzigische Rezeptoren aufgenommen wird, welches die hohe Wirtsspezifität des Virus erklären würde. Nach der Infektion verliert das Virus seine Hüllmembran und das Genom wird in den Nukleus transportiert. Dort wird das partiell-doppelsträngige DNA Genom, die rcDNA, von Enzymen der Wirtszelle in eine komplett doppelsträngige DNA umgewandelt und dabei in eine kovalent geschlossene zirkuläre Form überführt (engl.: *covalently closed circular DNA* – cccDNA). Dies entspricht einer erfolgreichen Initiation der Infektion bei HBV. Die cccDNA dient als transkriptionelles *template* für die RNA-Polymerase II des Wirtes. Dieses Enzym generiert verschiedene mehr als Genom-lange und subgenomische Transkripte. Diese viralen RNAs werden in das Zytoplasma transportiert, wo die Translation der viralen Oberflächen-, Hüll-, sowie der X- und prä-C-Proteine stattfindet. Eine der mRNAs, die prägenomische RNA, dient sowohl als Matrize für die Synthese des Kapsidproteins als auch des viralen P-Proteins. Dieses P-Protein bindet an das 5'-Ende seiner eigenen mRNA. Im nächsten Schritt werden im Zytoplasma die Nukleokapside gebildet und während dieses Prozesses wird ein einzelnes Molekül des prägenomischen RNA-/ Polymerase-Komplexes in das sich bildende Nukleokapsid eingelagert. Wenn die virale RNA enkapsidiert ist, beginnt dessen reverse Transkription durch das virale P-Protein. Die Zusammensetzung der beiden viralen DNA-Stränge erfolgt nacheinander. Der erste DNA-minus-Strang wird von der eingelagerten prägenomische RNA synthetisiert, wobei das P-Protein kovalent am 5'-Ende gebunden bleibt. Der minus-Strang kann aber wegen der am 5'-Ende gebundene Polymerase nicht geschlossen werden und hat eine kleine terminale Redundanz. Während der Synthese wird die RNA durch RNase H degradiert. Ein Teil der RNA bleibt am 5'-Ende zurück und dieses kurze Stück dient als *primer* für die Synthese des zweiten DNA-plus-Stranges. Der plus-Strang überspannt dabei die Lücke des minus-Stranges und zwingt das Molekül in eine Ringstruktur. Bevor der DNA-plus-Strang voller Länge synthetisiert ist, wird das Virus ausgeschleust. Das bedeutet, daß Nukleokapside mit partiell doppelsträngiger DNA im Endoplasmatischen Retikulum mit einer HBsAg-haltigen Membran umhüllt werden und als infektiöser Partikel aus der Zelle exportiert werden. Andererseits kann das Nukleokapsid auch zum Zellkern zurückkehren, dort das Genom freisetzen und so die Kopienzahl der cccDNA erhöhen (siehe Abb.5; (95), (41), (114)).



**Abb. 5: Schematische Darstellung des Lebenszyklus des humanen Hepatitis B Virus.** Über einen nicht bekannten Rezeptor dringt das Virus in die Zelle ein (1), verliert die Hüllmembran (2) und das Kapsid, das Genom wird dann in den Zellkern transportiert. Nach Reparatur des partiell-doppelsträngigen DNA-Genoms zur cccDNA (3) erfolgt die Transkription der prägenomischen und subgenomischen RNAs (4) und der Transport der RNAs in das Zytoplasma (5). Von diesen viralen RNAs werden die viralen Proteine synthetisiert (6). Die virale Polymerase bindet an ihre eigene mRNA, die prägenomische RNA (7) und leitet die Verpackung in das Kapsid ein (8), wo die virale DNA-Synthese stattfindet (9-10). Nachdem die DNA synthetisiert und das Kapsid gereift ist, erhält es während des Transports durch das endoplasmatische Retikulum eine Hüllmembran mit viralen Strukturproteinen und verlässt die Zelle (12). Alternativ kann das Kapsid auch zum Zellkern zurückkehren (11), und so mehr Moleküle an cccDNA im Zellkern generieren.

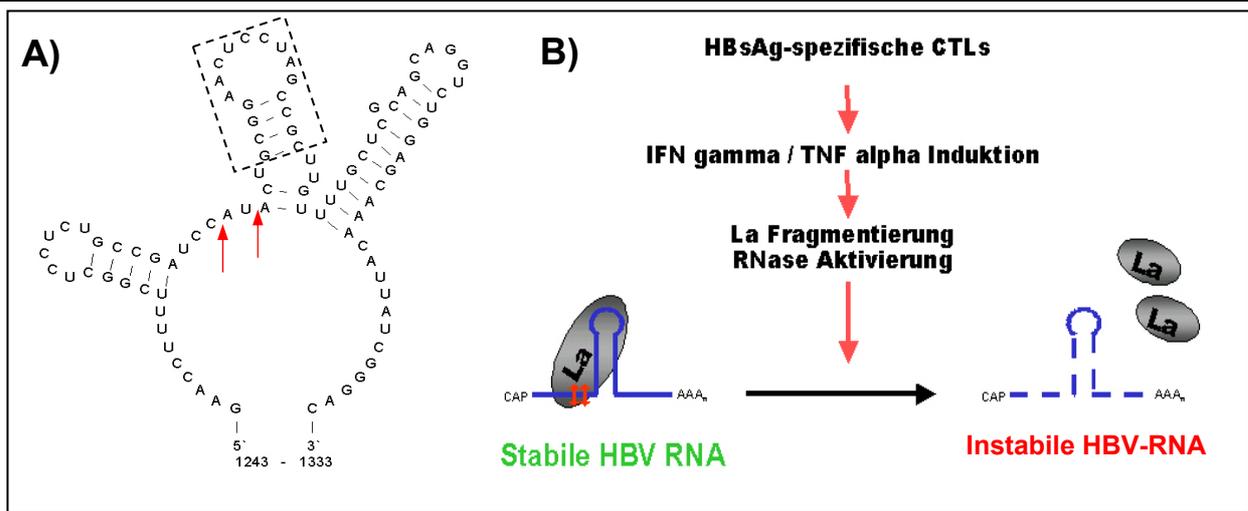
### 1.5.2 Interaktion von La und HBV-RNA

Aufgrund der extrem hohen Wirtsspezifität und der Erkenntnis, daß nur Primärkulturen infiziert werden können, ist die Analyse der HBV-Infektion und des HBV-Lebenszyklus nur bedingt möglich. Die Entwicklung einer HBV transgenen Maus, die den Virus repliziert, war von großem Gewinn, da nun die Immunpathogenese im transgenen Mausmodell studiert werden konnte. In diesen Mäusen repliziert das Virus und es entstehen infektiöse Viruspartikel ((51), (22), (23), (52)), wodurch Untersuchungen zur Wirts-Virus-Interaktion möglich wurden. Es konnte gezeigt werden, daß durch den Transfer von zytotoxischen T-Lymphozyten (engl.: *cytotoxic T lymphocytes* – CTLs), die spezifisch HBsAg-Peptide an der Oberfläche von Hepatozyten erkennen, die HBV-Genexpression und Replikation gehemmt wurde. Die Regulation der Expression und Replikation nach Injektion der CTLs ist ein nicht-toxischer,

durch Zytokine induzierter Prozeß, der vor allem durch die Sekretion von gamma-Interferon (IFN- $\gamma$ ) und den Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) vermittelt wird (50). Es konnte gezeigt werden, daß die Verminderung der HBV-Replikation ein posttranskriptioneller Prozeß ist, was ein Hinweis auf eine Destabilisierung der HBV mRNA sein könnte (127).

Um dieses Phänomen auf molekularer Ebene zu erklären, wurde nach zellulären Faktoren gesucht, die an HBV-RNA binden und diese stabilisieren. Hierbei wurde das La-Protein als HBV-RNA bindendes Protein identifiziert, welches möglicherweise den CTL-induzierten posttranskriptionellen Abbau der HBV-RNA reguliert ((58), (57)). Unter anderem wurde beobachtet, daß der Zytokin-vermittelte Abbau der HBV-RNA mit einer Spaltung des mLa-Proteins einhergeht. Außerdem konnte die Region bestimmt werden, in der das mLa-Protein an die HBV-RNA bindet. Es handelt sich hierbei um die Region nt 1243 – 1333, im Folgenden HBV-RNA.B genannt. Die La-Bindungsstelle auf der HBV-RNA konnte auf den Bereich nt 1275 – 1291 eingegrenzt werden (58). Dieser Bereich stellt das 5'-Ende des sogenannten posttranskriptionell regulatorischen Elementes (PRE) der RNA dar. Diesem Element wird eine Bedeutung beim Export von nicht-gespleißter HBV-RNA aus dem Kern zugeschrieben ((29), (65)). Eine Computer-gestützte Berechnung der potentiellen Struktur der HBV-RNA.B ergab eine Haarnadelschleife im Bereich der La-Bindungsstelle (Abb. 6A). Die Einführung von Mutationen in diese Region führte zu einer reduzierten Bindung durch das mLa-Protein und zeigte, daß die Struktur für die Bindung des mLa-Proteins entscheidend ist (58). Zusätzlich konnte dargestellt werden, daß die Mutations-bedingte Auflösung der Haarnadelschleife zu einer verringerten Halbwertszeit der viralen RNA führte (I. Ehlers & T.Heise, bisher nicht veröffentlichte Daten).

Interessanterweise wurde beschrieben, daß neben der Spaltung des La-Proteins gleichzeitig eine erhöhte endoribonukleolytische Aktivität auftritt. Dies könnte im ursächlichen Zusammenhang mit dem Zytokin-vermittelten Abbau der HBV-RNA in transgenen Mäusen stehen (50). Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, daß dieser Prozeß durch eine endonukleolytische Spaltung der HBV-RNA an Stellen hervorgerufen wurde, welche in unmittelbarer Nähe zur La-Bindungsstelle liegen ((57), Abb. 6B). Dies läßt vermuten, daß das La-Protein die HBV-RNA durch seine Bindung schützen kann, indem es die Erkennung der Spaltstellen durch Endonukleasen verhindert (Abb. 6B).



**Abb. 6: (A) Computer-berechnete Struktur der HBV-RNA.B:** Die Abbildung zeigt die berechnete, durch Computeranalysen vorhergesagte Struktur der HBV-RNA-B (nt 1243 – 1333). Die Haarnadelstruktur, an welche das La-Protein bindet, ist durch einen gestrichelten Kasten angedeutet. Die roten Pfeile zeigen die endonukleolytischen Spaltstellen. **(B) Hypothetische schematische Darstellung der HBV-RNA (De-)Stabilisierung.** Das La Protein bindet an die in (A) bezeichnete Region der HBV-RNA (*blau*) und schützt die endonukleolytischen Spaltstellen (*rote Pfeile*). Eine Behandlung mit HBsAg-spezifischen cytotoxischen T-Lymphocyten (CTLs) führt zur Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , was eine Fragmentierung des La Proteins bewirkt und führt zur Destabilisierung der HBV-RNA durch RNasen.

Die Interaktion zwischen dem humanen La-Protein und der HBV-RNA.B wurde ebenfalls hinsichtlich der Bindungsstellen im hLa-Protein *in vitro* charakterisiert. Es zeigte sich, daß die Konsensussequenzen RNP-1 und RNP-2 in den RNA-Erkennungsmotiven des zentralen und des carboxy-terminalen RRM unabhängig voneinander für eine Bindung an die HBV-RNA.B notwendig sind (62). Überraschend war die Beobachtung, daß die Bindung von hLa an HBV-RNA.B *in vitro* im Gegensatz zur Bindung von La aus Mausleberkernextrakten nicht spezifisch war. Außerdem beeinflusste die Phosphorylierung von Mausleberkernextrakten die Bindung des La-Proteins an die HBV-RNA, während die Studie zur Charakterisierung der Bindung hLa an HBV-RNA.B zeigte, daß eine Phosphorylierung des La-Proteins keinen Einfluß auf die Bindung hatte ((61), (58)). Es liegt also der Schluß nahe, daß weitere zelluläre Faktoren notwendig sind, die die Spezifität der Bindung *in vivo* vermitteln.

Es ist bereits beschrieben, daß das Polypyrimidintrakt bindende Protein (PTB) ebenfalls an das PRE der prägenomischen HBV-RNA bindet (136). Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Bindung von PTB an das PRE mit einem erhöhten Export der RNA in das Zytoplasma und einem Anstieg der PRE-vermittelten Genexpression einhergeht (136). Über welchen Mechanismus genau die Bindung von PTB an das PRE den Export der HBV-RNA reguliert, ist nicht bekannt. Auch in diesem Fall wird darüber spekuliert, daß weitere zelluläre Faktoren an diesem Prozeß beteiligt sind (81).

## 1.6 Aufgabenstellung

Das La-Protein ist an verschiedenen Prozesse in der Zelle beteiligt und interagiert mit einer großen Anzahl an zellulären und viralen RNAs, zu denen auch die des Hepatitis B Virus zählt. Die Stabilisierung der HBV-RNA durch das mLa-Protein wurde in einem HBV transgenen Mausmodell gezeigt. Die Charakterisierung dieser Interaktion mLa/ HBV-RNA.B ergab jedoch Hinweise dafür, daß das La-Protein wahrscheinlich nicht der einzige zelluläre Faktor ist, der an die HBV-RNA bindet. Die Erkenntnis, daß die Bindung des La-Proteins die HBV-RNA stabilisiert und eine Spaltung des La-Proteins mit dem Abbau der HBV-RNA einhergeht, verspricht einen möglichen neuen Ansatzpunkt für eine antivirale Therapie der Hepatitis B Infektion. Um diesen Ansatz überhaupt experimentell prüfen zu können, ist es notwendig, zunächst detailliertere Informationen über die molekularen Wechselwirkungen *in vivo* zu generieren.

Da bisherige, z.T. unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe, darauf hinwiesen, daß weitere zelluläre Faktoren die Interaktion von La mit HBV-RNA modulieren, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, einen Interaktionspartner des humanen La-Proteins zu identifizieren, der möglicherweise einen Einfluß auf die Bindung von La an HBV-RNA hat und dies auch experimentell zu belegen.

Hierzu sollten zunächst Proteine aus humanen Zellen aufgereinigt werden, die mit dem La-Protein assoziiert sind. Das La-Protein sollte dafür mit einer Erkennungssequenz, einer Histidin-Wiederholung (His<sub>6</sub>-La), versehen werden, um eine spezifische Aufreinigung von His<sub>6</sub>-hLa und an La gebundenen Proteinen über die Affinität der Histidine an eine Nickel-NTA Matrix zu ermöglichen. Die koeluierenden Proteine sollten dann durch die Massenspektroskopie identifiziert werden.

In weiteren unabhängigen Methoden sollte bestätigt werden, daß die Interaktion des La-Proteins und dem Interaktionspartner auch tatsächlich *in vivo* stattfindet. Hierzu sollte u.a. die Koimmunpräzipitation des La-Proteins mit einem interagierenden Protein optimiert werden und schließlich beide endogen exprimierte Proteine präzipitiert werden. Im Säugetierzellen-2-Hybrid-System sollte die Interaktion ebenfalls *in vivo* bestätigt werden. Diese Methode sollte auch dazu eingesetzt werden die Protein-Protein-Interaktionsdomäne zu identifizieren. Außerdem sollten die Analyse der Lokalisierung des Interaktionspartners und die möglichen Koloikalisierung beider Proteine einen weiteren unabhängigen Beweis für eine mögliche Interaktion erbringen.

Weiterhin sollte die funktionelle Relevanz der Protein-Protein-Interaktion in Bezug auf die Bindung von La an die HBV-RNA untersucht werden. Bei diesen Analysen sollte herausgestellt

---

werden, ob der neue Interaktionspartner auch selbst an die HBV-RNA bindet, und wenn ja, welchen Einfluß der neue Interaktionspartner auf die Bindung von La an die HBV-RNA und auf die Replikation des Virus hat.

Hierzu mußte der neue Interaktionspartner rekombinant hergestellt werden. Zur Analyse einer Bindung des Interaktionspartners an HBV-RNA im *EMSA* sollten die Bindungsbedingungen hinsichtlich der Spezifität optimiert werden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Alle nicht einzeln aufgeführten Chemikalien wurden durch die Firma Merck bezogen.

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Biozym
Agarose	Difco
Ampicillin-NaCl	Serva
Arginin	Gibco
Bactoagar	Difco
DEPC	Serva
Ethidiumbromid	Roche
FCS (fötales Kälberserum)	Gibco
Kanamycin	Serva
Mineralöl	Sigma
Moviol	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
NP-40	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Phenol	Appligene
Poinceau S	Fluka
Pyruvat	Gibco
Rinder-Serum-Albumin (BSA)	Sigma
TEMED	Serva
Tris	ICN
Triton X-100	Serva
Tween-20 Lösung	Serva

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

96-well-Reaktionsplatten	Falcon
Blottingpapier	BioRad
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf
Dialyse Membran RC	Spectrum Laboratories

---

G25- <i>spin columns</i>	Amersham-Pharmacia
GF/C-Rundfilter	Whatman
Hybond-N <sup>+</sup> Nylon-Transfer-Membran	Amersham-Pharmacia
Hybond-P PVDF-Transfer-Membran	Amersham-Pharmacia
Kanülen	Braun
Lab-Tek Doppelkammer-System	Nunc
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell
Röntgenfilm, Medical X-Ray-Film	Fuji
Whatman-Papier	Whatman
Zellkultur-Flaschen	Greiner
Zellkultur-Platten	Greiner

### 2.3 Gebrauchsfertige Lösungen und Reagenziensätze (Kits)

ABI PRISM BigDye-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit	PE Applied Biosystems
Bio-Rad Protein Assay	BioRad
CAT ELISA	Roche
DNA Präparations-Kit Qiagen Maxi	Qiagen
DNA Präparations-Kit Qiagen Mini	Qiagen
FuGene-6 Transfektionsreagenz	Roche
Opti-MEM	Gibco
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Rapid DNA Ligation Kit	Roche
Ribo Probe <i>In Vitro</i> Transkriptions System	Promega
SuperSignal Chemiluminescent Peroxidase Solution	Pierce
Titan One Tube RT-PCR System	Roche
TriPure-Isolation Reagent	Roche

### 2.4 Enzyme

DNase, RNase-frei	Promega
Lysozym	Serva
Pfu Turbo DNA-Polymerase	Stratagene
Pwo DNA-Polymerase	Roche

---

Restriktionsenzym <i>Bam</i> H I	MBI
Restriktionsenzym <i>Hind</i> III	MBI
Restriktionsenzym <i>Sal</i> I	MBI
Restriktionsenzym <i>Spe</i> I	New England Biolabs
RNasin (RNase Inhibitor)	Promega
<u>S</u> hrimps <u>a</u> lkalische <u>P</u> hosphatase	Roche
T4 Polynukleotid Kinase	Roche und Ambion
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen
T7 RNA-Polymerase	Promega

## 2.5 Größenstandards

DNA Größenstandard Smart	Eurogentec
Prestained Proteinmarker broad-range	New England Biolabs

## 2.6 Antikörper

### Primäre Antikörper:

$\alpha$ -hPSF-Antikörper B92 (Maus, monoklonal, IgG-1)	Sigma
$\alpha$ -PSF-Antikörper CTS32 (Maus, monoklonal)	freundlichst zur Verfügung gestellt durch R. Foisner, Universität von Wien, Österreich
$\alpha$ -hLa-Antikörper 3B9 (Maus Hybridoma, IgG-2A), monoklonal	s.u.
$\alpha$ -hLa-Antikörper SW5 (Maus Hybridoma, IgG-2A) monoklonal	freundlichst zur Verfügung gestellt durch M. Bachmann, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, USA
$\alpha$ -Gal4 DNA-BD RK5C1 (Maus, monoklonal; IgG-2A)	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -Gal4 DNA-BD (Hase, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -GFP (Hase, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -GFP (Maus, monoklonal, Gemisch, IgG-1 $\kappa$ )	Roche
Kontroll-IgG-2a (5A7) (Maus, monoklonal)	Dianova

$\alpha$ -Histone H2B (Hase, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -Histone H4 (Hase, polyklonal)	Upstate
$\alpha$ -p53 DO-1 (Maus, monoklonal, IgG-2A)	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -Nucleolin 4E2 (Maus, monoklonal, IgG-1)	MoBiTec
<b>Sekundäre Antikörper:</b>	
DAPI Kernfärbung	Höchst
Meerettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper, Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)	Dianova
Meerettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper, Ziege-anti-Maus IgG (H+L)	Dianova
Meerettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper, Ziege-anti-Esel IgG (H+L)	Dianova
Rhodamin-gekoppelter Antikörper Ziege-anti-Maus, Alexa-Fluor 594	Molecular Probes
Rhodamin-gekoppelter Antikörper Ziege-anti-Kaninchen, Alexa-Fluor 594	Molecular Probes

## 2.7 Plasmide

pEGFP-C1	Clontech, BD Bioscience
pEGFP-N1	Clontech, BD Bioscience
pEGFP-C1-hLa-WT/ -mut	in der Arbeitsgruppe vorhanden
pET28b(+) Vektor	Novagen
pET28b(+)-hLa-WT	freundlichst zur Verfügung gestellt durch E.Chan, Scripps-Research-Institute, San Diego, Kalifornien, USA
pET15b-PSF	s.u.
pEGFP-C1-PSF-WT/ -mut	freundlichst zu Verfügung gestellt durch J. Patton Vanderbilt University Nashville, Tennessee, USA
pcDNA4/HisMax <sup>®</sup> TOPO	Invitrogen
pM	Clontech, BD Bioscience
pVP16	Clontech, BD Bioscience

---

pG5CAT	Clontech, BD Bioscience
pCHT-HBV WT	mit freundlicher Genehmigung von H. Schaller, ZMBH, Heidelberg
pSM2	in der Abteilung vorhanden, kloniert von S. Miska

Die Vektorkarten sind z.T. im Anhang aufgeführt.

## 2.8 Bakterienstämme und Zelllinien

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Bakterienstamm zur Transformation eukaryotischen Expressionsvektoren
-----------------------------	---

<i>E. coli</i> BL21	Bakterienstamm zur Transformation prokaryotischer Expressionsvektoren
---------------------	--

Die Charakteristika der Bakterien sind im Anhang aufgeführt.

Huh7	humane Hepatoma-Linie
U2OS	humane Osteosarkoma-Linie
HeLa	humane Cervix-Adenokarzinom- Linie
293T	humane Nierenepithel-Linie
CV-1	Affen-Nierenepithel-Linie

## 2.9 Bakterien- und Zellkultur-Medien

Standard-I-Medium ( <i>E. coli</i> ):	6 g NaCl 15 g Pepton 3 g Hefeextrakt 1 g D(+)-Glucose ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
---------------------------------------	---

autoklavieren

Standard-I-Agarplatten ( <i>E. coli</i> ):	Standard-I-Medium mit 1,5 % (w/v) BactoAgar
--	--

autoklavieren

Vor dem Gießen der Platten wurde das Medium auf etwa 40°C abgekühlt und das Antibiotikum (wenn nötig) hinzugefügt. Die Antibiotika wurden für Nährböden und Flüssigkulturen in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml Ampicillin bzw. 0,03 µg/ml Kanamycin für die Anzucht resistenter Bakterienstämme eingesetzt. Agarplatten wurden im Dunkeln bei 4° C gelagert.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) für eukaryotische Zellkulturen ("complete"):	10 % FCS
	1 mM Pyruvat
	3,5 mM L-Arginin
	2 mM L-Glutamin
	100 IE Penicillin
	100 IE Streptomycin
	10 ml/l nicht-essentielle Aminosäuren

Das fötale Kälberserum wurde zur Inaktivierung der Komplementfaktoren 30 min bei 56°C im Wasserbad erhitzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Fertiges Medium wurde bei 4°C gelagert und vor der Verwendung auf RT erwärmt.

Trypsin/ EDTA zur Ablösung adhärenter eukaryontischer Zellen:	0,125 % Trypsin
	0,1 % EDTA
	in 1x PBS Puffer

## 2.10 Oligonukleotide

### 2.10.1 Oligonukleotide zur Umklonierung von DNA-Sequenzen in eukaryotische Vektoren

sense-primer PSF 5S: 5' - CCA CGC **GTC GAC** TTA TGT CTC GGG ATC GGT TCC GG -3'

Die fettgedruckte Sequenz bezeichnet die eingefügte **Sal-I** Restriktionsschnittstelle zur Klonierung in den Vektor pM bzw. pVP16.

antisense-primer PSF 6AS: 5' - CCA CCG TGA GCC TAA AAT CGG GGT TTT TTG - 3'

Die fettgedruckte Sequenz bezeichnet die eingefügt **Spe-I** Restriktionsschnittstelle zur Klonierung in den Vektor pM bzw. pVP16.

sense-primer La 62S: 5' - CCA CGC **GGA TCC** TTA TGG CTG AAA ATG GTG ATA ATG - 3'

Die fettgedruckte Sequenz bezeichnet die eingefügte **Bam-HI** Restriktionsschnittstelle zur Klonierung in den Vektor pM bzw. pVP16.

*antisense-primer La 63AS*: 5' - CCA CCC **TTC GAA** CCT ACT GGT CTC CAG CAC C -3'

Die fettgedruckte Sequenz bezeichnet die eingefügte **Hind-III** Restriktionsschnittstelle zur Klonierung in den Vektor pM bzw. pVP16.

### 2.10.2 Oligonukleotide zur Amplifikation von prägenomischer RNA

*sense-primer TH-HBV-92-S*: 5'-TCC AAG CTG TGC CTT GGG TGG – 3'

Im Folgenden wird dieser *primer* als P1 bezeichnet.

*antisense-primer TH-HBV-91-AS*: 5'-GCA CTA GTA AAC TGA GCC AGG – 3'

Im Folgenden wird dieser *primer* als P2 bezeichnet.

*antisense-primer TH-HBV-68-AS*: 5'-TGC AGT ATG GTG AGG TGA ACA ATG C – 3'

Im Folgenden wird dieser *primer* als P3 bezeichnet.

### 2.10.3 Oligonukleotide für die Generierung von *templates* zur *in vitro* Transkription

*TH9T7-S*: 5'-CCA TCG ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AAC CTT TTC GGC TCC TCT-3'

Die HBV Sequenz (Subtyp *ayw*), die sich an die T7-Promotorsequenz anschließt, umfaßt die Nukleotide 1243 bis 1261.

*TH13-AS*: 5'- GTC CCG ATA ATG TTT GCT CCA G –3'

Dieses Oligonukleotid umfaßt die *antisense*-Sequenz zu der HBV Region zwischen Nukleotid 1317 und 1333.

*THACT2-T7*: 5'-CCA TCG ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCC GCT CTA GGC ACC AA-3'

*THACT2-AS*: 5'-TGT TCA ATG GGG TAC TTC AG-3'

Die Sequenz des T7-Promotors ist unterstrichen.

### 2.10.4 Oligonukleotide zur Sequenzierung

*antisense-primer PSF 1AS*: 5'- GAC GGG CTT GGA AGA GTC C -3'

Position nt 416-399 im humanen PSF

*sense-primer PSF 2S*: 5'- CTA TCA TGA ACA TCA GGC -3'

Position nt 1665-1682 im humanen PSF

*sense-primer PSF 11S*: 5'- CGG GAA AGA GAC ATG CGA ATG -3'

Position nt 1901-1921 im humanen PSF

*sense-primer PSF 12S*: 5'- CCT ACC ACA CCT CCT CAG -3'

Position nt 610-625 im humanen PSF

*antisense-primer PSF 13AS*: 5'- TCC TGG TTC TCC ATA TTT AGC -3'

Position nt 1057-1037 im humanen PSF

*sense-primer PSF 14S*: 5'- GCT AAA TAT GGA GAA CCA GGA -3'

Position nt 1037-1057 im humanen PSF

*sense-primer Gal4S*: 5'- GCC GTC ACA GAT AGA TTG -3'

Position nt 728-746 im eukaryotischen Expressionsvektor pM

*sense-primer VP16S*: 5'- CCC TAC GGC GCT CTG GAT -3'

Position nt 571-588 im eukaryotischen Expressionsvektor pVP16

## 2.11 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammern Easy Cast	OWL Scientific, Inc.
Bakterieninkubator	New Brunswick Scientific
Brutschränke	New Brunswick Scientific
Fluor-S MultiImager System	Bio-Rad
GSA-Rotor	Beckmann
Neubauer-Zählkammer, 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm <sup>2</sup>	Marienfeld
PCR-Gerät Robocycler Gradient 96	Stratagene
PCR-Gerät Thermocycler	MWG Biotech
Phosphorimager Bildplatte Fuji-BAS-2000	Fuji
Phosphorimager Gerät FujiX-Bas 2000	Fuji
Photometer Ultraspec 3000pro	Amersham Pharmacia
Röntgenfilmentwickler Agfa Curix-60	Agfa
Sorvall RC5B+ Zentrifuge	Beckmann
SS34 Rotor	Beckmann
Stratalinker 1800	Stratagene
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf
Trans-Blot-Semi-Dry-Transfer-Cell	BioRad
Ultraschall-Behandlung	Branson Sonic
Western Blot Trans Blot Kammer	Bio-Rad
Zeiss Axiophot Mikroskop	Zeiss

---

## 2.12 Herstellernachweis

Agfa, D-50670 Köln

Amersham-Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg

Applied Biosystems, D-64293 Darmstadt

Beckmann Instruments GmbH, D-80807 München

BioRad Laboratories GmbH, D-80939 München

Biozym Diagnostik GmbH, D-31883 Hessisch Oldendorf

Clontech, BD Biosciences, D-69126 Heidelberg

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, D-22331 Hamburg

Eurogentec, D-50667 Köln

Dianova, D-20148 Hamburg

Gibco BRL / Life Technologies GmbH, D-76339 Eggenstein

Greiner, D-72636 Frickenhausen

Haereus Instruments GmbH, D-63450 Hanau

Hartmann Analytics, D-38124 Braunschweig

IBA GmbH, D-37079 Göttingen

Invitrogen, San Diego, CA, USA

MBI Fermentas, D-68789 St.Leon-Rot

Merck KGaA, D-64271 Darmstadt

Mo Bi Tec, Wagenstieg 5, D-37077 Göttingen

MWG-Biotech AG, D-85560 Ebersberg

New England Biolabs, D-65926 Frankfurt am Main

New Brunswick Scientific, NJ, USA

Nunc GmbH & Co.KG, Postfach 120543, D-65083 Wiesbaden

PharMingen, BD Biosciences, D-69126 Heidelberg

Promega GmbH, High-Tech-Park, D-68199 Mannheim

Qiagen GmbH, D-40724 Hilden

Roche, D-69112 Heidelberg

Schleicher & Schuell Bioscience GmbH, D-37586 Dassel/Relliehausen

Serva Feinbiochemica & Co. KG, D-69042 Heidelberg

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-82039 Deisenhofen

Stratagene GmbH, D-69000 Heidelberg

Whatman, Springfield Mill, UK

Zeiss, D-07745 Jena

## 3 Methoden

### 3.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung von *E. coli*

*E. coli* wurde in Standard-I-Flüssigmedium (siehe 2.9) bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) über Nacht kultiviert, nachdem mit Hilfe einer Impföse von einem einzelnen Klon angeimpft wurde. Das Zusetzen entsprechender Antibiotika verhinderte, daß Zellen mit einer Plasmid-gekoppelten Resistenz durch das Fehlen des nötigen Selektionsdruckes das Plasmid verlieren konnten.

Zum Anlegen einer Plattenkultur wurden die Bakterien mittels Impföse auf Standard-I-Agarplatten (gegebenenfalls mit entsprechendem Antibiotikum; siehe 2.9) ausgestrichen und über Nacht bei 37 C inkubiert.

#### 3.1.2 Bestimmung der Zellzahl von Bakterienflüssigkulturen

Die Gesamtzellzahl einer Bakterienkultur läßt sich aus der photometrischen Messung der optischen Dichte bei einer geeigneten Wellenlänge errechnen. Im Falle von *E. coli* entspricht 1 OD<sub>600</sub> = 5 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml. Nicht berücksichtigt wird bei dieser Methode das Vorhandensein toter Zellen, die ebenfalls zur optischen Dichte der Probe beitragen, sodaß die bestimmte Gesamtzellzahl nicht zwangsläufig auf die Lebendzellzahl rückschließen läßt.

#### 3.1.3 Vorbereitung von *E. coli*-Zellen für die Calciumtransformation

Durch Behandlung mit eiskaltem Calciumchlorid wird in Bakterien ein vorübergehender Zustand der Kompetenz ausgelöst, wodurch die Zellen DNA aufnehmen können. Hierfür wurden *E.coli*-Zellen der Stämme DH5α und BL21 benutzt. Die Charakteristika der verwendeten Bakterienstämme sind im Anhang aufgeführt.

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte in Anlehnung an die Hanahan-Methode (55). Dazu wurden 100 µl einer 3 ml über-Nacht-Vorkultur des entsprechenden *E.coli* Stammes in 100 ml steriles Standard-I-Medium gegeben und bei 37°C unter Schütteln inkubiert bis sich eine OD<sub>600</sub> = 0,5 eingestellt hatte. Alle anschließenden Arbeitsschritte erfolgten stets auf Eis und mit vorgekühlten, sterilen Lösungen. Nach Zentrifugation für 10 min bei 300 rpm und Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 40 ml Hanahan-Lösung 1 resuspendiert und 10 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 8 min bei 3000 rpm und Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 4 ml Hanahan-Lösung 2 resuspendiert, anschließend in vorgekühlten

Eppendorfgefäßen aliquotiert und mit etwa  $-70^{\circ}\text{C}$  (Trockeneis in Ethanol abs.) schockgefrosten. Die Lagerung erfolgte bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

<b>Hanahan-Lösung 1</b>	<b>500 ml</b>
30 mM $\text{CH}_3\text{COO-K}$	1,5 g
50 mM $\text{MnCl}_2$	5 g $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$
10 mM $\text{CaCl}_2$	0,7 g
100 mM $\text{KCl}$	3,7 g
15 (v/v)% Glycerin	75 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

<b>Hanahan-Lösung 2</b>	<b>100 ml</b>
10 mM MOPS	0,2 g
75 mM $\text{CaCl}_2$	1,1 g
10 mM $\text{KCl}$	0,07 g
15 (v/v)% Glycerin	

Der pH Wert wurde mit 1 M  $\text{NaOH}$  auf pH 7.0 eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.1.4 Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien (Transformation)

Um fremde Plasmid-DNA in *E.coli*-Zellen zu exprimieren, mußte diese zunächst in die Zellen eingebracht werden. Dies erfolgte, indem 50  $\mu\text{l}$  der kompetenten Zellen (siehe 3.1.3) pro Transformationsansatz langsam auf Eis aufgetaut und mit etwa 10 ng Plasmid-DNA gemischt wurden. Die Mischung wurde daraufhin 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation für 5 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  und für 2 min auf Eis. Nach der Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  Standard-I-Medium (ohne Antibiotikum) wuchsen die Zellen für 1 h in einem auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmtem Wasserbad und konnten nach dieser Zeit bei 6000  $\times\text{g}$  abzentrifugiert werden. Anschließend wurden 350  $\mu\text{l}$  Mediumüberstand verworfen und das Pellet im verbliebenen Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension konnte dann auf Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum verteilt werden. Agarplatten mit *E. coli* wurden über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### 3.1.5 Expression von rekombinanten Proteinen in Prokaryoten

Rekombinates hLa bzw. PSF wurde ausgehend vom prokaryotischen Expressionsvektor pET28b(+)-hLa und pET15b-PSF in *E. coli* BL21 exprimiert. Die verwendeten pET-Vektoren tragen eine Histidin-Wiederholungssequenz, die bei der Expression der Proteine mit abgelesen

wird und bei der nachfolgenden Aufreinigung der Proteine essentiell ist. Die Vektorkarten sind im Anhang dargestellt. Die in die Vektoren inklonierten Gene stehen unter der Kontrolle eines mit IPTG (Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid) induzierbaren T7 Promotors und werden erst nach Verfügbarkeit von IPTG exprimiert. Der offene Leserahmen der Proteinsequenz ist dabei *in frame* mit einer Sequenz, die für 6 Histidine codiert, sodaß ein Fusionsprotein exprimiert wird, welches eine Histidin-Wiederholung am amino-Terminus trägt. Diese Histidin-Markierung dient der spezifischen Aufreinigung der rekombinanten, bakteriell exprimierten Proteine, wie unter **3.3.1** beschrieben.

Zur Expression der rekombinanten Proteine wurden die mit dem entsprechenden Plasmid transformierten *E. coli* DH5 $\alpha$  auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde gepickt und in 3 ml Standard-I-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37°C und unter ständigem Schütteln als Vorkultur angezogen. Am Folgetag wurden 100 ml Standard-I-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum und mit 1 ml der Bakterienvorkultur versetzt. Die Bakterienkultur wurde bei 37°C unter ständigem Schütteln bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> = 0,5 inkubiert. Nach Erreichen der OD wurden die Expression der rekombinanten Protein durch Zusetzen von 1 ml 100 mM IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Die Bakterienkultur inkubierte für weitere 6 h. Danach wurden die Bakterien bei 6000 xg abzentrifugiert. Das Pellet wurde bis zur Aufreinigung der Proteine bei -20°C gelagert.

## **3.2 Zellbiologische Methoden**

### **3.2.1 Auftauen von Zellen, Ansetzen und Umsetzen einer Zellkultur**

Zum Ansetzen einer Zellkultur wurden 1 ml tiefgefrorene Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 10 ml vorgewärmtem DMEM "complete" Medium (siehe **2.9**) aufgenommen und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml vorgewärmtem DMEM "complete" Medium aufgenommen. Durch diesen Schritt wurde das zugesetzte DMSO, das die Zerstörung der Zellmembranen während des Einfriervorganges verhindert, ausgewaschen.

Die Zellsuspension wurde in einer 25-cm<sup>2</sup>- Zellkulturflasche ausgesät.

Zum Umsetzen ("Splitten") adhärent wachsender Zellen wurde zunächst das Medium sorgfältig abgesaugt. Um eventuell verbliebene Mediumreste zu entfernen, wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Trypsin/ EDTA benetzt, was eine Ablösung der Zellen von der Kulturflaschenoberfläche bewirkt. Die Zellsuspension wurde mit DMEM "complete" Medium verdünnt, was die Wirkung des Trypsin/ EDTA wieder aufhebt. Die

verdünnte Zellsuspension wurde in entsprechender Konzentration auf neue Kulturflaschen verteilt, in denen bereits das jeweilige Volumen an DMEM "complete" Medium vorgelegt wurde. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator kultiviert.

In der vorliegenden Arbeit sind verschiedene Zelllinien benutzt worden (siehe 2.8). Zur Kultivierung wurden die Zellen normalerweise alle 2-3 Tage in einem Verhältnis 1:10 umgesetzt. Für eine nachfolgende Transfektion (siehe 3.2.4) war es wichtig, daß die Zellen niemals vollständig konfluent wuchsen, und daß sie gleichmäßig ausgesät wurden. Die Zellsuspension wurde hierzu nach der Trypsinierung durch eine Kanüle gezogen, um die Zellen zu vereinzeln.

Bei der Kultivierung von 293T Zellen ist zu beachten, daß diese Zellen sehr empfindlich sind. Daher wurde hier das Ablösen der Zellen durch Trypsin so schnell wie möglich durchgeführt.

### 3.2.2 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen einer konfluent bewachsenen Kulturflasche wurde zunächst das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden danach mit Trypsin/ EDTA abgelöst und in 10 ml DMEM "complete" Medium aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml "Einfriermedium" aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf spezielle Kryoreaktionsgefäße verteilt, für eine halbe Stunde auf Eis, für eine weitere halbe Stunde bei -20°C und über Nacht bei -70°C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

<b>Einfriermedium</b>	<b>10 ml</b>
DMEM	8,5 ml
FCS	0,5 ml
DMSO	1 ml

### 3.2.3 Bestimmung der Zellzahl von adhärent wachsenden Zellen

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen zunächst gewaschen, mit Trypsin/ EDTA von der Kulturflaschenoberfläche gelöst und in DMEM "complete" Medium aufgenommen. Die Suspension wurde in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, wo die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 10 ml Spritze (Durchmesser der Kanüle erst 0,9 dann 0,4 mm) vereinzelt wurden. Nachdem dadurch die Zellverbände aufgelöst waren, wurden wenige Tropfen der Suspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und es wurden insgesamt 4 Großquadrate ausgezählt. Der Durchschnittswert dieser Ergebnisse wurde mit dem Faktor 10000 multipliziert, welcher sich aus der Art der Zählkammer ergab und lieferte die Anzahl an Zellen/

ml. Daraufhin wurden die Zellen entsprechend ausplattiert. Für eine Transfektion am Folgetag wurden z.B.  $5 \times 10^5$  HeLa Zellen in einer  $\varnothing$  5-cm-Schale ausgesät.

### 3.2.4 Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische adhärente Zellen (Transfektion)

Zur Transfektion von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen wurden zunächst Zellen in einer bestimmten Dichte ausgesät, sodaß die Konfluenz am darauffolgenden Tag zwischen 40-50% erreicht war. Bevor die Zellen transfiziert wurden, wurde das Medium gewechselt. Bei der Calciumphosphat Methode wurde zunächst die Plasmid-DNA mit einem *Carrier*-Plasmid aufgefüllt, um eine konstant hohe Konzentration zu erreichen, welche die Transfektionseffizienz erhöht. Die DNA wurde dann verdünnt und mit der Pufferlösung 2x HBS gemischt. Durch tropfenweise Zugabe der 2 M Calciumchlorid-Lösung entstand über einen Zeitraum von 30 Minuten ein Präzipitat aus Calciumphosphat und DNA. Für die Transfektion von Zellen in einer 60-mm-Schale wurden 5 µg Gesamt-DNA auf 110 µl mit sterilem H<sub>2</sub>O aufgefüllt, mit 250 µl 2x HBS Puffer gemischt und abschließend mit 15,5 µl 2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung versetzt. Diese Lösung wurde dann gleichmäßig auf die Zellen verteilt, um eine regelmäßige Transfektion zu erreichen. Der genaue Vorgang der Aufnahme der DNA in die Zelle ist bei dieser Methode bisher nicht geklärt. Es wird angenommen, daß die transfizierte DNA über Endozytose in das Zytoplasma der Zelle gelangt und dann in den Nukleus transportiert wird (110).

<b>2x HEPES-bufferes saline (HBS)</b>	<b>180 ml</b>
280 mM NaCl	3,2 g
10 mM KCl	0,148 g
1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,054 g
12 mM Dextrose	0,4 g
50 mM HEPES	2 g

Die Lösung wurde mit 0,5 N NaOH auf einen pH von 7,05 eingestellt und auf 200 ml aufgefüllt. Danach wurde die Lösung sterilfiltriert. Die 2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung wurde ebenfalls sterilfiltriert. Beide Lösungen wurden bei 4°C aufbewahrt

Eine weitere Methode zum Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische adhärente Zellen ist die Transfektion mit einer kommerziellen Lösung, FuGENE 6. FuGENE 6 ist ein auf Lipiden basierendes Reagenz, das ebenfalls ein Präzipitat mit DNA bildet. Der genaue Vorgang der Aufnahme des FuGENE 6-DNA Präzipitates und die Integration der Fremd-DNA ist auch hier nicht geklärt. Durch diese Methode konnte in schwer-transfizierbaren Zelltypen, wie z.B. Huh7

und U2OS Zellen, eine höhere Transfektionseffizienz erreicht werden im Vergleich zur Transfektion mit Calciumphosphat-DNA-Kopräzipitation.

Bei dieser Methode wurden ebenfalls die Zellen so ausgesät, daß am folgenden Tag eine Konfluenz von 40-50% erreicht war. Vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Der angewendete Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: Pro 1 µg zu transfizierende DNA wurden zunächst 100 µl serumfreies Medium und 3 µl FuGene-6 vorsichtig gemischt und für 5min bei RT in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß inkubiert, bevor 1 µg DNA hinzugefügt und für 15min RT erneut inkubiert wurde. Schließlich wurde der gesamte Transfektions-Ansatz auf die Zellen getropft.

Nachdem die Fremd-DNA in die eukaryotischen Zellen transfiziert wurde, wurden die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt. Erfahrungsgemäß war 24 h nach dem Mediumwechsel ausreichend Protein exprimiert worden, sodaß die Zellen entweder fixiert oder lysiert wurden und für weitere Analysen zur Verfügung standen. Bei der Transfektion von EGFP-Fusionsproteinen konnte die Expression des Proteins unter dem Lebendzell-Mikroskop bei einer Wellenlänge von 516 nm beobachtet werden.

### **3.2.5 Fixierung von eukaryotischen adhärennten Zellen für Immunfluoreszenz-Analysen**

Um die subzelluläre Lokalisierung des hLa und PSF und seiner Mutanten verfolgen zu können, wurde die Proteine als GFP-Fusionsprotein exprimiert. Dies erlaubt eine Dokumentation der Verteilung in der lebenden Zelle. Es war jedoch notwendig, bestimmte andere Strukturen in den Zellen, wie Nuklei oder andere Proteine anzufärben. Dafür mußten die Zellen auf einem Deckglas fixiert werden. Ferner mußten die Zellen permeabilisiert werden, damit anschließend Färbereagenzien zugegeben werden konnten, sowie primäre und sekundäre Antikörper, die gegen bestimmte zelluläre Proteine gerichtet waren. Schließlich wurden die Zellen mit dem Deckgläschen auf einem Objektträger fixiert und anschließend wurde die Lokalisierung der jeweiligen Proteine und Strukturen im Mikroskop ausgewertet.

Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf Glasplättchen in einer Ø 6-cm-Schale ausgesät. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und auf diesen Glasplättchen in den Schalen fixiert. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Fixierung getestet.

### **3.2.5.1 Fixierung mittels Methanol/ Aceton**

Bei dieser Methode wurden die bewachsenen Glasplättchen zunächst für 5 min in eiskaltem Methanol und direkt danach für 30 sec in eiskaltem Aceton inkubiert. Das Aceton wurde dann mit eiskaltem 1x PBS abgewaschen. Für weitere Analysen wurden die Glasplättchen den Schalen entnommen und entweder im Dunkeln auf Whatman-Papier getrocknet oder direkt weiterverwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Zeitpunkte der Inkubation mit Methanol und Aceton getestet, um ein optimales Ergebnis zur Darstellung der untersuchten Proteine zu erhalten.

### **3.2.5.2 Fixierung mittels Methanol/ Aceton nach Prä-Extraktion**

Um lösliche Proteine zu extrahieren und gebundene Proteine besser darstellen zu können, wurden bei dieser Methode die Objektträger vor der Methanol/Aceton Fixierung für 30 sec-5 min in eiskaltem 0,5% Triton-X-100 in 1x PBS inkubiert. Die anschließende Fixierung erfolgte wie in 3.2.5.1 beschrieben.

### **3.2.5.3 Fixierung mittels Paraformaldehyd**

Diese Methode versprach eine bessere Visualisierung der Proteine in der Immunfluoreszenz (83). Hierzu wurden die Zellen für 5 min in eiskaltem CSK-Puffer inkubiert, der 3,7% Paraformaldehyd enthielt. Anschließend wurden die Objektträger für 5 min in 1% Triton-X-100 inkubiert, um tatsächlich alle Zellen zu permeabilisieren und für die Antikörper-Reaktion der Immunfluoreszenz vorzubereiten. Das Triton-X-100 wurde durch 1x PBS abgewaschen.

Eine weitere Methode der Fixierung mittels Paraformaldehyd wurde ebenfalls getestet. Hierzu wurden die Glasplättchen für 10 min bei 37°C in einem PHEM-Puffer inkubiert, der 3,7% Paraformaldehyd enthielt. Nach der Fixierung wurden die Zellen für 5 min in 0,5% Triton-X-100 inkubiert, um die vollständige Permeabilisierung sicherzustellen. Nach der Inkubation in Triton-X-100 wurden die Glasplättchen in 1x PBS gewaschen.

Außerdem wurde die folgende Methode der Fixierung mit Paraformaldehyd getestet: Die Glasplättchen wurden für 2 min in einer eiskalten Lösung aus 3,7% Paraformaldehyd und 0,5% Triton-X-100 in 1x PBS inkubiert. Bei diesem Schritt werden durch das Triton-X-100 lösliche Proteine zum Teil extrahiert. Danach wurden die Glasplättchen für 20 min in 3,7% Paraformaldehyd in 1x PBS auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Glasplättchen mit 1x PBS gewaschen.

<b>CSK-Puffer</b>	<b>500 ml</b>
100 mM NaCl	50 ml 1 M
300 mM Sucrose	51,3 g
3 mM MgCl <sub>2</sub>	3 ml 0,5 M
10 mM PIPES (pH 6,8)	20 ml 0,25 M
<b>2x PHEM-Puffer</b>	<b>500 ml</b>
120 mM PIPES	18,14 g
55 mM HEPES	6,5 g
20 mM EGTA	3,8 g
16 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,97 g

Der pH-Wert wurde mit 10 M KOH auf 7 eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

### 3.2.6 Immunfluoreszenz

Proteine können durch spezifische Antikörper auch in Zellen nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben auf Glasplättchen fixiert (3.2.5). Hierzu wurden ca. 70 µl einer Antikörperverdünnung in 1x PBS vorgelegt. Dabei muß die Verdünnung für jeden Antikörper experimentell optimiert werden. In Tabelle 3 sind die in der Arbeit verwendeten Erstantikörper und die jeweilige Verdünnung aufgeführt. Die Glasplättchen wurden mit den fixierten Zellen auf diesen Tropfen gelegt und für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde 3 x für 5 min mit 1x PBS ausgewaschen.

**Tabelle 3: In der Immunfluoreszenz verwendete Antikörper mit der entsprechenden Verdünnung**

verwendete Antikörper in der Immunfluoreszenz	Verdünnung in 1x PBS
mAb anti-La 3B9	1:500
mAb anti-La SW5	1:500
mAb anti-PSF B92	1:1000
mAb anti-Gal4	1:1000

Es folgte eine Inkubation mit dem 2. Antikörper, der ebenfalls in 1x PBS verdünnt wurde. Auch hier mußte die optimale Konzentration experimentell ermittelt werden. Die Konzentration des verwendeten Antikörpers betrug in den vorliegenden Experimenten 1:400.

Nach der Inkubation mit dem 2. Antikörper wurde das Glasplättchen in einem Hoechst-Farbstoff (4 ng/ ml) in einer Verdünnung 1:1000 in 1x PBS für 10 min inkubiert. Durch diesen Farbstoff konnte die DNA in den Zellkernen spezifisch angefärbt werden. Anschließend wurde das

Glasplättchen für 3x 5 min in 1x PBS gewaschen, um ungebundenen 2. Antikörper und Hoechst-Farbstoff zu entfernen. Die Glasplättchen wurden mit 10 µl Moviol, vorgelegt auf einem Objektträger, möglichst luftblasenfrei eingedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend konnten die Zellen im Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet werden. Die Fluoreszenz-Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop durchgeführt, welches mit der AxioVision 3.0.6.38 Software ausgestattet war.

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus Prokaryoten

Die Ni-NTA-Technologie ist eine Weiterentwicklung der IMAC (immobilisierte Metall Affinitätschromatographie) und hat den Vorteil, daß Nitriлотriessigsäure (NTA) stabile und hochaffine Bindungen mit Nickel eingeht, welches seinerseits hochaffin durch Histidin gebunden wird. Durch eine Markierung des Proteins mit einer hexa-Histidin Sequenz kann das lösliche Protein über diese Methode effizient gereinigt werden. Die Elution des Histidin-markierten Proteins erfolgt über Imidazol-Applikation. Imidazol wirkt in diesem Fall als Kompetitor zu Histidin in der Bindung an die Ni-NTA-Matrix und führt zur Freisetzung des zuvor gebundenen Proteins, sodaß die Konzentration des Imidazol im Elutionspuffer am höchsten ist.

Nach Expression der rekombinanten, His<sub>6</sub>-markierten Proteine (siehe 3.1.5) wurde das Bakteriensediment aus 100 ml Bakterienkultur in 2 ml kaltem Lysispuffer resuspendiert und durch Zugabe von 1 mg/ml Endkonzentration Lysozym und 2 – 4 stündiger Inkubation auf Eis mit anschließender Ultraschall-Behandlung (3 x 10 sec) lysiert. Lysozym wirkt in diesem Fall unterstützend zur Lyse der bakteriellen Zellen, da es als eine (N-Acetyl-) Muramidase die Zellwände prokaryotischer Zellen auflöst. Eine Lyse der Zellen wurde ebenfalls durch die Behandlung mit Ultraschall erreicht. Zur Trennung von löslichen Proteinen und Membranbruchstücken oder eventuell denaturiertem Protein erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 20000 xg. Aus dem sich dabei bildenden Überstand konnte wie nachfolgend beschrieben das His<sub>6</sub> -markierte Protein gewonnen werden.

<b>Lysispuffer</b>	<b>1l</b>
50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	6,9 g
10 mM Imidazol	0,68 g
300 mM NaCl	17,54 g

Der pH Wert wurde mit NaOH auf 8 eingestellt.

### 3.3.1.2 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus Prokaryoten unter nativen Bedingungen mittels Ni-NTA-Technologie

Das mit einer amino-terminalen His<sub>6</sub>-Markierung versehene Protein wurde wie folgt über Nickel-NTA *spin columns* gereinigt: bei allen genannten Schritten wurden gekühlte Puffer (4° C) verwendet, denen zuvor 1% Protease-Inhibitor Complete™ frisch zugefügt wurde. Alle Zentrifugationsschritte wurden für 2 min bei 700 x g und 4° C durchgeführt.

Die Säulen wurden mit 600 µl Lysispuffer mit anschließender Zentrifugation äquilibriert, bevor das Zelllysats aufgetragen und die Histidin-markierten Proteine an die Matrix gebunden wurden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation wie oben, und die eluierende Durchlauf-Fraktion enthielt die nicht an die Matrix gebundenen Proteine. Anschließend wurden unspezifisch an die Matrix adsorbierte Proteine durch Waschen mit 4 x 600 µl Waschpuffer entfernt, bevor das spezifisch gebundene Protein in drei Schritten durch Zugabe von je 200 µl Elutionspuffer eluiert wurde.

<b>Waschpuffer</b>	<b>1 l</b>
50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	6,9 g
42,5 mM Imidazol	2,89 g
1 M NaCl	58,47 g

Der pH Wert wurde mit NaOH auf 8 eingestellt.

<b>Elutionspuffer</b>	<b>1 l</b>
50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	6,9 g
300 mM Imidazol	20,4 g
300 mM NaCl	17,54 g

Der pH Wert wurde mit NaOH auf 8 eingestellt.

### 3.3.1.3 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus Prokaryoten unter denaturierenden Bedingungen mittels Ni-NTA-Technologie

Eukaryotische Proteine, die intrazellulär in *E. coli* exprimiert werden, können unter Umständen in sogenannten Einschlusskörpern ("*inclusion bodies*") gelagert werden. Es wird angenommen, daß die reduzierende Umgebung im Zytoplasma der Bakterien zur Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb des Proteins führen kann, was eine unkorrekte Faltung des Proteins zur Folge hätte. Es wird vermutet, daß diese unkorrekte Faltung zur Bildung der Einschlusskörperchen führt.

Proteine, die in Einschlusskörperchen im Zytoplasma des Bakteriums vorliegen, sind unter nativen Bedingungen nicht aufzureinigen. Zur Aufreinigung dieser Proteine mittels Ni-NTA-

Technologie wurden im Gegensatz zur oben beschriebenen nativen Methode denaturierende Bedingungen gewählt. Bei dieser Methode wurde das unlösliche Histidin-markierte Protein durch 8 M Harnstoff in Lösung gebracht und über Nickel-NTA Säulen wie oben beschrieben aufgereinigt. Die Aufreinigung des Histidin-markierten Proteins erfolgte bei dieser Methode nicht über die Zugabe von Imidazol, sondern über eine Veränderung des pH-Wertes zum sauren Milieu. Die an das Protein angefügten Histidin-Reste haben einen  $pK_s$ -Wert von 6 und werden bei einem pH-Wert von 4,5 – 5,3 partiell positiv geladen. Dadurch kann das Histidin-markierte Protein nicht länger an die Nickel-Ionen binden und dissoziiert von der Nickel-NTA Matrix. Den verwendeten Puffern wurde 1% Protease-Inhibitor Complete™ frisch zugefügt. Da 6 M Harnstoff in Kälte ausfällt und somit den pH-Wert der Lösungen verändert, wurden die Lösungen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Alle Zentrifugationsschritte wurden für 2 min bei 4°C und 700 x g durchgeführt. Nach der Aufreinigung der Histidin-markierten Proteine unter denaturierenden Bedingungen war es notwendig, die Proteine für die weiteren Analysen zu renaturieren. Hierzu wurde das Eluat gegen einen Puffer dialysiert, der abnehmende Menge Harnstoff enthielt. Es wurde gegen Dialysepuffer mit 6 M – 4 M – 2 M – 1 M – 0 M Harnstoff für jeweils 1 h bei 4°C dialysiert.

<b>Lysisbuffer</b>	<b>1 l</b>
100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	13,8 g
10 mM Tris	1,2 g
8 M Harnstoff	480,5 g

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8 eingestellt.

<b>Waschpuffer</b>	<b>1 l</b>
100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	13,8 g
10 mM Tris	1,2 g
8 M Harnstoff	480,5 g

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 6,3 eingestellt.

<b>Elutionspuffer</b>	<b>1 l</b>
100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	13,8 g
10 mM Tris	1,2 g
8 M Harnstoff	480,5 g

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 4,5 eingestellt.

### 3.3.2 Aufreinigung von Rekombinanten aus Eukaryoten

Histidin-markierte Proteine, die in eukaryotischen Zellen exprimiert wurden, konnten ebenfalls mittels der oben beschriebenen Methode der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Technologie gewonnen werden.

Die Zellen, die hierzu mit dem Plasmid pcDNA4.HisMAX-TOPO-hLa, das die Information für das Histidin-markierte Protein unter der Kontrolle eines CMV-Promoters und einer Translationsverstärkenden Sequenz enthält, transfiziert wurden, wurden ca. 48 h nach der Transfektion lysiert und je nach Bedarf in eine Zellkern- und Zytoplasmafraktion separiert. Bei der Separation wurden die Zellen einer 60-mm-Zellkulturschale mit 1 ml kaltem Zell-Lysis-Puffer lysiert. Dieser Puffer enthielt Salze in geringer Konzentration, was ein Platzen der Zellen aufgrund des osmotischen Druckes bewirkt. Des Weiteren wurden zwei-wertige Kationen eingesetzt, um Protein-Protein-Interaktionen aufrecht zu erhalten. Zur Lyse wurden die Zellen in dem Puffer resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und durch Vortexen und Auf-und-Abpipettieren vereinzelt. Der Erfolg dieses Schrittes wurde unter dem Lichtmikroskop bewertet. Zum Fortfahren der Fraktionierung war es wichtig, daß die Zellkerne vereinzelt und intakt waren, während die Zellmembran vollständig aufgelöst war. Anschließend wurde die Suspension bei 10000 xg bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine des Zytoplasmas. Das Pellet enthielt unlösliche Bestandteile sowie die Zellkerne. Das Pellet wurde dann mit 2x 600 µl kaltem Zell-Lysis-Puffer gewaschen und in 600 µl kaltem Zellkern-Lysis-Puffer resuspendiert. Dieser Puffer enthielt Salze in hoher Konzentration, die die Hülle des Zellkerns auflösen. Die Suspension wurde für 3x 3 sec mit Ultraschall behandelt. Dieser Schritt wurde ebenfalls unter dem Lichtmikroskop bewertet. Es war hierbei wichtig, daß die Kerne vollständig aufgelöst waren. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei maximaler g-Zahl (20000 xg) bei 4°C und für 10 min, um Membranen und andere unlösliche Bestandteile zu verlieren.

War es für die Fragestellung entscheidend sämtliche Proteine der Zelle zu gewinnen, wurden die Zellen im Zell-Lysis-Puffer lysiert und anschließend gleich mit Ultraschall behandelt. Hierbei war es ebenfalls wichtig, unter dem Lichtmikroskop die vollständige Auflösung der Zellkerne zu beobachten. Die unlöslichen Bestandteile wurden wiederum bei maximaler g-Zahl bei 4°C und für 10 min abzentrifugiert.

Den verwendeten Puffern wurden 1% Protease-Inhibitor Complete™ frisch zugefügt.

---

<b>Zell-Lysis-Puffer</b>	<b>10 ml</b>
10 mM Tris	100 $\mu$ l 1 M Tris/ HCl pH 7,4
10 mM KCl	25 $\mu$ l 4 M KCl
10 mM MgCl <sub>2</sub>	200 $\mu$ l 0,5 M MgCl <sub>2</sub>
0,2 % NP-40	200 $\mu$ l 10% NP-40
<b>Zellkern-Lysis-Puffer</b>	<b>10 ml</b>
10 mM Tris	100 $\mu$ l 1 M Tris/ HCl pH 7,4
420 mM NaCl	1400 $\mu$ l 3 M NaCl
1 mM EDTA	20 $\mu$ l 0,5 M EDTA pH 8

### **3.3.2.1 Aufreinigung von Rekombinanten aus Eukaryoten unter nativen Bedingungen mittels Ni-NTA-Technologie**

Das in Eukaryoten exprimierte His<sub>6</sub>-markierte hLa wurde mittels der Ni-NTA-Technologie aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte unter nativen Bedingungen mit den gleichen Puffern und nach dem gleichen Protokoll wie die His<sub>6</sub>-markierten Proteine, die aus Prokaryoten aufgereinigt wurden (siehe 3.3.1.2).

### **3.3.3 Auftrennung eines Proteingemisches in der SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE wurde in Anlehnung an die Originalmethode von Lämmli durchgeführt (79). Hierbei wird eine Proteinlösung mit dem Detergenz SDS behandelt. Die meisten Proteine binden SDS zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladung-zu-Masse-Verhältnis. Ferner denaturiert SDS die Proteine zusammen mit den reduzierenden Agenzien DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen. Somit unterscheiden sich die Proteine nur noch in ihrem Stokes-Radius oder in ihrer Masse und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. In der SDS-PAGE wandern die SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zum Pluspol, wobei die Polyacrylamidmatrix als ein molekulares Sieb fungiert und die Proteine nach Stokes-Radius oder Masse auftrennt.

Das verwendete Acrylamid/ Bisacrylamid polymerisiert nach Zugabe von APS und TEMED zu Polyacrylamid aus und bildet ein Molekularsieb. Zur SDS-PAGE wurde zunächst ein Trenngel vorgelegt, in dem die Proteine dann aufgetrennt werden. Der Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix in diesem Gel ist aufgrund der höheren Konzentration von Acrylamid höher als im Sammelgel. Die Acrylamidkonzentration richtet sich nach dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurden Trenngele mit einer

Acrylamidkonzentration von 12,5% verwendet. In diesem Gel findet die eigentliche Trennung des Proteingemisches statt. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wird dieses mit einem Sammelgel überschichtet. Das Sammelgel hat einen niedrigeren Molekularsiebeffekt aufgrund einer niedrigeren Acrylamidkonzentration. Es dient in der Auftrennung der Schaffung einer einheitlichen Lauffront. Es wurden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 5% verwendet. Das Verhältnis Trenngel:Sammelgel betrug 2,6:1. Für eine Gelelektrophorese wurden die zu untersuchenden Proteingemische mit ca.  $\frac{1}{3}$  Vol. des Probenvolumens mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt, für 5 min bei 95° C denaturiert und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 180 V in SDS-Laufpuffer. Die Dauer des Gellaufs richtete sich nach Art der Fragestellung und konnte aufgrund des mitlaufenden Marker-Proteingemisches abgeschätzt werden.

<b>Trenngel</b>	<b>60 ml</b>
12,5% Acrylamid	25 ml Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
375 mM Tris	15 ml 1,5 M Tris/ HCl pH 8,8
0,1% (w/v) SDS	600 µl 10% (w/v) SDS
0,05% (v/v) TEMED	30 µl
0,05% (w/v) APS	300 µl 10% (w/v) APS
<b>Sammelgel</b>	<b>24 ml</b>
5% Acrylamid	4 ml Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
125 mM Tris	6 ml 0,5 M Tris/ HCl pH 6,8
0,1% (w/v) SDS	240 µl 10% (w/v) SDS
0,1% (v/v) TEMED	24 µl
0,1% (w/v) APS	240 µl 10% (w/v) APS

Die 10% (w/v)-ige Ammoniumpersulfatlösung ist bei 4°C ca. 2 Wochen haltbar. Zur längeren Aufbewahrung sollten Aliquots bei -20°C gelagert werden.

<b>5 X SDS-Ladepuffer</b>	<b>10 ml</b>
0,0625 M Tris	1,25 ml 0,5 M Tris/ HCl pH 6,8
0,2% (w/v) SDS	200 µl 10% (w/v) SDS
10% (v/v) Glycerin	
5% (v/v) β-Mercaptoethanol	frisch zufügen

---

<b>10 X SDS-Laufpuffer</b>	<b>2 l</b>
250 mM Tris	62 g
19,2 mM Glycin	288 g
0,1% (w/v) SDS	20 g

## 3.4 Detektion von Proteinen

### 3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Proteingehalts einer zu analysierenden Probe erfolgte in Anlehnung an die Originalmethode von Bradford (15). Diese Methode beruht darauf, daß sich bei der Bindung von Coomassie-Brilliant-Blue G-250 an Proteine das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Dazu wurden je nach erwarteter Proteinkonzentration 1 – 30 µl der Lösung mit einem Gemisch aus Färbereagenz (1:5 (v/v) Färbelösung : Wasser) auf 1 ml aufgefüllt. Nach mindestens 5 min Inkubation erfolgte die Bestimmung der OD<sub>595</sub> in einem Photometer. Alternativ wurde die Bestimmung in einer 96-well Mikrotiterplatte durchgeführt. Dazu wurde die Proteinlösung mit obigem Gemisch auf 200 µl aufgefüllt und mindestens 2 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Adsorption OD<sub>595</sub> in einem ELISA-Reader. Dieses eignete sich insbesondere für die Proteinbestimmung bei größerer Anzahl zu vermessender Proben.

Parallel dazu wurde bei jeder Bestimmung eine Eichreihe aufgestellt, indem bekannte Mengen (1 bis 10 µg) an BSA mit demselben Reagenz versetzt wurden und ebenfalls die OD<sub>595</sub> bestimmt wurde. Die daraus resultierenden optischen Dichten wurden graphisch gegen die Proteinkonzentration aufgetragen, sodaß der Proteingehalt der zu analysierenden Proben aus dieser Kurve abgelesen werden konnte.

### 3.4.2 Färbung von SDS-PA Gelen

#### 3.4.2.1 Coomassie-Brilliant-Blue Färbung

Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue R250 bzw. G250 ermöglicht das Anfärben von Proteinen in Gelen. Der Farbstoff wurde einem Puffer zugegeben, der gleichzeitig zum Färben die Proteine auch im Gel fixiert. Die Sensitivität dieser Methode liegt bei 50-100 ng pro Proteinbande, allerdings ist diese Methode der Färbung im Gel nicht sehr zeitaufwendig.

Zur Färbung wurde das SDS-PA Gel für ca. 30 min in der Färbelösung unter Schütteln inkubiert. Die Entfärbung des Gels erfolgte in der entsprechenden Lösung ohne Farbstoff, wobei die Dauer der Entfärbung sich nach der erwarteten Bandenintensität und der Gelstärke richtete und

zwischen 30 min bis 1 h dauerte. Hierbei wurde die Entfärbelösung mehrmals gewechselt. Die Entfärbelösung konnte mehrfach verwendet werden, indem diese nach Gebrauch in eine Flasche mit ein paar Löffeln Aktivkohle gefüllt wurde. Nach Absetzen der Aktivkohle, welche den Farbstoff bindet, wurde die Lösung filtriert und wiederverwendet.

#### **Coomassie-Lösung**

45% (v/v) Methanol

45% (v/v) H<sub>2</sub>O

10% (v/v) Essigsäure

0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250

0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250

#### **3.4.2.2 Silberfärbung**

Im Gegensatz zur oben beschriebenen Färbung von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue ist die Silberfärbung sehr viel sensitiver. Proteine in einer Konzentration von 1-10 ng pro Bande werden bereits detektiert. Bei dieser Methode bildet das Ag<sup>2+</sup>-Ion Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag<sup>2+</sup> der Komplexe zu Ag, wodurch die Proteine im Gel dunkel erscheinen. Die genauen Vorgänge sind bei dieser Reaktion unbekannt. Der Nachteil dieser Methode ist der hohe Zeitaufwand. Außerdem werden neben Proteinen auch gleichzeitig Nukleinsäuren, Lipide und Lipopolysaccharide nachgewiesen.

Zur Silberfärbung von Proteinen in einem SDS-PA Gel wurde das Gel zunächst für 1 h in einer Fixierlösung fixiert. Das Formaldehyd wurde durch dreimaliges Waschen für 10 min mit 50% (v/v) Ethanol und anschließendem dreimaligem Waschen für 30 sec in Wasser vollständig ausgewaschen. Danach wurde das Gel für 1 h in einer Reduktionslösung inkubiert, um die Sensitivität der Reaktion weiter zu erhöhen. Es wurde abermals 3x für 30 sec mit Wasser gewaschen. Zum Färben wurde das Gel für 20 min in einer Färbelösung inkubiert, die Silbernitrat enthält. Nach diesem Schritt wurde das Gel 3x für 30 sec mit Wasser gewaschen. Danach wurden die Proteine mit einer Entwicklungslösung sichtbar gemacht. Die Inkubationszeit dieses Schrittes hängt von der Menge an aufgetragenem Protein ab und wurde unter ständiger Beobachtung durchgeführt. In der Regel ergaben sich Inkubationszeiten zwischen 5-15 min. Danach wurde die Reaktion durch die Fixierlösung abgestoppt.

Die Färbung wurde in Glasgefäßen durchgeführt, da die verwendeten Reagenzien Plastik angreifen.

---

<b>Fixierlösung</b>	<b>1 l</b>
50% (v/v) Methanol	500 ml
12% (v/v) Essigsäure	120 ml
0,05% (v/v) Formaldehyd (37%)	500 µl
<b>Reduktionslösung</b>	<b>300 ml</b>
1,2 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	450 µl (0,43 g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5H <sub>2</sub> O in 5 ml H <sub>2</sub> O gelöst)
<b>Färbelösung</b>	<b>300 ml</b>
11 mM AgNO <sub>3</sub>	0,6 g
0,075% (v/v) Formaldehyd (37%)	225 µl
<b>Entwicklungslösung</b>	<b>500 ml</b>
11 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,6 g
0,05% (v/v) Formaldehyd (37%)	250 µl
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	250 µl (0,43 g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5H <sub>2</sub> O in 5 ml H <sub>2</sub> O gelöst)

### 3.4.3 Färbung von Proteinen auf Membranen

#### 3.4.3.1 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot)

Nachdem die Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden, wurden sie elektrophoretisch auf eine Membran übertragen (Blotten). Es wurde ein Halbtrockenttransfer in einer Blotkammer mit Platin/Edelstahl-Elektroden durchgeführt. Hierzu wurde die Membran im Transferpuffer angefeuchtet und auf 3 Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier gelegt, das sich auf der Kathodenplatte befand. Das in Transferpuffer äquilibrierte Gel wurde so auf die Membran gelegt, daß keine Luftblasen entstehen. Auf das Gel kamen wiederum mehrere Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier. Anschließend wurde die Anodenplatte auf diese Anordnung gelegt und die Apparatur unter Strom gesetzt. Die Dauer des Transfers richtete sich nach der Größe des Gels. es wurde zumeist für 45 min bei 20V geblottet.

Die verwendete hydrophobe Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran muß vor dem Transfer kurz in Methanol quellen, bis die Membran beinahe durchsichtig erschien und anschliessend in Transferpuffer äquilibriert werden.

---

<b>Transferpuffer</b>	<b>10x – 1 l</b>
0,5 M Tris	58,2 g
0,4 M Glycin	29,3 g
3,75% (w/v) SDS	37,5 ml 10% (w/v) SDS

Dem 1x Transferpuffer wurde 20% (v/v) Methanol zugesetzt.

### 3.4.3.2 Färben mit Amidoschwarz

Auf eine PVDF-Membran transferrierte Proteine können mittels Amidoschwarz sichtbar gemacht werden. Hierzu wird die Membran ca. 5 min in der Färbelösung geschwenkt und anschließend mit einer Entfärbelösung inkubiert bis die Proteinbanden blau sichtbar waren.

Da diese Methode allerdings nur zu einem bestimmten Grad reversibel ist und unter Umständen die Membran für eine nachfolgende Immunodetektion unbrauchbar machen kann, wurde die Amidoschwarzfärbung erst am Ende der Analysen durchgeführt.

#### **Färbelösung**

0,025% (w/v) Amidoschwarz

11% (v/v) Ethanol

7,5% (v/v) Eisessig

#### **Entfärbelösung**

10% (v/v) Ethanol

1,75% (v/v) Eisessig

### 3.4.4 Immunodetektion

Proteine können indirekt über eine Antikörperreaktion detektiert werden. Hierbei bindet ein spezifischer Antikörper an das jeweilige Protein. Ein zweiter markierter Antikörper bindet an den spezifischen Erstantikörper. Mit Hilfe einer Proteinmarkers kann nun die Position des Proteins bestimmt werden. Diese Methode stellt einen sehr sensitiven Nachweis dar.

#### 3.4.4.1 Western-Blot

Im Western-Blot kann ein spezifisches Protein in einem Proteingemisch, das in einem SDS-PA Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen wurde, detektiert werden. Um die unspezifische Absorption des spezifischen Antikörpers an die Membran zu verhindern, wurde die Membran durch eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur in einem *Blocking* Reagenz abgesättigt. Es folgte eine Inkubation mit dem spezifischen Antikörper für 1 h bei

Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C, der in dem *Blocking* Reagenz verdünnt wurde. Die Verdünnung des Antikörpers richtete sich nach der Proteinmenge und nach der Affinität des Antikörpers zum Protein. In Tabelle 4 sind die in der Arbeit verwendeten Antikörper und die jeweiligen Verdünnungen zusammengefaßt. Antikörper, die nicht gebunden wurden, wurden mit einem Waschpuffer für 3x 15 min ausgewaschen. Es folgte eine Inkubation mit dem 2., HRPO (engl.: *horseradish peroxidase*)-markierten Antikörper, der gegen den 1. Antikörper gerichtet ist. Dieser Antikörper wurde ebenfalls in einem *Blocking* Reagenz verdünnt. Die Verdünnung betrug zumeist 1:20000. Nicht gebundener Antikörper wurde wiederum mit einem Waschpuffer entfernt. Durch die Zugabe einer ECL-Lösung für 2 min konnte die HRPO das in der Lösung enthaltene Luminol oxidieren und so eine Chemilumineszenz auslösen. Das entstehende Licht wurde auf einem Röntgenfilm oder im Fluor-S-Multiimager sichtbar gemacht und konnte quantifiziert werden.

**Tabelle 4: Übersicht über die im Western Blot verwendeten Antikörper mit der jeweiligen Verdünnung**

verwendete Antikörper in der Western Blot Analyse	Verdünnung in Blocking Reagenz
mAb anti-La SW5	1:500
mAb anti-PSF B92	1:2000
mAb anti-PSF CTS32	1:5
poly anti-β-Tubulin	1:1000
poly anti-H2B	1:500
poly anti-H4	1:500
poly anti-PTB	1:1000
mAb anti-p53 DO-1	1:500
mAb anti-Nucleolin	1:1000
poly anti-Gal4	1:1500
mAb anti-VP16	1:750

<b>Waschpuffer</b>	<b>20x – 2 l</b>
200 mM Tris	48,44 g
2 M NaCl	233,76 g
0,09% (v/v) Tween-20	1,8 ml (frisch zufügen)

Der pH Wert wurde auf 7,5 eingestellt.

#### **Blocking Reagenz**

5% (w/v) Milchpulver in 1x Waschpuffer

Um die gleiche Membran mehrfach verwenden zu können, mußten gebundene Antikörper gelöst werden. Hierzu wurde die Membran für 1 h bei 50°C in einer Entfernungslösung inkubiert. Diese Lösung enthält β-Mercaptoethanol, was die SH-Gruppen des Antikörpers reduziert. Nach dem

Entfernen des Antikörpers mußte die Membran wieder mit dem *Blocking* Reagenz abgesättigt werden, bevor sich die Inkubation mit dem folgenden Erstantikörper anschloß.

<b>Entfernungslösung</b>	<b>50 ml</b>
0,05% (w/v) SDS	10 ml 10% (w/v) SDS
0,7% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol	0,35 ml
0,0625 M Tris	6,25 ml 0,5 M Tris/ HCl pH 6,8

#### **3.4.4.2 Abbott-ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)**

Um einen Einfluß der Überexpression von PSF auf die HBV Genexpression zu untersuchen, wurde im Abbott-ELISA der HBsAg-Wert bestimmt.

Der Überstand von Zellen, die mit einem Plasmid transfiziert wurden, das das HBV Genom enthielt (pSM2 und pCHT-WT; Vektorkarten im Anhang), wurde zur HBsAg-Sekretion untersucht. Um Zellbestandteile zu verlieren, wurden die Überstände für 20 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Als "positiv" wurden Werte eingeordnet, wenn das Verhältnis des Signals zum Hintergrundsignal (engl.: *signal noise ratio*, S/N) größer als 2 war. Zur Negativkontrolle wurde der HBsAg-Wert von Überständen nicht-transfizierter Zellen bestimmt. Dieser Wert wurde von den Werten der Proben abgezogen. Der HBsAg-Wert von Zellen, die mit dem HBV-Plasmid allein transfiziert wurden, galt 100%. HBsAg-Werte von Zellen, die zusätzlich mit pEGFP-PSF transfiziert wurden, wurden in Bezug auf diesen Wert berechnet und ebenfalls in Prozent ausgedrückt.

Die Analysen wurden in der Abteilung Mikrobiologie von Prof. Laufs am Universitätsklinikum Eppendorf durchgeführt.

### **3.5 Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion**

Zum Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion war es wichtig, die Proteine in ihrer natürlichen Konformation zu erhalten und vor dem Abbau durch Proteasen zu schützen. Die folgenden Experimente wurden deshalb bei 4°C und unter Zusatz von 1% frisch angesetztem Protease-Inhibitoren-Cocktails Complete<sup>TM</sup> durchgeführt.

#### **3.5.1 Koelution mit His<sub>6</sub>- markiertem rekombinanten hLa in Zellen**

Zur Identifizierung von Proteinen, die mit dem His<sub>6</sub>-markierten hLa Protein in der Zelle interagieren, wurde das rekombinante Protein zunächst in eukaryotischen Zellen exprimiert. Die Zellen wurden mittels der unter 3.3.2 beschriebenen Methode lysiert und 1 mg des Lysates

wurde mittels der NiNTA Technologie aufgereinigt. 10% des Eluates wurde in einem SDS-PA Gel aufgetrennt und koeluierende Proteine mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Durch visuellen Vergleich mit einem Eluat eines Lysates von Zellen, die mit einem pEGFP transfiziert wurden, das also kein His<sub>6</sub>-markiertes Protein enthielt, wurden Proteinbanden identifiziert, die im spezifischen Eluat vorhanden waren, aber nicht im Kontroll-Eluat. Diese Banden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden 3x mit 500 µl sterilem aqua inieciabilia gewaschen, um Substanzen aus der Silberfärbung, die eine nachfolgende Analyse stören könnten, abzutrennen. Anschließend wurden die Gelstückchen für 45 min in der Vakkumzentrifuge getrocknet. Die Identifizierung der Proteine erfolgte per Massenspektroskopie (siehe 3.5.2).

Zur Bestätigung der visuellen Auswahl der Proteinbanden konnte nach Identifizierung der Proteine die sensitivere Methode der Western-Blotanalyse angewendet werden.

### **3.5.2 Identifizierung von Proteinen – Massenspektroskopie**

Die Identifizierung von Proteinen, die mit dem His<sub>6</sub>-La-Protein koeluieren, erfolgte mittels MALDI-TOF (engl.: *matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight*). Hierzu wurden die Proteine, die sich in den ausgeschnittenen Gelbanden befanden, zunächst reduziert, methyliert und im Gel mit Trypsin verdaut. Die entstandenen Peptide wurden entsalzt und zur Massenspektroskopie eingesetzt.

Bei der Massenspektroskopie werden einzelne geladene Moleküle in einem Vakuum durch elektrische und magnetische Felder aufgetrennt. Das Peptidgemisch wird hierzu zunächst mit einem nicht-flüchtigen Lösungsmittel gemischt. Bei der Verdunstung des Lösungsmittels entsteht eine kristalline Matrix. Im Vakuum des Massenspektrometers werden die Kristalle mit einem Laserpuls bestrahlt und verdampfen. Bei der Verdampfung entstehen positiv geladene Moleküle, die massenspektroskopisch analysiert werden können. Diese geladenen Peptid-Ionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Alle Ionen fliegen in eine feldfreie Vakuum-Flugröhre mit definierter Streckenlänge, den Flugzeitanalysator (TOF). Die Ionen fliegen alle die gleiche Strecke ab und treffen auf einen Detektor. Ionen mit gleicher Ladung aber unterschiedlicher Masse bewegen sich unterschiedlich schnell, genauso wie ein Ion mit zweifacher Ladung schneller fliegt im Vergleich zu einem Ion mit nur einer Ladung. Das Peptidgemisch wird also aufgrund der unterschiedlichen Masse-/ Ladungsverhältnisse aufgetrennt. Durch die Flugzeiten kann die Masse eines Peptides genau bestimmt werden. Wenn somit das Molekulargewicht von verschiedenen Peptiden aus einem Peptidgemisch einer ausgeschnittenen Bande ermittelt wurde, ist ein eindeutiger Rückschluß auf das Protein möglich.

Die Analysen zur Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektroskopie wurden von Herrn Dr. Manfred Nimtz in der Abteilung Strukturbiologie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig durchgeführt.

### 3.5.3 Koimmunpräzipitation

In der Immunpräzipitation (IP) ist es möglich ein Protein aufgrund seiner hohen Affinität zu seinem Antikörper über die spezifische Immunkomplexbildung auszufällen. Hierzu wurden Agarosekügelchen eingesetzt, an die Protein A und Protein G gekoppelt wurden, die spezifisch an Immunglobuline binden. Die Agarosekügelchen waren außerdem mit BSA abgesättigt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Da trotzdem unspezifische Bindungen auftraten wurde das Zelllysate zunächst vorgereinigt.

Zur IP des endogenen hLa wurden 100 µg eines Zelllysates (gewonnen wie unter 3.3.2 beschrieben) mit 20 µl der Agarosesuspension in einem 1x IP-Puffer für 2 h bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. 60% des Ausgangsmaterials wurden aufbewahrt, um die Effizienz der IP beurteilen zu können. Das Reaktionsvolumen betrug 1,5 ml. Proteine, die unspezifisch an die Agarose gebunden haben, wurden zusammen mit der Agarose durch Zentrifugation für 2 min bei 1000 xg bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die IP eingesetzt. Das Pellet wurde mit 500 µl des 1x IP-Puffers für weitere 10 min bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert, um eventuell verbliebene Proteine ebenfalls in die IP zu überführen.

Beide Überstände wurden vereinigt und zusammen mit 5 µg des entsprechenden Antikörpers (entspricht 100 µl mAb anti-La SW5 IgG-Subklasse IgG2B; 25 µl poly anti-La 1982; 5 µl Kontrollantikörper IgG2A) und 20 µl frischer Agarosesuspension im 1x IP-Puffer in einem Reaktionsvolumen von 1,6 ml über Nacht bei 4°C und unter ständiger Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proteine, die zusammen mit ihrem Antikörper einen Immunkomplex gebildet haben, der an die Protein A- bzw. Protein G- gekoppelten Agarosekügelchen gebunden wurde, abzentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde für 2 min bei 1000 xg bei 4°C durchgeführt. 10% des Überstandes wurden zur Analyse der Effizienz aufbewahrt. Das Pellet wurde 3x mit 500 µl 1x IP-Puffer gewaschen, um ungebundene und unspezifisch lose gebundene Proteine zu verlieren. Nach jedem Waschschrift wurde das Pellet in 500 µl des 1x IP-Puffer für weitere 5 min bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. Abschließend wurde das Pellet in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, gevortext und für 10 min bei 95°C im Schüttler bei max. rpm aufgeköcht.

Das Pellet, sowie Ausgangsmaterial und Überstände als Kontrolle, wurden zur nachfolgenden Analyse auf ein SDS-PA Gel aufgetragen. Da Proteine, die mit hLa interagieren, zusammen mit La im Immunkomplex präzipitiert wurden, konnten nach Gelelektrophorese und Transfer auf

eine Membran die Proteine mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper im Western Blot detektiert werden.

Als Negativkontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper eingesetzt, der der Subklasse IgG2a entspricht. Dieser Antikörper gehört der gleichen Subklasse wie der mAb anti-La SW5 (IgG2B) an und stellt damit eine sehr spezifische Negativkontrolle dar.

#### **10x IP-Puffer**

100 mM Tris/HCl pH 7,4

1,5 M NaCl

30 mM MgCl<sub>2</sub>

50% (v/v) Glycerol

0,5 mM DTT

Dem 1x IP-Puffer wurden DTT in einer Endkonzentration von 5 mM und 1% (v/v) Proteaseinhibitor frisch zugesetzt.

Zur IP eines GFP-hLa Fusionproteins wurde 293T Zellen in einer Ø10-cm-Schale, wie unter **3.2.4** beschrieben, mit 6 µg pEGFP-hLa transfiziert und 24 h nach der Transfektion in 200 µl Lysispuffer lysiert. Die Zellen wurden von der Kulturschale abgeschabt und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Das Zelllysat wurde dann der IP mit mAb anti-GFP zugeführt. Ein Teil des Ausgangsmaterials wurde zur weiteren Analyse aufbewahrt. Es wurden 5 µg des Antikörpers eingesetzt. Zunächst wurden 2 mg des Lysates mit dem Antikörper für 1 h auf Eis vorinkubiert, damit sich Protein-Antikörper-Komplexe bilden können. Danach wurden 50 µl der BSA-abgesättigten Protein A-/ Protein G-gekoppelten Agarosesuspension hinzugefügt. Der Reaktionsmix inkubierte unter Rotation für 10-12 h bei 4°C. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 1000 xg für 2 min. Der Überstand wurde zur nachfolgenden Analyse aufbewahrt. Das Pellet wurde danach 2x in 1 ml Lysispuffer und 3x in 1 ml Waschpuffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift folgte eine weitere Inkubation für 10 min bei 4°C und unter Rotation. Das Pellet wurde in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, gevortext und für 10 min bei 95°C im Schüttler bei max. rpm aufgeköcht.

Die Analyse des Pellet, des Ausgangsmaterials und der Überstände erfolgt wie oben beschrieben in einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot.

<b>Lysispuffer</b>	<b>23,59 ml</b>
50 mM Tris/ HCl pH 7,4	2,5 ml 0,5 M Tris/ HCl
150 mM NaCl	0,75 ml 5 M NaCl
1% (v/v) NP-40	2,5 ml 10% (v/v) NP-40
0,5% (w/v) Deoxycholat	2,5 ml 5% (w/v) Deoxycholat
aufgefüllt mit DEPC H <sub>2</sub> O	

Zur Anwendung wurden 50 µl Proteaseinhibitor (=20%) und 1 µl 1M DTT (=1 mM) zu 949 µl Lysispuffer hinzugefügt.

<b>Waschpuffer</b>	<b>24,21 ml</b>
50 mM Tris/ HCl pH 7,4	2,5 ml 0,5 M Tris/ HCl
200 mM NaCl	1 ml 5 M NaCl
0,1% (v/v) NP-40	250 µl 10% (v/v) NP-40
0,05% (w/v) Deoxycholat	250 µl 5% (w/v) Deoxycholat
aufgefüllt mit DEPC H <sub>2</sub> O	

Zur Anwendung wurden 25 µl Proteaseinhibitor (=10%) und 1 µl 1M DTT (=1mM) zu 974 µl Waschpuffer hinzugefügt.

### 3.5.4 Säugetierzellen-2-Hybrid-System

Das Säugetierzellen-2-Hybrid System wurde zur Analyse der Interaktion zwischen zwei Proteinen in lebenden Zellen eingesetzt.

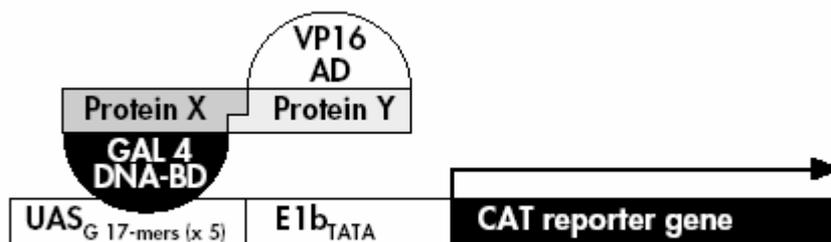
Das System basiert auf der Tatsache, daß eine DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) spezifisch an einen Promoter bindet, während eine Aktivierungsdomäne (AD) mit der Transkriptionsmaschinerie interagiert. Wenn zwei Proteine, als Fusionsprotein mit einer DNA-BD einerseits bzw. als Fusionsprotein mit einer AD andererseits, miteinander interagieren, bindet die DNA-BD an den Promoter eines Reporterplasmids. Durch die räumliche Nähe der AD zur DNA-BD wird die RNA-Polymerase II zu dem Promotor des Reportergenes dirigiert, und initiiert die Transkription des Gens, das hinter dem Promoter liegt (Abb. 7). Wenn die beiden Fusionsproteine nicht miteinander interagieren, kann die DNA-BD zwar immer noch an den Promoter binden, aber da die AD zu weit entfernt ist, kann das Reportergen nicht transkribiert werden.

Da diese Methode in eukaryotischen Zellen angewendet wird, durchlaufen die Fusionsproteine alle natürlichen Modifikationen, was die Aussagekraft im Vergleich zum Test der Interaktion von bakteriell exprimierten, gereinigten Proteinen erhöht.

Im "MATCHMARKER mammalian two hybrid-assay" wurde der Vektor pM benutzt, um ein Fusionsprotein mit einer Gal4 DNA-BD zu exprimieren. Zur Expression eines Fusionsproteins mit einer AD, die aus dem Protein VP16 des Herpes simplex Virus generiert wurde, wurde der Vektor pVP16 eingesetzt. Das Reporterplasmid pG5CAT enthielt das Chloramphenicolacetyltransferase (CAT)-Gen, welches sich hinter einer Gal4-Bindungsstelle und dem Minimalpromoter des adenoviralen E1b-Genes befindet. Die Vektorkarten sind im Anhang aufgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde die cDNA des hLa-Proteins in den Vektor pM und die cDNA des PSF in den Vektor pVP16 kloniert, um die Fusionsproteine Gal4-hLa (und verschiedene Mutanten Gal4-hLa $\Delta$ ) und VP16-PSF zu erhalten.

Es wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 60-mm-Zellkulturschalen ausgesät. Nach ca. 16 h wurde das Medium gewechselt. Die Konfluenz der Zellen betrug zu diesem Zeitpunkt ca. 40%. Zur Transfektion wurden 0,2 pmol der Plasmide für die Fusionsproteine zusammen mit 0,7 pmol des Reporterplasmides pG5CAT und 100 ng pEGFP-N1 zur Kontrolle der Transfektionseffizienz mittels der oben beschriebenen Methode der Transfektion mit Calciumphosphat eingesetzt. Nach 24 h konnte unter einem Fluoreszenzmikroskop die Expression von EGFP beobachtet werden. Das Medium wurde erneut gewechselt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen 3x mit vorgekühltem 1x PBS gewaschen und in 1 ml des mitgelieferten Lysispuffers lysiert. Die Lyse erfolgte für 30 min bei RT. Danach wurden die Zellen abgeschabt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Eine Betrachtung unter dem Lichtmikroskop zeigte, daß die Zellkerne durch den Lysispuffer nicht aufgelöst wurden. Daher schloß sich eine Sonifizierung der Extrakte für 3x 3 sec an. Die Zelllysate wurden zur Analyse der CAT-Expression in einem CAT ELISA (siehe 3.5.3.1), zur Proteinbestimmung (siehe 3.4.1) oder zur Analyse im Western Blot (siehe 3.4.4.1) eingesetzt. Wurde das Lysat nicht umgehend analysiert wurde es in einem Ethanol/ Trockeneis-Bad eingefroren und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Interaktion wurde durch das Maß der CAT-Expression analysiert (siehe 3.5.3.1).



**Abb. 7: Das Prinzip des Säugetierzellen-2-Hybrid Systems.** Die Interaktion zwischen Protein X und Protein Y resultiert in einer Expression des CAT-Genes. In der vorliegenden Arbeit entspricht Protein X hLa bzw. hLa $\Delta$  und Protein Y PSF.

### 3.5.4.1 CAT ELISA

Der CAT ELISA (engl.: CAT *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) zur Analyse einer Protein-Protein-Interaktion dient der quantitativen Analyse der CAT-Expression im "MATCHMARKER *mammalian two hybrid-assay*". Dieser Test beruht auf dem ELISA System. Auf einer Mikrotiterplatte sind Anti-CAT-Antikörper gebunden. Es wurden 200 µl des Zelllysates mit dem an die Mikrotiterplatte gebundenen Antikörper für 2 h bei 37°C inkubiert. Das Zelllysate wurde danach abgesaugt und die Platte wurde 5x mit dem mitgelieferten Waschpuffer gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit einem Digoxin-markierten Antikörper gegen CAT (anti-CAT-DIG), der an CAT bindet. Danach wurde wieder 5x mit Waschpuffer gewaschen und im nächsten Schritt für 1 h mit einem Antikörper gegen DIG inkubiert, der Peroxidase markiert ist und an DIG bindet. Es wurde wiederum 5x gewaschen und es folgte als letzter Schritt die Zugabe des Peroxidase-Substrates ABTS. Hierbei wurde das Substrat durch Peroxidase gespalten, was zu einer Farbreaktion führt (siehe Abb. 8). Die Farbreaktion wurde in einem Photometer mit einer Absorption von  $A_{405nm}$ - $A_{492nm}$  nach 5, 15, 30 und 45 min gemessen.

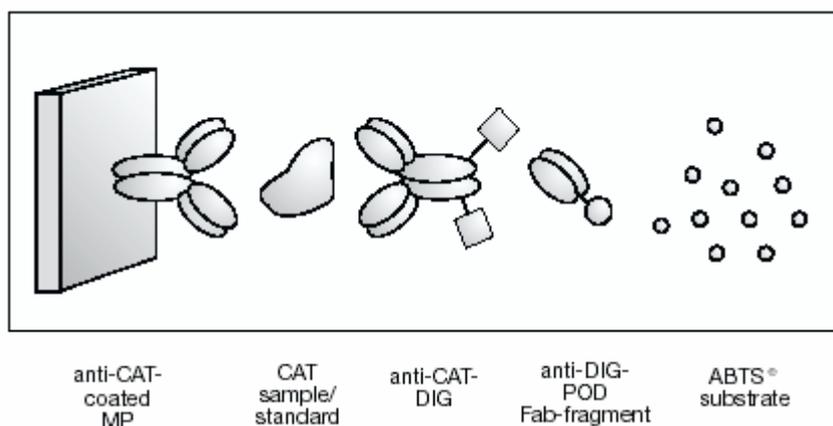


Abb. 8: Test Prinzip des CAT ELISA

Zur Auswertung wurde verschiedene Konzentrationen CAT (0,025 -1 ng) aufgetragen. Die Absorption des Substrates wurde gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen, wodurch eine Eichkurve erhalten werden konnte. Es war sicherzustellen, daß die Werte in einem linearen Bereich lagen.

Als Negativkontrollen diente die CAT Expression nach Transfektion der leeren Vektoren pM und pVP16, pG5CAT allein, bzw. nicht-transfizierter Zellen. Aus diesen Werten wurden Mittelwerte gebildet und willkürlich auf 1 gesetzt. Zur Auswertung wurde die CAT-Expression der spezifischen Proben als x-fache Erhöhung gegenüber der CAT Expression der

Negativkontrollen dargestellt. Im Anhang ist exemplarisch die Auswertung eines Experimentes dargestellt.

## **3.6 Gentechnische Methoden**

### **3.6.1 Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA**

#### **3.6.1.1 Isolierung von DNA**

Wie in 3.1.4 und 3.1.5 beschrieben, kann Plasmid-DNA in Prokaryoten eingebracht und vervielfältigt werden. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Prokaryoten erfolgte durch das Qiagen-Maxi-Präparations-Kit und das Qiagen-Mini-Präparations-Kit nach den Angaben des Herstellers. Nach der Isolierung wurde der Erfolg der Präparation im Agarosegel bewertet. Die Plasmidlösung wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **3.6.1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde der molare Extinktionskoeffizient  $E$  der Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer gemessen und in Abhängigkeit von der definierten Schichtdicke  $d$  die Nukleotidkonzentration bestimmt. Ein Adsorptionswert von  $E_{260} = 1$  bei einer Schichtdicke von  $d = 1$  cm entspricht einem Gehalt von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA oder 40  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger RNA. Zusätzlich wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen um den Proteingehalt der Probe zu bestimmen. Der Quotient aus  $E_{260}/E_{280}$  stellt einen Wert für die Reinheit der Lösung dar und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

#### **3.6.1.3 Agarosegelelektrophorese und anschließende Ethidiumbromid-Färbung zur Detektion von DNA**

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse und zur präparativen Isolierung von DNA eingesetzt, da hierbei Nukleinsäuren aufgrund der partiellen Negativladung durch das Phosphatrückgrat in einem elektrischen Feld je nach Größe aufgetrennt werden. Die Konzentration der Agarose wurde der Größe der aufzutrennenden Fragmente angepaßt und lag bei 0,5% (für DNAs mit 5 – 10 kBp), 1% (für DNAs mit 1,5 – 6 kBp) oder 2% (für DNAs mit 0,1 – 1,5 kBp). Die Größe der untersuchten DNAs wurde später durch den Vergleich mit DNA-Größenstandards ermittelt, welche zusammen mit der DNA aufgetrennt wurden.

Die Agarose wurde in TAE-Puffer gelöst, bis zum Siedepunkt erhitzt und nach kurzem Abkühlen auf ca.  $60^{\circ}\text{C}$  in die Laufkammer gegossen. Nach Aushärtung der Agarose wurden die

DNA-Proben mit  $\frac{1}{6}$  (v/v) DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgte in TAE-Puffer in einem elektrischen Feld.

Anschließend wurde das Gel aus der Laufkammer entnommen und für 5 min in eine Ethidiumbromid-Lösung gegeben. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der mit DNA interkaliert und bei Beleuchtung mit UV-Licht (254 nm oder 366 nm) fluoresziert. Nach Entfärbung im Wasserbad (~30min) erfolgte die Visualisierung der Ethidiumbromid-DNA-Komplexe durch Bestrahlung mit UV-Licht und die photographische Dokumentation.

Für eine präparative Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das Gel nach der Färbung/Entfärbung möglichst kurz (max. 15 sec) mit einer schwachen 366-nm Handlampe beleuchtet, um Schädigungen der DNA durch starke UV-Bestrahlung zu vermeiden. Während der Beleuchtung wurde kurz die Position der jeweiligen DNA im Gel markiert und die Bande anschließend bei normaler Beleuchtung mit einem Skalpell ausgeschnitten.

<b>TAE-Puffer</b>	<b>10x - 1 l</b>
0,5 M Tris	60,6 g
0,2 M CH <sub>3</sub> COONa	16,4 g
0,02 M EDTA	7,4 g

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,4 eingestellt.

#### **DNA-Ladepuffer**

1x TAE-Puffer  
0,01 (w/v) % Bromphenolblau  
40 (v/v) % Glycerin

#### **Ethidiumbromid-Lösung**

0,5 µg/ ml in H<sub>2</sub>O

### **3.6.1.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird zum Nachweis geringster Mengen an DNA eingesetzt. Die Grundlage dieser Methode ist die zyklische Wiederholung dieser drei aufeinanderfolgenden Schritte:

- Denaturierung der *template*-DNA
- Bindung der sequenzkomplementären Oligonukleotide (*primer*) an den DNA-Einzelstrang ("*annealing*")
- Kettenverlängerung des DNA-Stranges mittels einer DNA-Polymerase und eines Nukleotid-Mixes ("*elongation*")

Ein typischer 50- $\mu$ l-Reaktionsmix setzte sich wie folgt zusammen:

20 ng *template*-DNA  
1 pmol *sense* primer  
1 pmol *antisense* primer  
0,5 mM dNTP  
2,5 U Pwo-DNA-Polymerase  
1x Pwo-DNA-Polymerase Puffer

Da PSF an seinem amino-Terminus einen sehr hohen GC-Gehalt aufweist, war für die Amplifikation der Zusatz von 5 (v/v)% DMSO notwendig, da der Doppelstrang sonst nicht denaturiert werden konnte.

Die Amplifikation erfolgte in einem Robocycler nach folgendem Reaktionsprofil:

95°C 2 min	1 Zyklus
95°C 1 min	} 25 Zyklen
56°C 1 min	
72°C 2 min	
72°C 5 min	1 Zyklus

### 3.6.2 Klonierung

#### 3.6.2.1 Umklonierung einer cDNA in ein Plasmid

Für die Analyse der Interaktion zwischen hLa und PSF mußten die cDNAs aus vorhandenen Plasmiden, wie pET28b(+)-hLa oder pEGFP-PSF, in die eukaryotischen Expressionsvektoren pM und pVP16 umkloniert werden. Zu diesem Zweck wurde die gesamte jeweilige Sequenz der hLa- (Wildtyp oder mutiert) bzw. der PSF- (Wildtyp) cDNA in einer PCR aus dem vorhandenen Plasmid amplifiziert. Die dazu benutzten Oligonukleotide mußten einerseits passend sein zum 5'- und 3'-Terminus der hLa-cDNA bzw. der PSF-cDNA in den Vektoren, sowie andererseits eine Klonierung über Restriktionsenzyme in den offenen Leseraster der Zielvektoren pM bzw. pVP16 zulassen. Hierzu wurden die Oligonukleotide bereits mit terminalen

Restriktionsschnittstellen versehen, welche zu Schnittstellen im neuen Plasmid paßten. Da die Vektoren pM und pVP16 den gleichen multiplen Klonierungsbereich aufweisen, konnten für die Klonierung in diese Vektoren dieselben Oligonukleotide verwendet werden. Es wurde die hLa- und PSF- cDNA, inklusive des ATGs und des Stopcodons, in die entsprechenden Vektoren kloniert.

Für die PCR zur Klonierung der La-cDNA in pM bzw. pVP16 wurden die Oligonukleotide La 62S bzw. La 63AS verwendet, die eine *BamHI*- bzw. *HindIII*-Restriktionsschnittstelle besitzen (siehe 2.10.1). Zur Klonierung der PSF cDNA in pM bzw. pVP16 wurden die Oligonukleotide PSF 5S bzw. PSF 6AS verwendet, die eine *Sall*- bzw. *SpeI*-Restriktionsschnittstelle aufweisen (siehe 2.10.1). Schneidet man das entstandene PCR Produkt mit *SpeI*, entsteht ein Überhang, der kompatibel zu einer *XbaI*-geschnittenen Stelle im Vektor ist. So konnte PSF in die Zielvektoren eingefügt werden. Die PCR erfolgte nach dem oben beschriebenen Reaktionsprofil (siehe 3.6.1.4).

Nach der PCR konnten die Amplifikate gereinigt werden. Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers. Das Amplifikat wurde mit 30 µl H<sub>2</sub>O eluiert und im Agarosegel auf richtige Länge überprüft. Anschließend wurden das Amplifikat und der Zielvektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Das Amplifikat wurde über Nacht bei 37°C verdaut. Im Falle der Zielvektoren war ein Verdau für 2 h bei 37°C ausreichend.

Restriktionsansatz zur Klonierung von PSF in pM/ pVP16:

30 µl Amplifikat	5 µg pM / pVP16
1 µl <i>SpeI</i>	1 µl <i>XbaI</i>
1 µl <i>Sall</i>	1 µl <i>Sall</i>
<u>5 µl Puffer H</u>	<u>5 µl Puffer H</u>
ad 50 µl H <sub>2</sub> O	ad 50 µl H <sub>2</sub> O

Restriktionsansatz zur Klonierung von La in pM/ pVP16

30 µl Amplifikat	5 µg pM/ pVP16
1 µl <i>BamHI</i>	1 µl <i>BamHI</i>
1 µl <i>HindIII</i>	1 µl <i>HindIII</i>
<u>5 µl Puffer 2</u>	<u>5 µl Puffer 2</u>
ad 50 µl H <sub>2</sub> O	ad 50 µl H <sub>2</sub> O

Nach dem Verdau erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Enzyme für 10 min bei 65° C. Danach wurde die Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors durchgeführt:

- 2 µl geschnittener Zielvektor pM/ pVP16
- 2 µl *Shrimps* alkalische Phosphatase
- 1 µl alkalische Phosphatase, 10x Puffer
- 5 µl H<sub>2</sub>O

Die Dephosphorylierung erfolgte bei einer Inkubation für 1 h bei 37°C. Es schloß sich eine Hitzeinaktivierung der alkalischen Phosphatase für 15 min bei 65°C an.

Nach der Reinigung des geschnittenen, dephosphorylierten Vektors und der ebenfalls geschnittenen PCR-Amplifikate über das QIAquick PCR Purification Kit (Elution in 30 µl) schloß sich die Ligation von geschnittenem Amplifikat und geschnittenem, dephosphoryliertem Vektor mit dem Rapid-DNA-Ligation-Kit an:

- 1 µl geschnittener, dephosphorylierter Zielvektor pM/ pVP16
- 5 µl Amplifikat
- 2 µl *Dilution-buffer*
- 2 µl H<sub>2</sub>O
- 10 µl *Ligase-buffer*
- 1 µl T4 Ligase

Dieser Ansatz wurde für 30 min bei RT stengelassen und anschließend zur Amplifikation und späteren Kontrolle des Vektors in *E.coli* DH5α transformiert (siehe 3.1.4).

### 3.6.2.2 Überprüfen der Klonierung mittels "Cracking"

Das *Cracking* stellt eine schnelle, aber unsaubere Methode als Kontroll-Reaktion bei DNA-Klonierungen dar. Bei dieser Methode wird eine Vielzahl von bakteriellen Vorkulturen daraufhin überprüft, ob diese ein Plasmid von gewünschter Größe enthalten. Dazu wird zunächst aus bakteriellen Vorkulturen die Plasmid-DNA präpariert und nachfolgend in einem Agarosegel analysiert. Dabei erfolgt der Größenvergleich zu einem Plasmid mit bekannter Größe, wobei bei dieser Methode zu beachten ist, dass der hohe Zucker-Gehalt des benutzten Puffers die Laufeigenschaften von DNAs verändern kann.

Für das *Cracking* wurden 600 µl einer Vorkultur 1 min bei 20000 x g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Sediment in 60 µl *Cracking*-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, für 20 min bei 20000 xg, und 30 µl des sich bildenden

Überstandes wurden zur Elektrophorese in die Taschen eines Agarosegels geladen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Diese Methode schließt die Zellen insgesamt auf und löst die DNA heraus, sodaß auf dem Gel ebenfalls die genomische DNA der Bakterien erscheint.

<b>Cracking-Puffer</b>	<b>120 ml</b>
50 mM Tris	12 ml 0,5 M
1 (w/v)% SDS	12 ml 10 (w/v)%
2 mM EDTA	2,4 ml 0,1 M
400 mM Sucrose	16,4 g
0,01 (w/v)% Bromphenolblau	0,012 g
0,01 (w/v)% Xylencyanol	0,012 g
100 µg/ml RNase A	120 µl 100 mg/ml; hitzeinaktiviert 10 min 95°C

### 3.6.2.3 Überprüfen der Klonierung mittels PCR

Eine weitere Methode zum Test einer erfolgreichen Klonierung ist die PCR. Die durch Aufreinigung mit dem Qiagen-Mini-Präparationskit gewonnene DNA (siehe 3.6.1.1) diente als *template*. Die einklonierte cDNA wird hier wieder aus dem Plasmid amplifiziert. Durch die Wahl spezifischer *primer*, die bereits zur Amplifikation der hLa- und PSF-cDNA zur Umklonierung eingesetzt wurden (siehe 3.6.2.1), konnte das Vorhandensein der cDNAs im Plasmid verifiziert werden.

Die PCR erfolgte nach dem oben beschriebenen Reaktionsprofil (siehe 3.6.1.4). Die Amplifikate wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Vergleich mit einem Größenstandard zeigte die erfolgreiche Klonierung.

### 3.6.3.4 DNA-Sequenzierung

Für den Erfolg der Klonierung war es nicht nur wichtig, ob die cDNA tatsächlich im Plasmid enthalten ist, was man mittels der PCR bereits zeigen kann, sondern von entscheidender Bedeutung, daß es zu keiner Verschiebung des Leserasters oder zu zufälligen Mutationen im Plasmid kam. Eine Sequenzierung der Klonierungsstellen war somit essentiell.

Die Methode beruht auf dem DNA-Kettenabbruch in einer PCR nach Sanger et al. (111). Es handelt sich um eine Komplementärstrangsynthese mit gezielter statistischer Unterbrechung, bei der zu dem Gemisch normaler dNTPs Didesoxynukleotide (ddNTPs; ohne 3'-Hydroxygruppe) zugegeben werden, sodaß bei Einbau eines ddNTPs die wachsende DNA-Kette abbricht. Die Detektion erfolgt über Fluoreszenz-markierte Nukleotide. Der Laser des Sequenziergeräts

detektiert die in einem Gel aufgetrennten DNA Fragmente anhand der eingebauten, terminal unterschiedlich markierten ddNTPs und somit die Sequenz. Diese Informationen werden an die angeschlossene Software weitergegeben und können als Ausdrücke wiedergegeben werden.

Zur Sequenzierung wurde der ABI PRISM BigDye-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit Version 1.1 der Firma PE Applied Biosystems verwendet. In diesem Kit sind die Fluoreszenz-markierten ddNTs (A- markiert mit Dichloro[R6G], C- markiert mit Dichloro[ROX], G- markiert mit Dichloro[R110] und T- markiert mit Dichloro[TAMRA]), dNTPs (dATP, dCTP, dITP und dUTP), die Taq-Polymerase und der Reaktionspuffer bereits vorgelegt.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µg plasmid  
2 µl Primer [100 pmol]  
4 µl BigDye Mix  
ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Das Reaktionsprofil der Sequenzier-PCR war folgendes:

96°C	2 min 30 sec	1 Zyklus	
96°C	20 sec	} 30 Zyklen	
50°C	10 sec		
60°C	4 min		

Anschließend wurden die PCR Produkte gefällt. Hierzu wurde der Ansatz mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt. Es wurden 5 µl 3 M CH<sub>3</sub>COO-Na pH 4,8 und 125 µl Ethanol zugesetzt. Das Gemisch wurde bei 20000x g für 30 min bei RT zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 300 µl 70 (v/v)% Ethanol gewaschen. Hierbei wurde bei 20000x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und lagerte bis zur Analyse bei -20°C im Dunkeln.

Die Analyse erfolgte außer Haus am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Eppendorf.

### 3.7 Versuche mit RNA

#### 3.7.1 Vektoren für *in vitro* Transkriptionen und die Synthese der Matrizen DNA

In den verschiedenen Versuchen wurden RNA Moleküle verwendet, welche durch *in vitro* Transkription hergestellt wurden. Die Matrizen für die *in vitro* Transkription wurden durch PCR

gewonnen. Damit die PCR-Produkte zur *in vitro* Transkription eingesetzt werden konnten, mußten sie einen T7 RNA-Polymerase-Promotor beinhalten. Dieser wurde über eines der Oligonukleotide, welches für die PCR benutzt wurde, eingeführt.

Es wurden folgende Matrizen für die *in vitro* Transkription hergestellt:

HBV-RNA.B: Als Matrize für die PCR Amplifikation der Region nt 1243-1333 der HBV-RNA wurden das Plasmid pCHT-HBV-WT (siehe Anhang) und folgende Oligonukleotide benutzt: TH9T7S und TH13BAS

Fragment der humanen  $\beta$ -Aktin RNA: Als Matrize für die PCR Amplifikation der Region der nt 27-140 der Maus- $\beta$ -Aktin RNA wurden ein Plasmid, welches ein Fragment des  $\beta$ -Aktin-Gens der Maus kodiert, durch T. Heise zur Verfügung gestellt (siehe Anhang), und die Oligonukleotide THACT2-T7 und THACT2-AS verwendet.

Alle PCR-Produkte, welche als Matrize in einer *in vitro* Transkription eingesetzt werden, weisen einen über die Oligonukleotide eingefügten T7 Promotor auf. Die PCR-Synthese des *templates* erfolgte mit den entsprechenden Vektoren und Oligonukleotiden nach folgendem Protokoll:

Reaktionsansatz:

20 ng Matrizen-DNA  
2  $\mu$ l je Oligonukleotid (10 pmol/ $\mu$ l)  
1,5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM)  
5  $\mu$ l Taq-DNA-Polymerase 10x Puffer  
1  $\mu$ l Taq-DNA-Polymerase (=10 U)  
ad 50  $\mu$ l, mit Mineralöl überschichten

Reaktionsprofil:

95°C	5 min	} 35 Zyklen
95°C	1 min	
56°C	1 min	
72°C	2 min	

1 Zyklus

Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf einem präparativen 2% Agarosegel aufgetrennt, das Amplifikat ausgeschnitten, mit dem QIAquick Gel Extraction gereinigt (Elution in 30  $\mu$ l) und konnte nun zur *in vitro* Transkription eingesetzt werden.

### 3.7.2 Synthese von RNA-Sonden durch *in vitro* Transkription

RNAs wurden durch *in vitro* Transkription nach folgendem Protokoll synthetisiert, wobei das RiboProbe In Vitro Transkription System der Firma Promega benutzt wurde und zwischen radioaktiven und nicht-radioaktiven Protokollen unterschieden wird:

Radioaktive Synthese:

- 4 µl 5x T3-/T7-Transkriptionspuffer
- 1 µl 100 mM DTT
- 20 U RNasin
- 2,5 µl rNTPs (je 2,5 mM rATP, rGTP und rCTP)
- 0,5 µl 0,01 mM UTP
- 2 µl template
- 7 µl [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP
- 15 U T7-RNA-Polymerase
- ad 20 µl Nuklease-freies H<sub>2</sub>O

Nicht-radioaktive Synthese: dieser Ansatz enthielt alle oben genannten Zugaben, außer dem radioaktiven rUTP; zudem wurde ein rNTP-Mix benutzt, welcher je 2,5 mM rATP, rUTP, rCTP und rGTP enthielt.

Die Synthese erfolgte für 2 h bei 37° C. Nach einem DNase Verdau (1 U, 15 min 37°C) und dem Auffüllen des Volumens auf 50 µl mit 10 mM Tris/HCl pH 7,4, erfolgte die Reinigung der Transkripte mittels *G25-spin columns* nach Angaben des Herstellers Amersham Pharmacia.

Um die Synthese der radioaktiven RNAs zu quantifizieren, wurde entweder direkt die Radioaktivität von 2 µl der Probe über Cerenkov-Counts mit einem Scintillations-Zähler bestimmt, oder die Berechnung der Molarität der Sonde erfolgte nach dem sich anschließenden Protokoll.

### 3.7.3 Berechnung der Konzentration der *in vitro* transkribierten, radioaktiven RNA-Sonde

Um den Einbau der radioaktiv markierten UTPs sowie die RNA-Synthese quantifizieren zu können, wurde vor und nach der Abtrennung der freien Nukleotide durch die *G25-spin columns* (siehe 3.7.2) je 2 µl aus dem Transkriptionsansatz entnommen und 1:50 mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt. Von jenem Aliquot vor der Säulenreinigung wurden zur Ermittlung der Gesamt-cpm (*counts per minute*: Zerfälle pro Minute) 5 µl der Verdünnung zu 3 ml Scintillations-Cocktail

gegeben. Aus der zweiten Probe wurden zur Bestimmung der mit TCA präzipitierbaren cpm 5  $\mu$ l der Verdünnung auf ein GF/C-Rundfilter aufgetragen, dieser etwa 10 min bei RT getrocknet und anschließend für 15 min bei 4° C in 25 ml eiskalter TCA-Lösung inkubiert, um ggf. noch vorhandene freie Nukleotide zu fällen. Nach kurzem Abspülen des Filterpapiers mit 70% Ethanol und Trocknen für 10 min bei RT wurde dies zu 3 ml Scintillations-Cocktail in ein Scintillations-Röhrchen überführt. Die Bestimmung der Radioaktivität in beiden Proben erfolgte mit einem Scintillations-Zähler für 60 sec. Anschließend erfolgte die Berechnung der synthetisierten RNA Menge anhand der gemessenen cpm-Werte:

Die spezifische Radioaktivität der synthetisierten RNA wurde nach folgender Formel berechnet:

$$(1) \quad (\text{Gesamt-cpm im Ansatz}) \div (\text{ng UTP im Ansatz} \times 4) = \text{cpm} / \text{ng RNA}$$

Hierbei wurde von einer molekularen Masse von 350 pro Nukleotid (nt) sowie einem Gehalt von 25% UTP je RNA-Molekül ausgegangen. Die im Säuleneluat enthaltene RNA-Konzentration wurde basierend auf der spezifischen Radioaktivität aus den gemessenen fällbaren TCA-cpm ermittelt:

$$(2) \quad (\text{TCA-cpm} / \mu\text{l Ansatz}) \div (\text{cpm} / \text{ng RNA}) = \text{ng RNA} / \mu\text{l}$$

Anhand der Länge der synthetisierten RNAs und der nach oben beschriebener Formel errechneten Menge an Synthese konnte die Molarität der Sonde berechnet werden:

$$(3) \quad c [\text{RNA}] \text{ in pmol} / \mu\text{l} = ((\text{ng RNA} / \mu\text{l}) \times 1000) \div (\text{Anzahl nt} \times 350)$$

Im Anhang ist ein Beispiel einer solchen Kalkulation aufgeführt.

#### **TCA-Lösung**

10 (w/v)% TCA

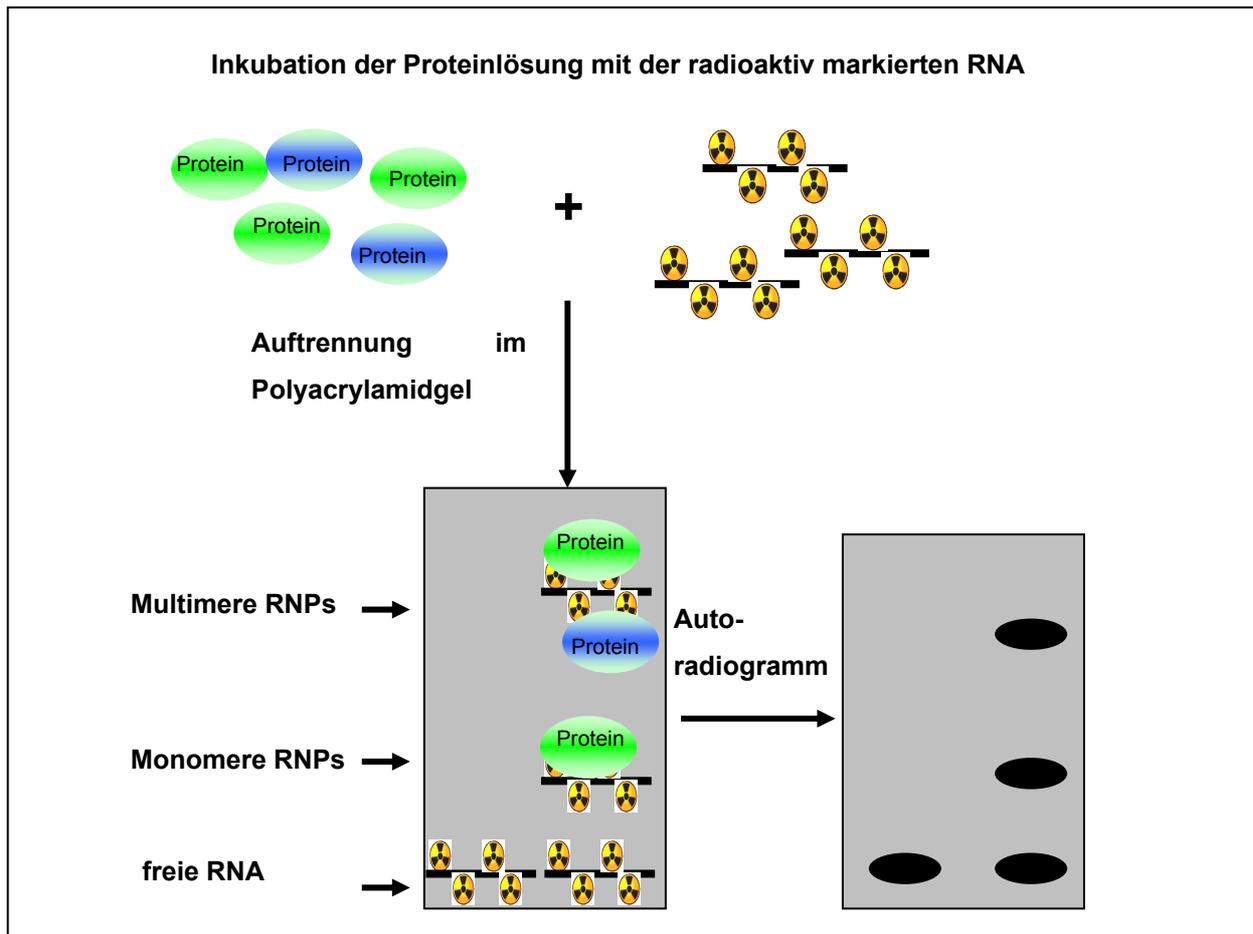
1 (w/v)%  $\text{Na}_4\text{O}_7\text{P}_2$

### **3.7.4 EMSA – electrophoretic mobility shift assay**

Der EMSA erlaubt die Bestimmung einer RNA-Protein-Wechselwirkung unter nativen Bedingungen. Zu diesem Zweck wurden eine radioaktiv markierte, *in vitro* synthetisierte RNA und das Protein La bzw. das Protein PSF unter optimierten Pufferbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Protein-RNA-Komplexe unter nativen Bedingungen in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zudem wurde auf einer Spur des Gels ein Aliquot der nicht mit La bzw. PSF inkubierten RNA aufgetragen, und so die Position der ungebundenen RNA bestimmt. Bei der Bindung des Proteins an die RNA bildeten sich Komplexe, die aufgrund ihrer gegenüber der ungebundenen RNA erhöhten Masse weniger weit im elektrischen Feld

aufgetrennt wurden. Somit zeigte diese Methode nicht nur, ob sich RNA-Protein-Komplexe ausbildeten, sondern auch ob diese z.B. in der Anzahl variierten.

Nach einer Auftrennung der sich bildenden Komplexe im elektrischen Feld wird das Gel getrocknet und es erfolgt die Exposition eines Röntgenfilms oder einer Phosphorimager-Bildplatte zur Visualisierung und ggf. zur Quantifizierung der Signale.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der Analyse einer RNA-Protein-Interaktion im EMSA (RNP = Ribonukleoproteinkomplex)

Die Standard-Reaktion wurde in einem Volumen von 40  $\mu$ l mit 200 ng NiNTA-gereinigtem hLa bzw. 400 ng NiNTA-gereinigtem PSF (wenn nicht anders angegeben) und je 10 fmol (wenn nicht anders angegeben) radioaktiv-markierter, *in vitro* transkribierter HBV-RNA.B durchgeführt. Die RNA wurde zunächst für 10 min bei 76° C in einem Endvolumen von 20  $\mu$ l (für La optimierte Bedingungen) bzw. 30  $\mu$ l (für PSF optimierte Bedingungen) im jeweiligen Bindungspuffer denaturiert und durch langsames Abkühlen auf RT renaturiert. Zeitgleich wurde hLa in einem Endvolumen von 20  $\mu$ l im Bindungspuffer, bzw. PSF in einem Endvolumen von 10  $\mu$ l in DEPC-H<sub>2</sub>O vorgelegt. Anschließend wurden die RNA und das Protein zusammengefügt, gemischt und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5  $\mu$ l

EMSA-Ladepuffer erfolgte die Auftrennung der Proben in einem 18 x 18 cm großen, nativen 8% Polyacrylamidgel für 4 h mit 180 V. Das Gel hatte zuvor einen Vorlauf mit 240 V für 1h in 1 x TBE-Puffer.

Anschließend wurde das Gel 1,5 h bei 80° C auf Whatman-Papier mit einem Geltrockner getrocknet. Die Auswertung der Signale erfolgte über die Exposition eines Röntgenfilms oder mittels eines FujiX-Bas 2000 Phosphorimager Systems.

Für Untersuchungen zur Spezifität der La- bzw. PSF-Bindung an HBV-RNA.B wurde das Protein für 5 min mit den angegebenen Mengen nicht-radioaktiv markierter Kompetitor-RNAs inkubiert, bevor die radioaktiv markierte HBV-RNA.B und die übrigen Puffersubstanzen zugegeben und der EMSA wie oben beschrieben durchgeführt wurde.

#### **EMSA-Bindungspuffer (optimiert für Bindung von La an HBV-RNA.B)**

	40 µl
2,5 mM Tris	7,6 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,4
100 mM NaCl	2 µl 2M
0,5 mM EDTA	0,4 µl 50 mM
0,5 (v/v)% NP-40	2 µl 10 (v/v)% NP-40

#### **EMSA-Bindungspuffer (optimiert für Bindung von PSF an HBV-RNA.B)**

	40 µl
12 mM Tris	2,4 µl 0,2 M Tris/HCl pH 7,5
60 mM KCl	0,6 µl 4M
2 mM MgCl <sub>2</sub>	1,6 µl 50 mM
0,12 mM EDTA	0,96 µl 5 mM EDTA
1 mM ATP	0,4 µl 100 mM
0,8 mM DTT	0,32 µl 100 mM
3 (v/v)% Glycerin	1,2 µl

#### **EMSA-Ladepuffer**

10 (v/v)% Glycerin
0,01 (w/v)% Bromphenolblau

---

<b>natives Polyacrylamidgel</b>	<b>100 ml</b>
8% Acrylamid	26,6 ml Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
1x TBE	2,5 ml 40x TBE
0,025 (w/v)% APS	250 $\mu$ l 10 (w/v)% APS
0,025 (v/v)% TEMED	25 $\mu$ l
<b>40x TBE</b>	<b>400 ml</b>
1,8 M Tris	87,2 g
1,8 M H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	44,51 g
40 mM EDTA	5,95 g

Der pH-Wert sollte bei 8,5 liegen.

#### 3.7.4.1 Auswertung von EMSAs mittels Phosphorimager

Nach Trocknen des Gels zur Analyse einer RNA-Protein-Interaktion im EMSA wurde das Gel mit einer Phosphorimager Bildplatte bedeckt. Die Expositionszeit schwankte zwischen 10 min und 24 h. Durch die Interaktion mit einer radioaktiv markierten RNA kann der Ribonukleoproteinkomplex und die ungebundene RNA auf dieser Platte detektiert werden. Die quantitative Analyse der Signale erfolgte am Phosphorimager. Die exponierte Bildplatte wurde eingelesen und mit dem Programm TINA 2.09 ausgewertet. Je länger die Bildplatte dabei dem radioaktiven Gel ausgesetzt war, desto besser war eine Unterscheidung zwischen allgemeinen Hintergrundsignalen und den tatsächlichen radioaktiven Banden möglich. Für die Auswertung wurde die absolute Signalstärke (in Pixel pro mm<sup>2</sup> einer ausgewählten Flächenregion) des Hintergrundes in jeder Bahn des Gels ermittelt und von der Signalstärke der jeweiligen RNA-Protein-Komplexe subtrahiert.

Für Wettbewerbsanalysen wurde die absolute Signalstärke in eine relative umgewandelt, indem die Signalstärke einer unkompetierten Probe auf demselben Gel als Wert für 100% gesetzt wurde und die Signalstärken der übrigen Banden in relative Verhältnisse zu der unkompetierten Probe gesetzt wurden.

#### 3.7.4.2 Auswertung von EMSAs mittels Autoradiogramm

EMSAs konnten ebenfalls im Autoradiogramm ausgewertet werden. Hierzu wurde ein Röntgenfilm auf das getrocknete Gel aufgelegt. Anschließend wurde der Röntgenfilm in einer Filmentwicklungsmaschine entwickelt.

### 3.7.5 Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Extraktion der gesamten RNA aus eukaryotischen Zellen wurde grundsätzlich das TriPure-Isolation-Reagent benutzt und nach den Angaben des Herstellers angewendet. Die gesamte Ausbeute an RNA betrug beispielsweise für HeLa-Zellen (dicht bewachsene, 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche) bis zu 800 µg.

### 3.7.6 Ein-Schritt RT-PCR

Zum Nachweis, ob eine Überexpression von PSF einen Einfluß auf das Spleißen der prägenomische RNA des HBV hat, wurde eine RT-PCR (Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion) mit dem *Titan One Tube RT-PCR System* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde aus Huh7 Zellen isoliert, die entweder mit pSM2 und pEGFP-N1, oder mit pSM2 und pEGFP-PSF transfiziert wurden. Es wurden 1 µg Total-RNA (siehe 3.7.5) eingesetzt.

Für die reverse Transkription wurde das Reaktionsgemisch für 30 min bei 50°C im Thermocycler inkubiert. Es folgte die PCR nach dem folgenden Reaktionsprofil:

95°C	1 min 30 sec	1 Zyklus
95°C	30 sec	} 40 Zyklen
58°C	45 sec	
68°C	1 min	
68°C	10 min	1 Zyklus

Um eine semiquantitative Aussage über die Zeit treffen zu können, wurden nach Zyklus 20, 25, 30 und 40 Aliquots entnommen.

Durch die spezifischen *primer* P1, P2 und P3 (siehe 2.10.2) wurden Amplifikate bestimmter Länge hergestellt. Durch die Größe des Produktes konnte bestimmt werden, welche Form der prägenomischen RNA amplifiziert wurde. Zur Analyse eines Einflusses auf das Spleißen wurden die PCR Produkte in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach Färben in einem Ethidiumbromidbad konnte die DNA detektiert werden. Zur Auswertung wurde das Verhältnis von gespleißter RNA (Produkt 773 nt) zu nicht gespleißter RNA (Produkt 191 nt) bestimmt.

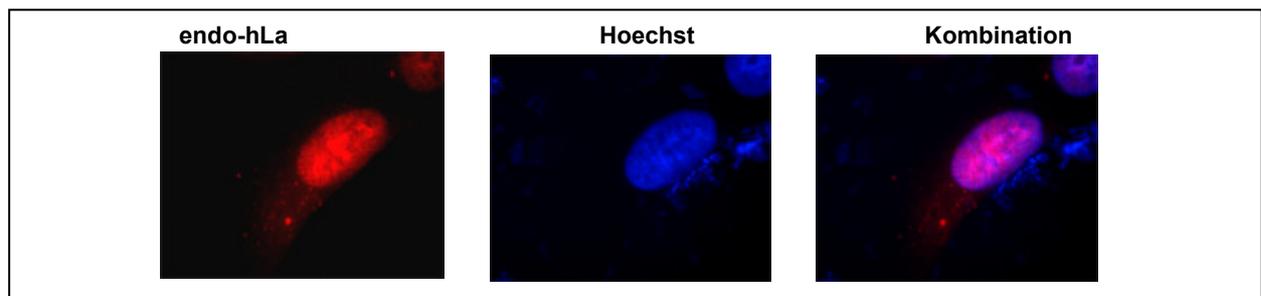
## 4 Ergebnisse

Im HBV transgenen Mausmodell wurde gezeigt, daß nach es nach Injektion von HBsAg-spezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten zu einem durch Zytokine vermittelten, nicht-zytolytischen Abbau der viralen Genprodukte kommt (127). Im Rahmen der Untersuchungen, wie Zytokine zu einer Eliminierung des Virus in der Zelle führen, ohne dabei die Zelle zu zerstören, konnte in UV-RNA-Protein *Crosslink*-Experimenten mit Kernextrakten der Mausleber gezeigt werden, daß das La-Protein spezifisch an HBV-RNA bindet und diese hierdurch wahrscheinlich vor einem Abbau durch RNasen geschützt wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Serin/Threonin-Phosphorylierung von Proteinen in Kernextrakten die Bindung von La an die HBV-RNA beeinflusst ((56), (58)). Da die Phosphorylierung von rekombinant hergestelltem humanem La-Protein nicht den gleichen Effekt hat (62), ist es wahrscheinlich, daß weitere zelluläre Proteine die Spezifität der Bindung des La-Proteins an die HBV-RNA modulieren. Um diese Annahme experimentell prüfen zu können, war das Hauptziel der vorliegenden Arbeit die Identifizierung von Proteinen, die mit dem humanen La-Protein interagieren und möglicherweise die Bindung an die HBV-RNA modulieren.

Zur Identifizierung von hLa-Protein-Interaktionspartnern wurden in einem ersten Schritt His<sub>6</sub>-markiertes hLa-Protein und daran gebundene Proteine affinitätschromatographisch angereichert und nach Elution der Interaktionspartner diese massenspektroskopisch analysiert. Ob es sich bei den so identifizierten Proteinen wirklich um Proteine handelt, die *in vivo* an das hLa-Protein binden, wurde in weiteren unabhängigen experimentellen Strategien, wie durch Koimmunpräzipitation der Proteinkomplexe mittels geeigneter Antikörper, durch Analyse im Säugetierzellen-2-Hybrid-System, sowie durch die Charakterisierung der intrazellulären Lokalisierung (in der Hoffnung auf Kolo-kalisierung) geprüft. Des weiteren sollte nach Identifizierung der hLa-Interaktionspartner geprüft werden, ob diese abhängig von der Bindung an das La-Protein oder unabhängig davon in den Lebenszyklus des Hepatitis B Virus eingreifen.

### 4.1 Verteilung des hLa-Proteins in zytoplasmatischen und nukleären Kompartimenten

Wie bereits aus der Literatur bekannt (siehe 1.3) und hier in Abb. 10 gezeigt, ist das endogene hLa-Protein (endo-hLa) beim Nachweis durch Immunfluoreszenzmikroskopie hauptsächlich im Zellkern lokalisiert.

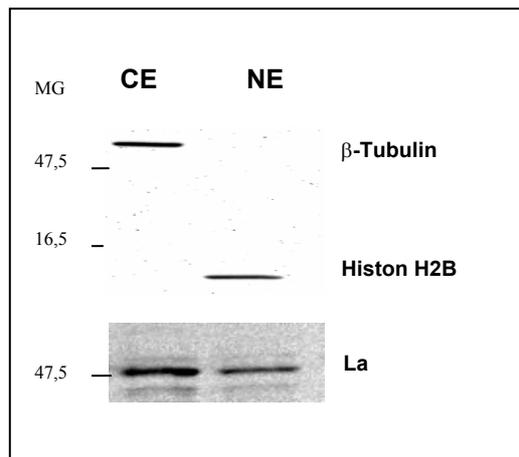


**Abb. 10: Das endogene hLa-Protein ist vorwiegend im Zellkern lokalisiert.** Nachweis des endogenen hLa in HeLa Zellen durch den mAb anti-La 3B9 (Verdünnung 1:500). endo-La: endogenes La; Hoechst färbt spezifisch die DNA und wurde als Zellkernmarker eingesetzt. Die "Kombination" zeigt eine Überlagerung der La-Signale und der Hoechst-Färbung. Vergrößerung 100x

Aufgrund der Assoziation des La-Proteins mit verschiedenen RNAs und der unterschiedlichen Lokalisierung der La-RNPs werden dem La-Protein unterschiedliche Funktionen zugeschrieben (siehe 1.3). Da eine spezifische Interaktion zwischen dem Maus La-Protein (mLa) und der HBV-RNA Bindung in Leberzellkernextrakten gezeigt wurde und es in dieser Arbeit vor allem um die Suche nach mit dem La-Protein assoziierten Proteinen ging, die mit der Stabilität oder Degradation der HBV-RNA im Zusammenhang stehen, wurden zunächst das Zytoplasma und die Kerne der Zellen separiert, diese Technik optimiert, und die Fraktionen bezüglich Menge an La-Protein analysiert.

Um Proteine zu identifizieren, die mit dem hLa-Protein im Zytoplasma bzw. Kern interagieren und somit die Funktion des La-Proteins in dem jeweiligen Kompartiment möglicherweise beeinflussen, wurde ein Zellfraktionierungsprotokoll etabliert und somit eine zytoplasmatische und eine nukleäre Proteinfraction gewonnen. Die "Reinheit" der Fraktionierung wurde durch den Nachweis spezifischer zytoplasmatischer bzw. nukleärer Proteine kontrolliert. Dazu wurden äquivalente Proteinmengen in einer SDS PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blotanalyse mit spezifischen Antikörpern analysiert.

Hierbei wurde das kernständige Protein Histon H2B nur in der Kernfraktionen (NE) nachgewiesen und das zytoplasmatische Protein  $\beta$ -Tubulin (CE) nur im Zytoplasma (siehe Abb. 11). Die Western-Blotanalyse mit einem monoklonalen Antikörper SW5 gegen das humane La-Protein zeigte allerdings, daß La vorwiegend in der Zytoplasma- und weniger in der Kernfraktion vorhanden war. Daraus ist zu schließen, daß das sehr mobile La-Protein (63) während der Kern-Zytoplasma-Separation zum großen Teil aus dem Zellkern austritt, während das Chromatin assoziierte Protein H2B im Kern verbleibt. Die hier gefundene Diskrepanz zwischen vorwiegend oder ausschließlicher nukleärer Lokalisierung des La-Proteins im Zellkern beim Nachweis durch Immunfluoreszenzmikroskopie und dem Western-Blot-Nachweis der größten Menge des La-Proteins im Zytoplasma nach einer Fraktionierung ist im Einklang mit Daten aus der Literatur (101).



**Abb. 11: Nachweis des hLa-Proteins in zytoplasmatischer und nukleärer Fraktion:** Western -Blotanalyse mit Antikörpern gegen das La-Protein (monoklonaler Antikörper (mAb) SW5; Verdünnung 1:500), Histone H2B (polyklonaler Antikörper (poly), Verdünnung 1:500) und  $\beta$ -Tubulin (polyklonaler Antikörper (poly), Verdünnung 1:1000). Es wurden jeweils 10  $\mu$ g des zytoplasmatischen (CE) und des nukleären Extrakts (NE) analysiert. Die Proteine wurden in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran transferiert. Die Membran wurde mehrfach verwendet. Molekulargewicht MG in Kilodalton

Trotz dieser Beobachtung, daß ein Großteil des hLa-Proteins aus dem Zellkern austritt, wurden die Lysate in weiterführenden Koelutionsexperimenten eingesetzt. Es wird davon ausgegangen, daß das noch in Kernextrakten vorhandene hLa-Protein möglicherweise durch eine Interaktion mit einem kernständigen Protein im Zellkern zurückgehalten wird. Hiermit hätte man eine Separation von sehr mobilem, nicht-gebundenem hLa-Protein im Zytoplasma und hLa-Protein-, bzw. hLa-RNA-Komplexen im Zellkern erreicht.

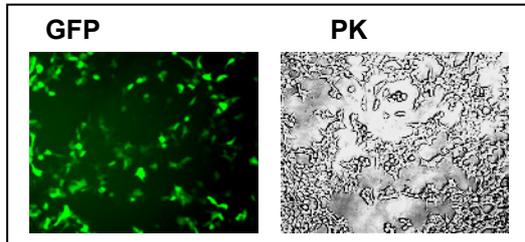
## 4.2 Aufreinigung von His<sub>6</sub>-hLa aus Eukaryoten und Koelution interagierender Proteine

Zur Identifizierung von Proteinen, die mit dem humanen La-Protein interagieren, wurde zunächst die Methode der Koelution (siehe 3.3.2) gewählt. Hierfür wurden 293T-Zellen mit einem eukaryotischen Vektor transfiziert, von dem das mit einer 6xHis-Wiederholung markierte His<sub>6</sub>-hLa Protein exprimiert wurde. Über die Affinität der Histidine zu Nickel-NTA sollte das rekombinante hLa Protein zusammen mit Interaktionspartnern angereichert werden.

### 4.2.1 Aufreinigung von His<sub>6</sub>-hLa aus eukaryotischen Zellen

Das His<sub>6</sub>-markierte hLa-Protein wurde vom eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA4-HisMAX-TOPO-La in 293T-Zellen exprimiert. Es konnte durch Western-Blotanalysen gezeigt werden, daß His<sub>6</sub>-La in diesen Zellen exprimiert wurde (siehe Abb. 13, Spur 1). Um abzuschätzen, wieviele Zellen mit pcDNA4-HisMAX-TOPO-hLa transfiziert wurden, wurden parallel Zellen mit dem Plasmid pEGFP-N1 transfiziert, von dem das GFP Protein exprimiert wird. Die Zellen, die mit pEGFP-N1 transfiziert wurden, wurden gleich behandelt wie Zellen, die mit pcDNA-HisMAX-TOPO-hLa transfiziert wurden. Die Proteinfractionen die von den pEGFP-N1 transfizierten Zellen präpariert wurden, dienten außerdem zur Negativkontrolle in den anschließenden Koelutionsexperimenten.

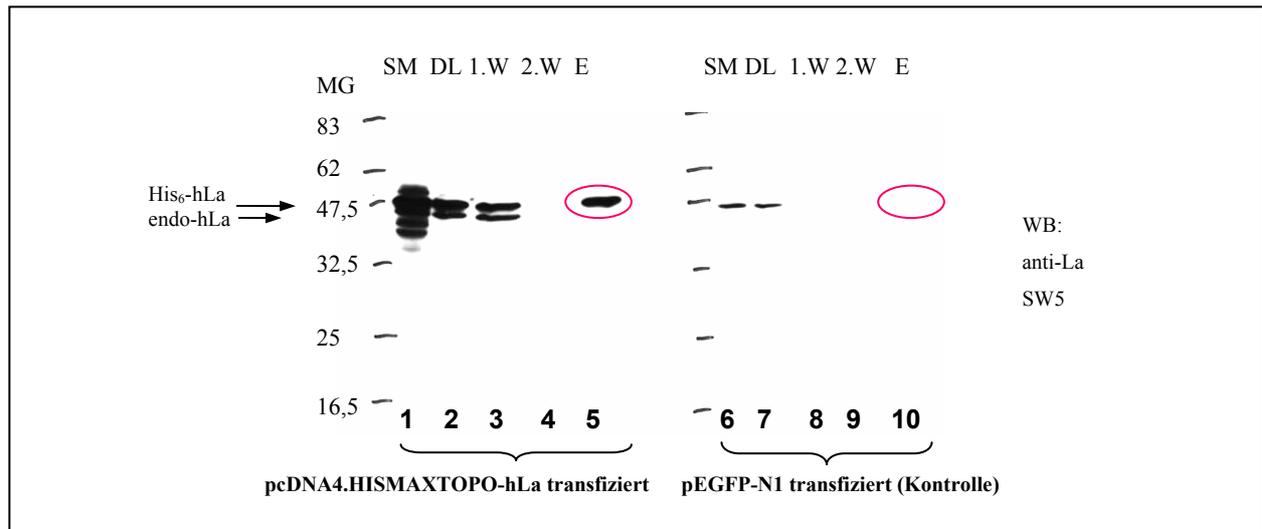
Das Auszählen der GFP-positiven Zellen unter dem Mikroskop zeigte, daß ca. 70 % der Zellen EGFP-N1 exprimierten (siehe Abb. 12). Die entspricht einer Transfektionseffizienz von ca. 70% und man kann davon ausgehen, daß eine ähnliche Transfektionseffizienz mit pcDNA4-HisMAX-TOPO-hLa erreicht wurde.



**Abb. 12: GFP-Expression in 293T-Zellen zur Transfektionskontrolle.** Der Vergleich von GFP-exprimierenden Zellen und dem Phasenkontrast (PK) weist darauf hin, daß eine Transfektionseffizienz von ca. 70% erreicht wurde.

Am Tag 2 nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, Zellextrakte hergestellt und über NiNTA-*spin columns* aufgereinigt (siehe 3.3.2). Zur Abschätzung der Menge an exprimiertem His<sub>6</sub>-hLa-Protein und zur Dokumentation der Reinigung dieses Proteins, wurde das Ausgangsmaterial sowie die Proteine der Fraktionen der verschiedenen Schritte der Reinigung durch Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und im Western Blot analysiert.

In Abbildung 13, Spur 1 ist gezeigt, daß His<sub>6</sub>-hLa im Gesamtextrakt der transfizierten Zellen vorhanden ist. Während in der Spur 1 sowohl das endogene hLa (endo-hLa) als auch das His<sub>6</sub>-hLa sichtbar sind, wird deutlich, daß während der Aufreinigung das endogene hLa-Protein vollständig verloren geht (Abb. 13, Spur 1,2 und 3 im Vergleich zu Spur 5). Im Eluat ist ausschließlich das His<sub>6</sub>-markierte hLa-Protein nachweisbar. Dieses wurde selbst unter den gewählten, hoch-stringenten Pufferbedingungen von 1 M NaCl im Waschpuffer nicht von der Affinitätsmatrix abgelöst (Abb. 13, Spur 5). Somit konnte gezeigt werden, daß die Affinitätsreinigung von His<sub>6</sub>-hLa aus eukaryotischen Zellen möglich war. Die Spezifität der Aufreinigung wird auch bei Betrachtung der Reinigungsschritte mit Zellextrakten sichtbar, die kein His-markiertes Protein exprimieren. Auch hier war das endogene hLa-Protein nicht mehr im Eluat nachweisbar (Abb. 13, Spur 10).



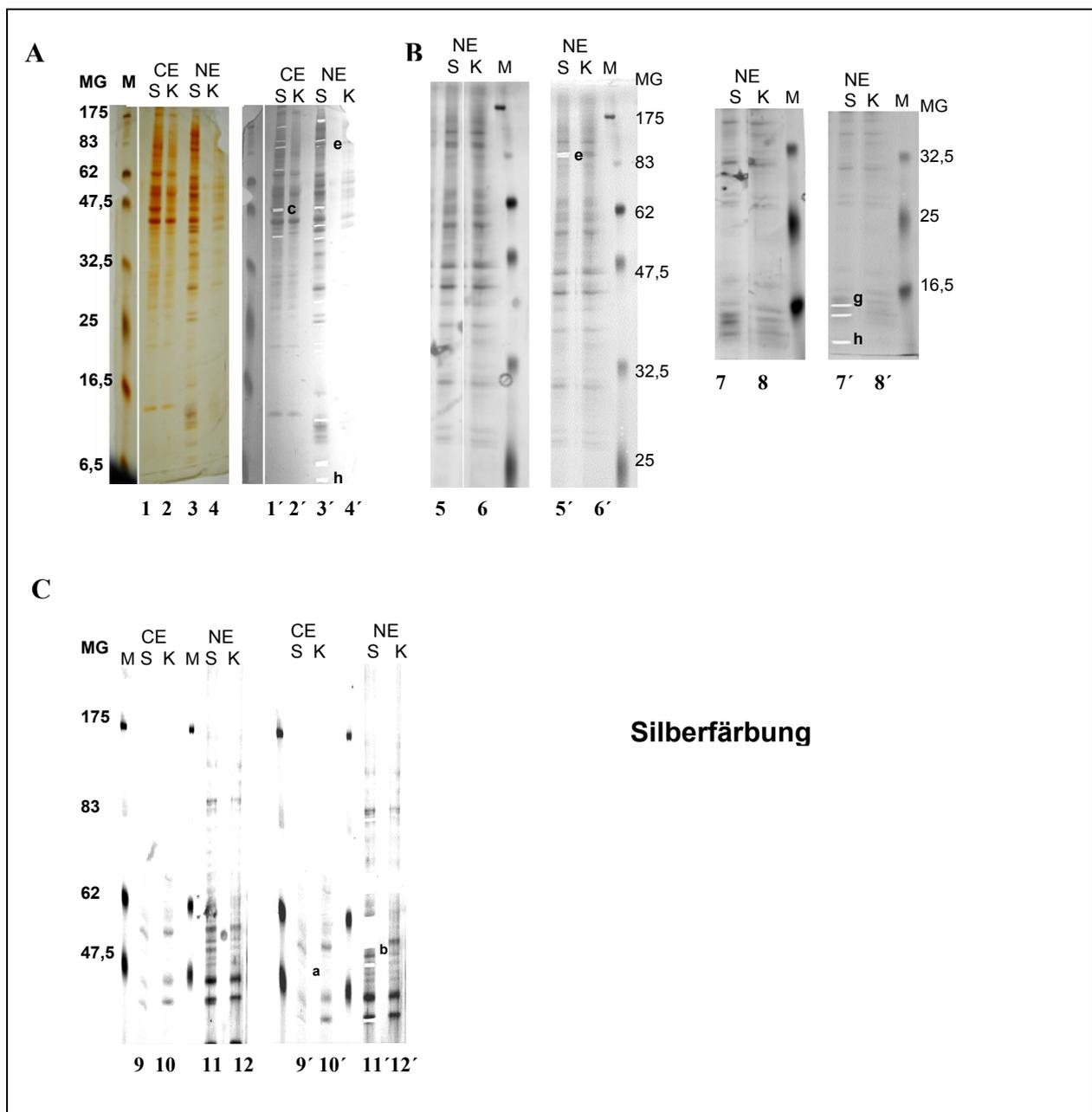
**Abb. 13: Western-Blotanalyse zum Test der Affinitätsreinigung von His<sub>6</sub>-hLa:** Spur 1: 60 µg Startmaterial (SM) = nukleärer 293T-Zellextrakt; Spur 2: 10 (v/v)% Durchlauf (DL); Spur 3: 13,3 (v/v)% erster Waschschrift (1.W); Spur 4: 13,3 (v/v)% zweiter Waschschrift (2.W); Spur 5: 13,3 (v/v)% Eluat (E); Die Proteinfractionen wurden in einem 12,5%-igen SDS Gel aufgetrennt. endo-hLa: endogenes hLa; Zum Nachweis des hLa-Proteins wurde der monoklonale anti-La Antikörper SW5 bei einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt.

#### 4.2.2 Identifizierung von koeludierenden Proteinen im SDS-PA-Gel durch Bandenmustervergleich

Nachdem die Reinigung von His-hLa-Protein über NiNTA gelungen war, sollte nun untersucht werden, ob an His<sub>6</sub>-hLa-Protein gebundene zelluläre Proteine koeludieren.

Für die Identifizierung von Proteinen, die zusammen mit dem His<sub>6</sub>-La-Protein mittels der NiNTA-Technologie aufgereinigt werden, wurde das spezifische Eluat neben dem Kontroll-Eluat in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Trenngel war zur besseren Auftrennung des Proteingemisches besonders lang (~ 37,5 cm) gewählt worden. Die Proteine wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (siehe 3.4.2.2).

In Abb. 14 ist ein solches silbergefärbtes Gel dargestellt. Durch den Vergleich der Bandenmuster der beiden Eluate konnten Proteinbanden identifiziert werden, die nur im spezifischen Eluat vorhanden waren, nicht aber im Kontroll-Eluat. Diese Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die Gelschnipsel gewaschen, getrocknet und für die Analyse der Proteine durch Massenspektroskopie an die Kooperationspartner in Braunschweig verschickt.



**Abb. 14: Nachweis spezifisch mit hLa-ko-eluierender Proteine nach Auftrennung durch 12,5%ige SDS-PAGE (Länge des Trenngels ~ 37,5 cm) durch Silberfärbung.** A/ B/ C: Bandenmuster aus 3 unabhängigen Ko-elutionsexperimenten; S – Spezifisches Eluat; K – Kontrolleluat; Die ausgeschnittenen Banden spezifisch ko-eluierender Proteine zur nachfolgenden Identifizierung sind mit Buchstaben gekennzeichnet. Spuren 1-12: Bandenmuster zur Unterscheidung vor Ausschneiden spezifischer Proteinbanden; Spuren 1'-12': Bandenmuster nach Ausschneiden; CE – zytoplasmatische Proteinfraktion; NE – nukleäre Proteinfraktion; Molekulargewicht (MG) in Kilodalton; M – Proteinmarker

#### 4.2.3 Identifizierung von ko-eluierenden Proteinen durch Massenspektroskopie

Nach dem tryptischen Verdau der Proteinbande **c** des Gels A (siehe Abb. 14) konnten sowohl  $\beta$ -Tubulin als auch das humane La-Protein durch die massenspektroskopische Analyse der Peptide nachgewiesen werden. In der anschließenden Tandemmassenspektroskopie konnte der größte Peak als Peptid des La-Proteins eindeutig nachgewiesen werden. In der ausgeschnittenen Bande

waren also sowohl  $\beta$ -Tubulin als auch das hLa-Protein vorhanden. Das La-Protein wurde nach der Tandemmassenspektroskopie ebenfalls in Bande **a** des Gels C identifiziert.

Die Bande **e** in Gel A wurde zweimal eindeutig in der Massenspektroskopie als PTB assoziierter Spleißfaktor PSF identifiziert. Die Peptide dieses Proteins wurden auch in Bande **e** des Gels B eindeutig dem Protein PSF zugeordnet.

Die Analyse der Peptide nach tryptischem Verdau und anschließender Tandemmassenspektroskopie der Bande **h** in Gel A und B ergaben eindeutig, daß es sich hierbei um Peptide des Histons H4 handelte.

Die Proteinbande **g** in Gel B wurde nach Tandemmassenspektroskopie als Histon H2B identifiziert.

Die Bande **b** in Gel C konnte durch Massenspektroskopie als das Protein hnRNP K identifiziert werden.

In den Analysen wurden die Proteine La, PSF und das Histon H4 in zwei unabhängigen Experimenten identifiziert. Die Proteine  $\beta$ -Tubulin, Histon H4 und hnRNP K wurden jeweils einmal identifiziert.

Abbildung 15 zeigt die identifizierten Peptidsequenzen im Zusammenhang mit den dazugehörigen Proteinen.

Eine Reihe von Proteinbanden, die zwar visuell als spezifisch mit hLa ko-eluierend erkannt und als Banden massenspektroskopisch analysiert wurden, waren zum Teil zu stark mit Keratin verunreinigt oder ergaben aus anderen Gründen keine eindeutigen Ergebnisse.

Die jeweiligen Spektrogramme sind im Anhang aufgeführt.

**β-Tubulin (1x identifiziert, Gel A Bande c; Datenbanknr. gi|21361322)**

1 mreivhlqag qcgnqigakf wevisdehgi dptgtyhgds dlqlerinvy yneatggnyv  
 61 pravlvldlep gtmndsvrsgp **fgqifrpdnf vfgqsgagann wakghytega** elvdavldvv  
 121 rkeaescdcl qgfqlthslg ggtgsgmgtl liskireefp drimntfsvv pspkvsdtvv  
 181 epynatlsvh qlventdety cidnealydi cfrtlklttp tygdlnhlvs atmvgvttcl  
 241 **rfgqqlnadl rklavnmvpf prlhffmpgf apltsrgsqq** yraltvpelt qqmfdaknmn  
 301 aacdprhgry **ltvaavfrgr** msmkevdeqm lsvqsknssy fvewipnnvk tavcdipprg  
 361 **lkmaatfign staiqelfkr iseqftamfr rkafhlwytg** egmdemefte aesnmndlvs  
 421 eyqqyqdata eegefeeee eeva

**La (2x identifiziert; Gel A Bande c und Gel C Bande a; Datenbanknr. gi|6678143)**

1 maengdnekm aaleakichq **ieyyfgdfnl prdkflkeqi** kldegwvple imikfnrlnr  
 61 lttdfnvive alskskaelm eisedktkir rpskplpev tdeykndvkn rsvyikgfpt  
 121 datlddikew ledkgqvlmi qmrtrlhkaf kgsifvvfids iesakkfvet pgqkyketdl  
 181 lilfkddyfa kkeerqknk veaklrakqe qeakqkleed aemksleeki gcllkfsgdl  
 241 ddqtcredlh ilfsnhgeik widfvrgake giilfkekak ealgkakdan ngnlqlrnke  
 301 vtwevelev ekealkkiie dqgeslnkwk skgrrrfkqkg kgnkaaqpqs gkgkvqfqqg  
 361 ktkfasdkeh dehdengatg pvkrareetd keepaskqqk tengagdq

**Histon H4 (2x identifiziert; Gel A und B Bande h; Datenbanknr. gi|4504301)**

1 msgrgkqgkg lqkggagrhr **kvlrdniqgi tkpairrlar** rggvkrisgl iyeetrgvkl  
 61 **vflenvirida vtytehakrk tvtamdvya lkrqgrtlyg** fgg

**Histon H2B (1x identifiziert; Gel B Bande g; Datenbanknr. gi|4504236)**

1 mpepvksapv pkkgskkain kaqkkdgkkr krsrkesysv **yvykvlkqvh pdtgisskam**  
 61 gimnsfvndi feriageasr lahynkrsti tsreigtavr lllpgelakh avsegtkavt  
 121 kytssk

**hnRNP-K (1x identifiziert; Gel C Bande b; Datenbanknr. gi|23304945)**

1 meteqpeetf pntetngefg krpaedmee qafkrsrntd emvelrillq sknagavigk  
 61 ggknikalrt dynasvsvpd ssgperilsi sadietigei lkkiiptlee glqlpsptat  
 121 sqlplesdav eclnyqhykg sdfdcelrll ihqslaggi gvkgakikel rentqttikl  
 181 fqeccphstd rvvliggkpd rvvecikiil dlisespikg raqpydpnfy detydyggft  
 241 mmfddrrgrp vgfpmrgrg fdrmpgrg rmpppsrrdy ddmsprgpp ppppgrggrg  
 301 **gsrarnlpl ppppprggd** maydrgrg drydgmvgfs adetwdsaid twspsewqma  
 361 yepqggsgyd ysyaggrgsy gdlggpiitt qvtipklag siigkggqri kqirhesgas  
 421 ikideplegs edriititgt qdqiqnaqyl lqnsvkqyad vegf

**PSF (2x identifiziert; Gel A Bande e und Gel B Bande e; Datenbanknr. gi|4826998)**

1 msrdfrsrg ggggghfrrg ggggrgglhd **frspppgmgl nqnr**gpmgpg ppgsgpkppi  
 61 pppphqqqq qpppqpppp qppphqpph pqphqqqpp pppqdsdkpv vaqggpapg  
 121 vgsappass appatppts appgsppgt ptpppavtsa ppgappptp ssgvpttpq  
 181 agpppppaa vpgppgpkq gpgppgkkg kmpggpkpgg gpglstpggh pkpphrggge  
 241 prggrqhpp yhqqhqqpp gpgppgrsee **kisdsegfka nlsllrrpge** ktytqrclrf  
 301 **vgnlpadite defkrlfaky gepgevfink gkgfgfikle sralaeiaka** elddtpmrgr  
 361 **qlrvrfatha aalsvrnlsp yvsnelleea fsqfgpiera vvivddrgrs tgkgivefas**  
 421 **kpaarkafer csegvfltt tprpvivepl** eqlddedglp eklaqknpm ykeretpprf  
 481 **aqhgtfeyey sqrwklsdem** ekqqreqvek nmkdakdle semedayheh qanllrqdlm  
 541 rrqeelrme elhnqemqkr **kemqlrqqee rrrreeemmi** rqremeeqmr rqreesysrm  
 601 gymdprerdm rmggggamnm gdpysgggk fpplgggggi gyeangvpp atmgsmmgs

**Abb. 15: Identifizierung ko-eluierender Proteine in der Massenspektroskopie.** Die jeweiligen identifizierten Peptide sind fett gedruckt.

#### 4.2.4 Identifizierung von ko-eluierenden Proteinen durch Western- Blotanalyse

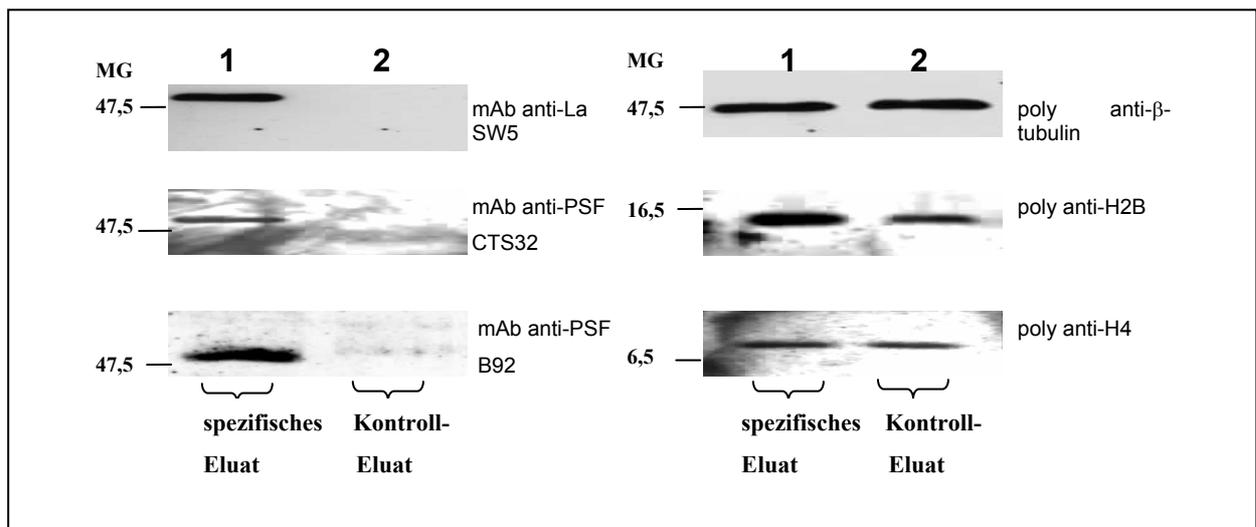
Zur Bestätigung, ob die durch visuellen Bandenvergleich im SDS-PA-Gel und durch nachfolgende Massenspektroskopie identifizierten Proteine tatsächlich spezifisch mit dem His<sub>6</sub>-La-Protein koeluierten, wurden äquivalente Mengen des spezifischen und des Kontroll-Eluates mittels der sensitiven Western-Blotanalyse untersucht.

Die Eluate aus verschiedenen Experimenten, die jeweils auch zur visuellen Unterscheidung der Bandenmuster im Silbergel und der nachfolgenden Identifizierung in der Massenspektroskopie eingesetzt wurden, wurden hierzu ebenfalls direkt gegenübergestellt. Die Eluate wurden in einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferriert und mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert.

Um die gleiche Membran für den Nachweis verschiedener Proteine zu nutzen, wurden die Antikörper gegen ein erstes Protein nach der Analyse von der Membran gewaschen und die Membran danach erneut mit Antikörper gegen eines zweites und gegebenenfalls weitere Proteine erneut eingesetzt.

Durch den Western-Blot konnte gezeigt werden, daß PSF reproduzierbar mit den beiden monoklonalen anti-PSF Antikörpern B92 und CTS32 ausschließlich im spezifischen His<sub>6</sub>-hLa-Proteineluat sichtbar gemacht werden konnte (Abb. 16). Hierbei ist anzumerken, daß das PSF Signal im Western-Blot einem Protein von ca. 50 kD entsprach, während das im silbergefärbten Gel identifizierte Protein bei ca. 83 kD positioniert war. Ein Vergleich mit publizierten Daten legt nahe, daß das 50 kD Protein wahrscheinlich dem Proteinfragment p49 entspricht, welches bekanntermaßen von PSF proteolytisch abgespalten wird ((80), (116)). Da die Eluate gleich nach der Präparation auf die Silbergele aufgetragen wurden, ist anzunehmen, daß PSF bis zu diesem Zeitpunkt noch als Protein der vollen Länge vorhanden war. In der Zwischenzeit bis zu den wesentlich später durchgeführten Western-Blotanalysen wurde das PSF-Protein sehr wahrscheinlich vollständig zu einem 49 kD Fragment proteolytisch prozessiert.

Im Gegensatz zu PSF wurden  $\beta$ -Tubulin und Histon H4 in drei unabhängigen Experimenten als unspezifisch ko-eluierende Proteine eingestuft (Abb. 16). Histon H2B erschien in den verschiedenen Experimenten in spezifischen Eluat zumindest angereichert (Abb. 16). hnRNP K konnte mit dem vorhandenen Antikörper nicht nachgewiesen werden und ist daher nicht abschließend als spezifisch oder unspezifisch mit dem hLa-Protein koelulierend kategorisiert werden.

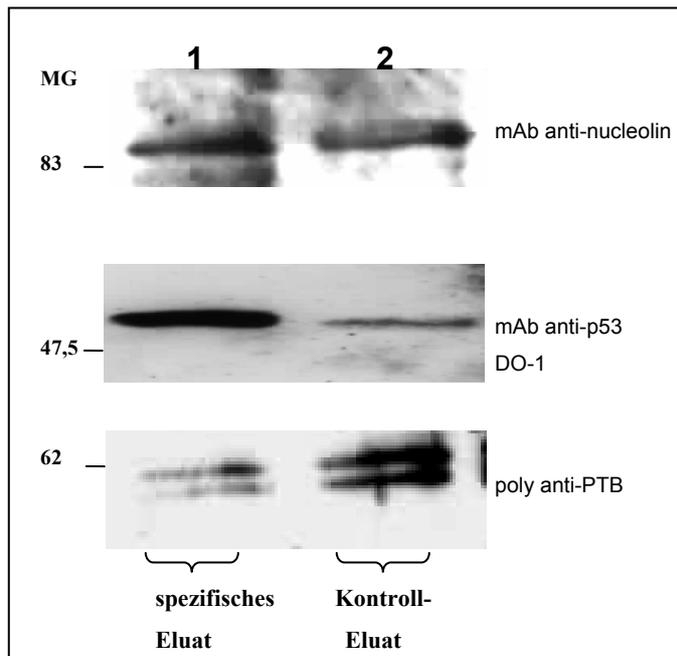


**Abb. 16: Western-Blotanalyse der Proteine der Eluate:** Spur 1: 2,6 µg Protein des Eluats aus pcDNA4.HisMAX-TOPO-hLa-transfizierten Zellen; Spur 2: 2,6 µg der Protein des Eluats aus pEGFP-N1-transfizierten Zellen; Die Proteine der Eluate wurden in einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferriert. Die Western Blot Analyse wurde mit den entsprechenden Antikörpern gegen die jeweils identifizierten Proteine durchgeführt. Antikörperverdünnungen SW5 1:500; CTS 32 1:5; B92 1:2000; anti β-Tubulin 1: 1000; anti H2B 1:500; anti H4 1:500. mAb: monoklonaler Antikörper; poly: polyklonaler Antikörper; Molekulargewicht (MG) in Kilodalton.

PSF wurde in den bisherigen Koelutionsexperimenten als eindeutiger Kandidat, der an hLa bindet, identifiziert.

Zusätzlich zu den durch Massenspektroskopie identifizierten Proteinen wurden noch weitere Proteine auf ihre Spezifität hinsichtlich einer Ko-elution mit dem His<sub>6</sub>-hLa- Protein untersucht. Bei diesen Proteinen war bereits entweder über eine Assoziation mit dem humanen La-Protein oder mit dem PSF-Protein berichtet worden.

Aus der Literatur ist bekannt, daß p53 zusammen mit La, MTF-1 und anderen Proteinen an Rps25 mRNA bindet (2). In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde im hLa-Eluat p53 ebenfalls stark angereichert gefunden (Abb. 17). Dies weist darauf hin, daß möglicherweise eine Subpopulation von p53 spezifisch an His<sub>6</sub>-La bindet. Nucleolin, das als Interaktionspartner des La-Proteins beschrieben ist (37), wurde in allen analysierten Ko-elutionsexperimenten als unspezifisch bindendes Protein identifiziert (Abb. 17). Das Polypyrimidin Trakt bindende Protein PTB, das zusammen mit PSF einen Komplex bildet (100), wurde ebenfalls in allen Experimenten unspezifisch eluiert (Abb. 17). Es ist nicht auszuschließen, daß die His<sub>6</sub>-Markierung des hLa-Proteins mit der Bindung inkompatibel ist.

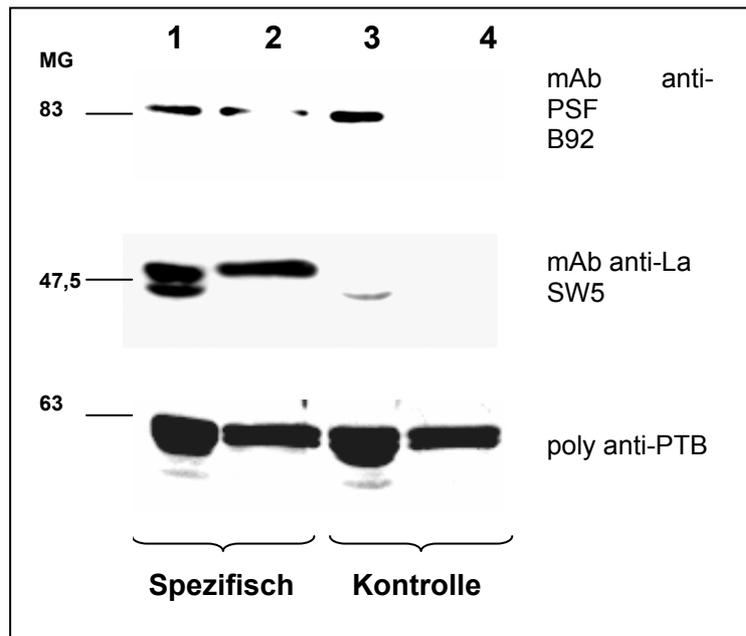


**Abb. 17: Western-Blotanalyse der Eluate:** Spur 1: 2,6 µg der Proteine von Eluat aus pcDNA4.HisMAX-TOPO-hLa-transfizierten Zellen; Spur 2: 2,6 µg der Proteine von Eluat aus pEGFP-N1-transfizierten Zellen; Die Eluate wurden in einem 12,5%igen SDS-PA-Gel aufgetrennt. Die Western-Blot-Analyse wurde mit den entsprechenden Antikörpern (mAb anti-Nucleolin Verdünnung 1:1000; mAb anti-p53 DO-1 Verdünnung 1:500; poly anti-PTB 1:1000) gegen die jeweils identifizierten Proteine durchgeführt. mAb: monoklonaler Antikörper; poly: polyklonaler Antikörper; Molekulargewicht (MG) in Kilodalton,

Aus den Koelutionsexperimenten zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner des hLa-Proteins ging das Protein PSF als aussichtsreichster Kandidat hervor.

Um die Effizienz der Elution sowohl für das His<sub>6</sub>-hLa-Protein als auch für das PSF-Protein bestimmen zu können und um einen Anhaltspunkt zu haben, wieviel hLa-Protein mit wieviel PSF-Protein koeluiert, wurden im Western-Blot die Eluate gegenüber dem Ausgangsmaterial analysiert. Bei dieser Präparation wurde besonders sorgfältig darauf geachtet, daß die Wahrscheinlichkeit einer proteolytischen Spaltung des PSF so gering wie möglich gehalten wird. So konnte PSF hier als Protein der vollen Länge bei ca. 100 kD gezeigt werden. Es zeigte sich, daß ca. 46% des His<sub>6</sub>-hLa eluiert werden konnten. Demgegenüber stehen ca. 20% des endogenen PSF, das mit His<sub>6</sub>-hLa spezifisch koeluiert (Abb. 18).

Da PTB in vorherigen Experimenten als unspezifisch bindendes Protein identifiziert wurde, wurde es hier als Ladekontrolle eingesetzt. Dadurch wird noch einmal bestätigt, daß tatsächlich gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden. Trotzdem ist anzumerken, daß das Signal für endogenes hLa im Ausgangsmaterial aus Zellen, die mit pcDNA4.HisMAX-TOPO-hLa transfiziert wurden, sehr viel stärker ist gegenüber dem Signal des Ausgangsmaterials aus pEGFP-N1 transfizierten Zellen (Vergleich Spur 1 und Spur 3 in Abb. 18). Diese Beobachtung wurde wiederholt gemacht und ist möglicherweise auf eine Autoregulation der La-Genexpression zurückzuführen.



**Abb 18: Western-Blotanalyse der Eluate gegenüber dem Ausgangsmaterial:** Spur 1 – 50 µg Zellysate aus pcDNA4.HisMAX-TOPO-hLa transfizierten Zellen; Spur 2 – 10 µg Eluat aus pcDNA4.HisMAX-TOPO-hLa transfizierten Zellen; Spur 3 – 50 µg Zellysate aus pEGFP-N1 transfizierten Zellen; Spur 4 – 10 µg Eluat aus pEGFP-N1 transfizierten Zellen; Die Eluate wurden in einem 12,5 % igen SDS PA Gel aufgetrennt. Verdünnungen der jeweiligen Antikörper: mAb anti-PSF B92 1:2000; mAb anti-La SW5 1:500; poly anti-PTB 1:1000 Molekulargewicht (MG) in Kilodalton

PSF wurde bisher nicht in Zusammenhang mit dem La-Protein beschrieben. Die hier vorgestellten Ergebnisse, die zeigen, daß das PSF-Protein zusammen mit His<sub>6</sub>-hLa spezifisch koeluiert, sind ein starker Hinweis dafür, daß dieses Protein spezifisch mit dem hLa-Protein wechselwirkt.

### 4.3 Nachweis der Interaktion von hLa und PSF durch Koimmunpräzipitation

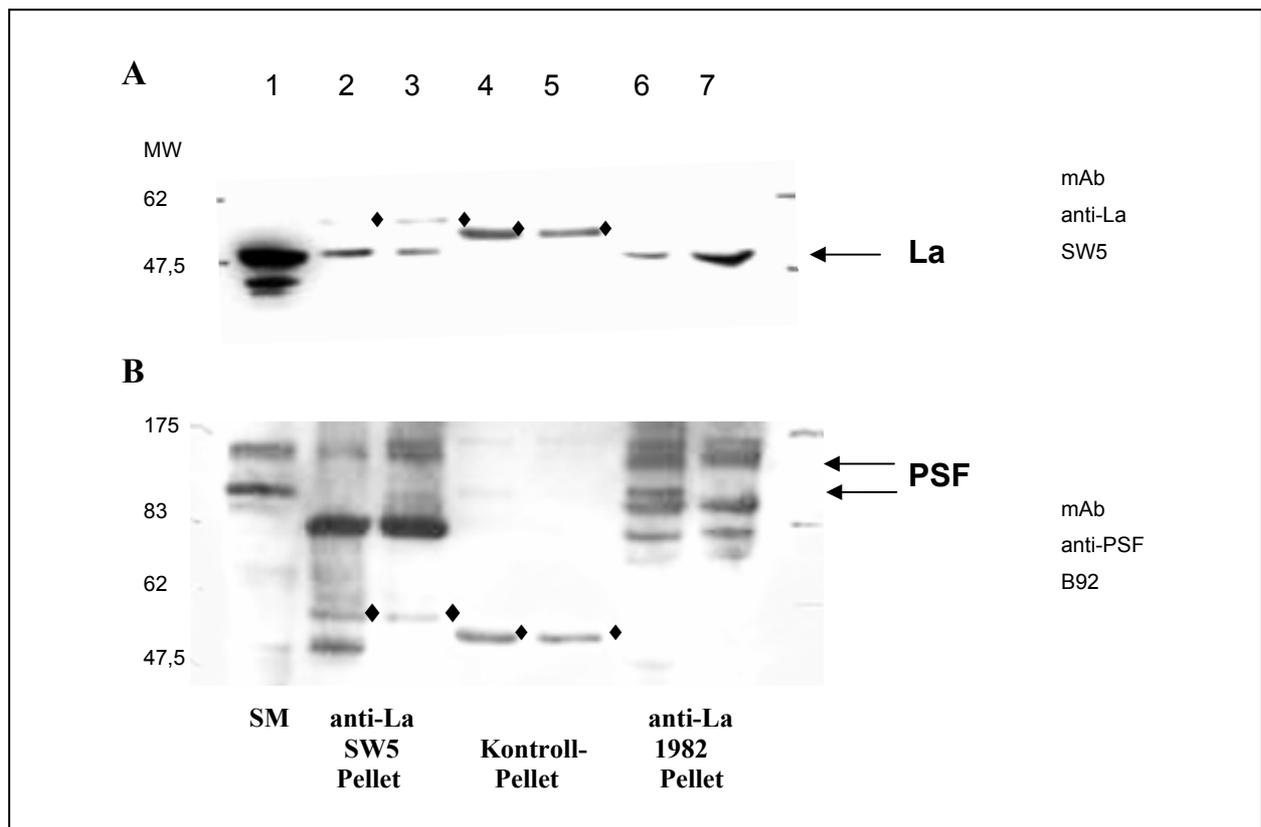
Um die aufgrund der Koelution von His<sub>6</sub>-hLa und PSF vermutete Interaktion der beiden Proteine durch einen unabhängigen experimentellen Ansatz zu bestätigen, wurde untersucht, ob sich beide Proteine durch entsprechende Antikörper ko-immunpräzipitieren lassen.

Zunächst wurde deshalb eine Immunpräzipitation mit 293T-Kernextrakten durchgeführt. Hierzu wurden Antikörper gegen das hLa-Protein eingesetzt, im Western-Blot analysiert, ob das endogene hLa-Protein im Präzipitat vorhanden ist und das endogene PSF kopräzipitiert.

Mit diesem Versuchansatz konnte gezeigt werden, daß endogenes hLa-Protein spezifisch durch den monoklonalen anti-La Antikörper SW5 (Abb. 19A, Spur 2 und 3) und durch den polyklonalen anti-La Antikörper 1982 präzipitiert wird (Abb. 19A; Spur 6 und 7). Die Kontrolle mit einem unspezifischen Antikörper der gleichen IgG-Subklasse (IgG2A) wie der des monoklonalen Antikörpers SW5 war negativ (Abb. 19A; Spur 4 und 5).

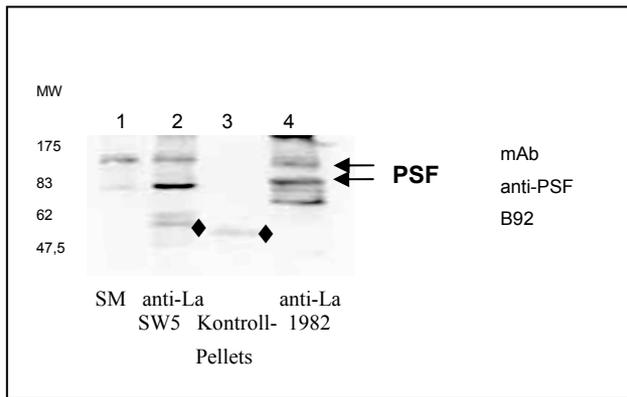
Im selben Western-Blot wurden nach Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper B92 gegen PSF Banden entsprechend Molekulargewichten von ca. 100 kD und ca. 140 kD sichtbar, die in dem mit anti-La-Antikörpern erzeugten Immunpräzipitat (Abb. 19B; Spur 2,3 und 6,7), nicht aber im mit Kontrollantikörpern erzeugten Präzipitat nachweisbar waren (Abb. 19B; Spur 4 und

5). Um die Stärke der Bindung zwischen hLa und PSF grob zu charakterisieren, wurden verschiedene Salzkonzentrationen im Waschpuffer für das Immunpräzipitat eingesetzt. Die hoch stringenten Bedingungen von 500 mM NaCl stehen hierbei den physiologischen Konzentrationen von 150 mM NaCl gegenüber. Trotz erhöhter Salzkonzentration war das Signal für PSF im Immunpräzipitat mit anti-La Antikörpern vorhanden (Abb. 19B; Spur 3 und 7). Dieses Ergebnis spricht für eine sehr starke Bindung der beiden Proteine.



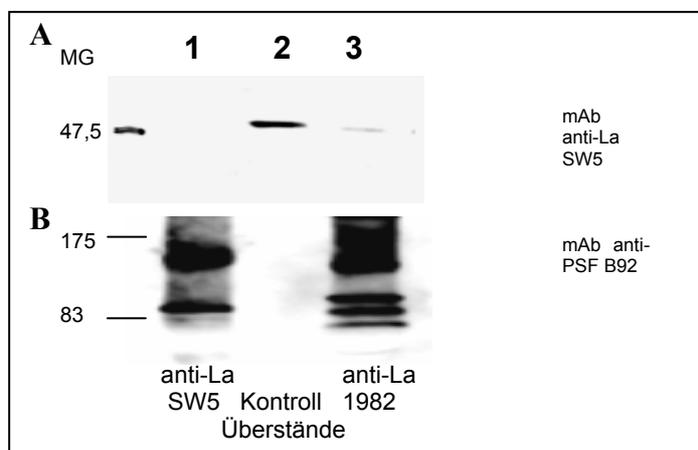
**Abb. 19 : Immunpräzipitation von hLa und PSF in 293T Kernextrakten:** Spur 1: 60 µg (= 60%) der Proteine des Ausgangsmaterials ( SM: Startmaterial); Spur 2: – 100% des Immunpräzipitats mit anti-La SW5 (150 mM NaCl im Waschpuffer); Spur 3: 100 % des Immunpräzipitates mit anti-La SW5 (500 mM NaCl im Waschpuffer); Spur 4: 100% des Immunpräzipitates mit IgG2A (150 mM NaCl im Waschpuffer); Spur 5: 100% des Immunpräzipitates mit IgG2A (500 mM im Waschpuffer); Spur 6: 100% des Immunpräzipitates mit anti-La 1982 (150 mM NaCl im Waschpuffer); Spur 7: 100% des Immunpräzipitates mit anti-La 1982 (500 mM NaCl im Waschpuffer); Western Blot Analyse: A – mAb anti-La SW5 Verdünnung 1:500; B – mAb anti-PSF B92 Verdünnung 1:2000; ♦ - IgG schwere Kette

Zum Nachweis, daß diese Interaktion auch in anderen Zellen stattfindet und aufgrund einer persönlichen Mitteilung von R. Foisner, die besagte, daß das Ausmaß der proteolytischen Spaltung von PSF in HeLa Zellen relativ gering ist, wurde die Immunpräzipitation auch mit Kernextrakten aus HeLa Zellen durchgeführt. Es konnte wiederum gezeigt werden, daß hLa und PSF zusammen mit den La-spezifischen Antikörpern präzipitiert werden können (Abb. 20; Spur 2 und 4 gegenüber Spur 3).



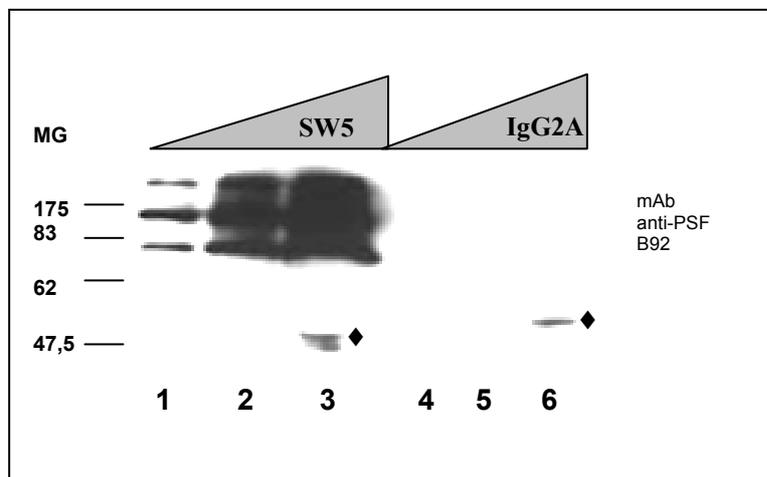
**Abb. 20: Immunpräzipitation von hLa und PSF in HeLa-Kernextrakten:** Spur 1: 60  $\mu$ g (= 60%) Protein des Ausgangsmaterials (SM: Startmaterial); Spur 2: 100% des Immunpräzipitats mit anti-La SW5; Spur 3: 100% des Immunpräzipitates mit IgG2A; 4 – 100% des Immunpräzipitates mit anti-La 1982; Western-Blot Analyse: mAb anti-PSF B92 Verdünnung 1:2000;  $\blacklozenge$  - IgG schwere Kette:

Zur Kontrolle der Immunpräzipitation wurden die Überstände der Reaktion ebenfalls in einem Western Blot analysiert. Aufgrund der hohen Hintergrundsignale des mAb anti-PSF B92 war eine Dokumentation der Kontrollen der in Abb. 19 und Abb. 20 gezeigten Experimente nicht möglich. Um auf die Problematik einer Immunpräzipitation unter Verwendung der verfügbaren anti-La-Antikörper hinzuweisen, sind die hier aufgeführten Kontrollen exemplarisch dargestellt. Nach Auftrennung des Proteingemisches der Überstände der Immunpräzipitate in einer 12,5%igen SDS-PAGE wurden in der Western-Blotanalyse hLa und PSF mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. In Abb. 19A konnte gezeigt werden, daß das hLa-Protein ausschließlich im Überstand der Kontrollreaktion detektiert wurde (Abb. 21A; Vergleich der Spuren 1 und 3 mit Spur 2), womit wiederum gezeigt wurde, daß ein Großteil des hLa-Proteins spezifisch durch anti-La-Antikörper präzipitiert wurde. Die Inkubation der gleichen PVDF-Membran mit dem mAb anti-PSF B92 zeigte allerdings, daß Signale ausschließlich in den Überständen der anti-La Präzipitate nachzuweisen waren. In der Kontrolle konnten keine Signale gezeigt werden (Abb. 21B; Vergleich Spur 1 und 3 mit Spur 2). Da PSF aber nicht durch den Kontrollantikörper präzipitiert wurde (Abb. 19B und 20), stellte sich die Frage, warum PSF nicht in der Kontrolle zu detektieren war und woher die Signale in den Überständen der anti-La Präzipitate stammten.



**Abb. 21: Kontrolle der anti-La Immunpräzipitation in HeLa Kernextrakten.** Es wurden jeweils 5 (v/v)% des Überstandes aus einer anti-La SW5- (Spur 1), IgG2A- (Spur 2) und anti-La 1982-Immunpräzipitation in einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Western Blot in Teilabschnitt A = mAb anti-La SW5 Verdünnung 1:500 und in Sektion B = mAb anti-PSF Verdünnung 1:2000.

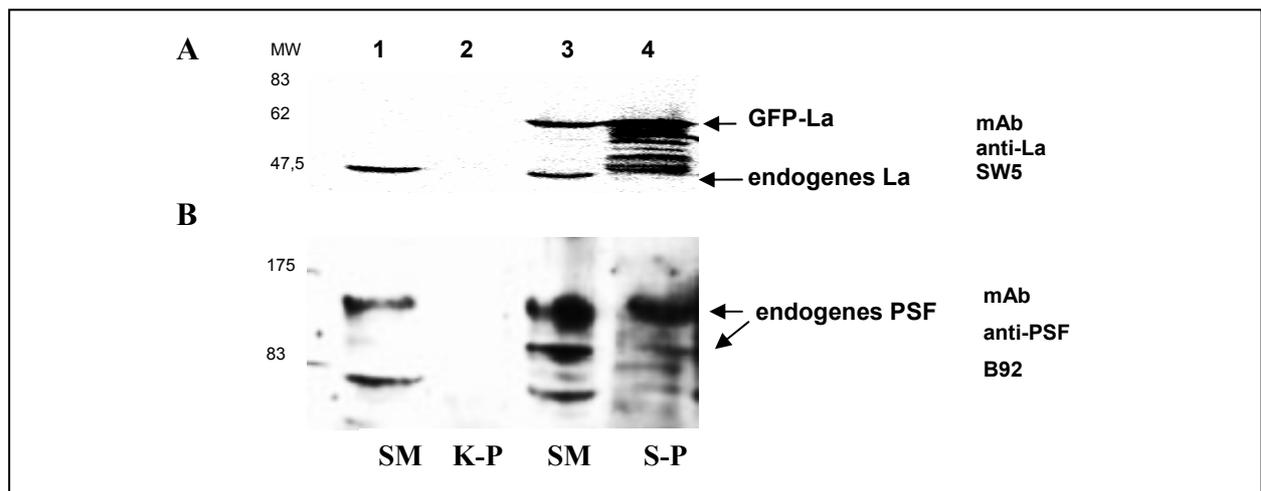
Da die verwendeten anti-La Antikörper in nicht-gereinigten Hybridomaüberständen enthalten sind und somit auch weitere Zellkulturmediumbestandteile in diesen Präparationen enthalten waren, sollte getestet werden, ob die Signale in den anti-La Präzipitationsüberständen tatsächlich spezifische PSF-Signale darstellen, oder ob es sich hierbei um kontaminierende Proteine der Hybridomaüberstände handelt. Hierzu wurden verschiedene Mengen an mAb anti-La SW5 in einer 12,5% igen SDS PAGE aufgetrennt und in der Western-Blotanalyse mit dem mAb anti-PSF B92 inkubiert. Es stellt sich heraus, daß der mAb anti-PSF B92 verschiedene Proteine im Hybridomaüberstand erkennt (Abb. 22). Die Signale lagen bei ca. 160 kD und ca. 78 kD. In der Koimmunpräzipitation wurden dagegen durch den mAb anti-PSF Banden bei ca. 83 kD und ca. 120 kD sichtbar (Abb. 19B und 20). Durch den Vergleich mit Abb. 20 kann geschlossen werden, daß es sich bei den in Abb. 19B und Abb. 20 gezeigten Proteinbanden tatsächlich um PSF handelt.



**Abb. 22: Nachweis von Verunreinigungen im mAb anti-La SW5 Hybridomaüberstand im Vergleich zu mAb IgG2A, durch Reaktion mit mAb anti-PSF B92:** Es wurden verschiedene Mengen an anti-La SW5 (Spur 1: 100 ng; Spur 2: 250 ng und Spur 3: 500 ng) und IgG2A (Spur 4: 100 ng; Spur 5: 250 ng; Spur 6: 500 ng) aufgetragen und im Western Blot durch mAb anti-PSF B92 nachgewiesen. ♦ - IgG schwere Kette

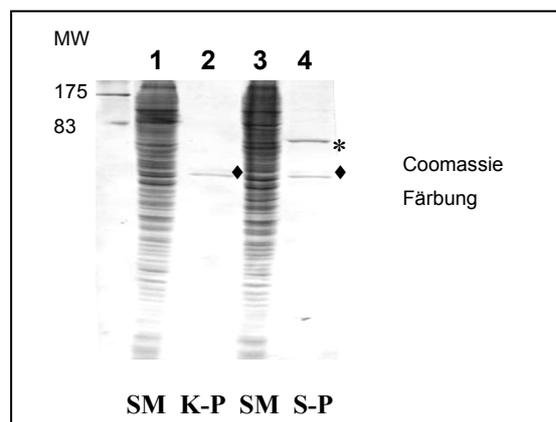
Aufgrund der schwierigen Interpretation der Immunpräzipitationsdaten mit den endogenen Proteinen und der hohen Hintergrundsignale, die der mAb anti-PSF B92 verursachte, wurde versucht die Interaktion zwischen PSF und hLa zweifelsfrei durch eine Immunpräzipitation mit mAb anti-GFP zu zeigen. Hierzu dienten Zellextrakte von Zellen, in denen GFP-hLa überexprimiert wurde. Als Negativkontrolle wurde die Immunpräzipitation mit demselben Antikörper mit Extrakten von pEGFP-N1-transfizierten Zellen durchgeführt.

Das Proteingemisch der Extrakte und Präzipitate wurden in einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. In der anschließenden Western-Blotanalyse mit dem monoklonalen Antikörper SW5 gegen hLa zeigte sich, daß das GFP-hLa Fusionsprotein durch den monoklonalen anti-GFP Antikörper präzipitiert wird. Das endogene hLa wurde nicht präzipitiert (Abb. 23A; Spur 4). Eine anschließende Analyse desselben Blotes mit dem monoklonalen Antikörper PSF B92 zeigte, daß PSF zusammen mit GFP-hLa kopräzipitiert (Abb. 23B; Spur 4).



**Abb. 23 : Koimmunpräzipitation von GFP-hLa und PSF in 293T Zellen:** Spur 1: 10% der Proteine des Ausgangsmaterials = 293T Zellextrakt transfiziert mit pEGFP; Spur 2: 100% des Immunpräzipitats mit anti-GFP in pEGFP transfizierten Zellen (Negativkontrolle); Spur 3: 10% des Ausgangsmaterial von 293T Zellextrakt transfiziert mit pEGFP-hLa; Spur 4: 100% des Immunpräzipitates mit anti-GFP in pEGFP-hLa transfizierten Zellen; SM: Startmaterial; K-P: Kontrollpellet; S-P: spezifisches Pellet; Western-Blotanalyse: mAb anti-La SW5 Verdünnung 1:500(A), mAb anti-PSF B92 Verdünnung 1:2000 (B)

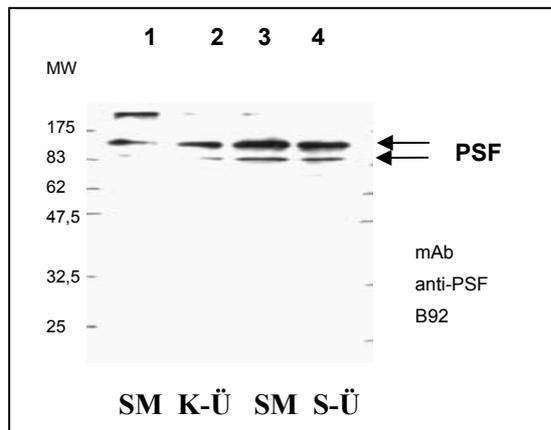
Zur Kontrolle des Experiments wurde das SDS Gel mit Coomassie Blue gefärbt, um zu zeigen, daß die gleichen Proteinmengen eingesetzt wurden. Es konnte bestätigt werden, daß äquivalente Mengen an Zellextrakt von pEGFP-N1 und pEGFP-hLa für die Immunpräzipitation verwendet wurden (Abb. 24; Vergleich Spur 1 und 3). Es kann also davon ausgegangen werden, daß der Nachweis von PSF im anti-GFP Pellet von pEGFP-hLa-transfizierten Zellen auf die spezifische Kopräzipitation von GFP-hLa und PSF zurückzuführen ist und PSF nicht unspezifisch an den anti-GFP Antikörper gebunden hat.



**Abb 24: Coomassie Färbung des SDS-PA Gels:** Spur 1: 10% Ausgangsmaterial = 293T Zellextrakt transfiziert mit pEGFP; Spur 2: 100% des GFP-hLa Immunpräzipitats; Spur 3: 10% Ausgangsmaterial = 293T Zellextrakt transfiziert mit pEGFP-hLa; Spur 4: 100% des GFP-Immunpräzipitates; SM: Startmaterial; K-P: Kontrollpellet; S-P: spezifisches Pellet; ♦ - IgG schwere Kette; \* - GFP-hLa; die Proteine wurden in einem 12,5%igen SDS PA-Gel aufgetrennt.

Zur weiteren Kontrolle des Experimentes wurden ebenfalls die Überstände der Immunpräzipitation im Western Blot analysiert (Abb. 25). Hierbei konnte gezeigt werden, daß die Intensität des PSF-Signals nach der spezifischen Immunpräzipitation von GFP-hLa gegenüber der GFP-Immunopräzipitation abnimmt (Abb. 25; Vergleich Spur 1 und 2 mit Spur 3

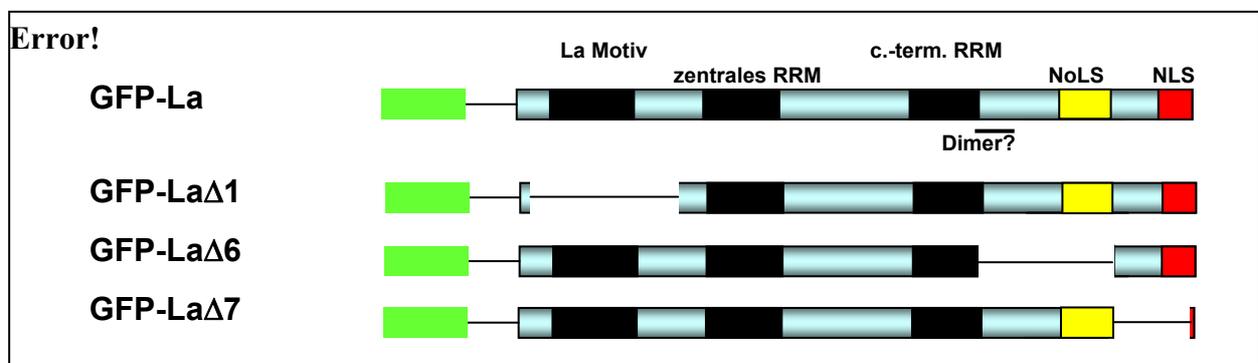
und 4). Der Nachweis von PSF im spezifischen Pellet ist auch ein Hinweis darauf, daß nur eine Subfraktion von PSF mit dem GFP-hLa präzipitiert wurde.



**Abb. 25 : Koimmunpräzipitation von GFP-hLa und PSF in 293T-Zellen - Kontrolle:** Spur 1: 10% 293T Zellextrakt transfiziert mit pEGFP; Spur 2: 10% des Überstandes nach Immunpräzipitation von GFP mit anti-GFP Antikörpern; Spur 3: 10% 293T Zellextrakt transfiziert mit pEGFP-La; Spur 4: 10% des Überstandes nach Immunpräzipitation von GFP-hLa mit anti-GFP Antikörpern; SM: Startmaterial; K-Ü: Kontrollüberstand; S-Ü: spezifischer Überstand. Die Proteine wurden in einem 12,5% igen SDS PA-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem mAb anti-PSF B92 (Verdünnung 1:2000) nachgewiesen.

Außerdem wurde versucht, mittels vorhandener pEGFP-hLa Expressionsplasmide, in denen bestimmte Bereiche des hLa-Proteins deletiert sind, eine Aussage über die Interaktionsdomäne des hLa-Proteins, an die das PSF-Protein bindet, treffen zu können. Im GFP-hLa $\Delta$ 1 ist das konservierte La-Motiv nicht mehr enthalten, in GFP-hLa $\Delta$ 6 fehlt die vorhergesagte Dimerisierungsdomäne, die möglicherweise auch Protein-Protein-Interaktion vermittelt, und in GFP-hLa $\Delta$ 7 wurde das Kernlokalisierungssignal entfernt. Die Deletionen führen dazu, daß sich die Lokalisierung der jeweiligen Fusionsproteine von der Lokalisierung des GFP-hLa unterscheidet. Während GFP-hLa mehr oder weniger homogen überall im Zellkern verteilt ist, findet man GFP-hLa $\Delta$ 6 nicht in den Nukleoli, und GFP-hLa $\Delta$ 7 ist sogar ausschließlich im Zytoplasma. GFP-hLa $\Delta$ 1 schliesslich ist ähnlich wie GFP-hLa diffus im Zellkern verteilt (63).

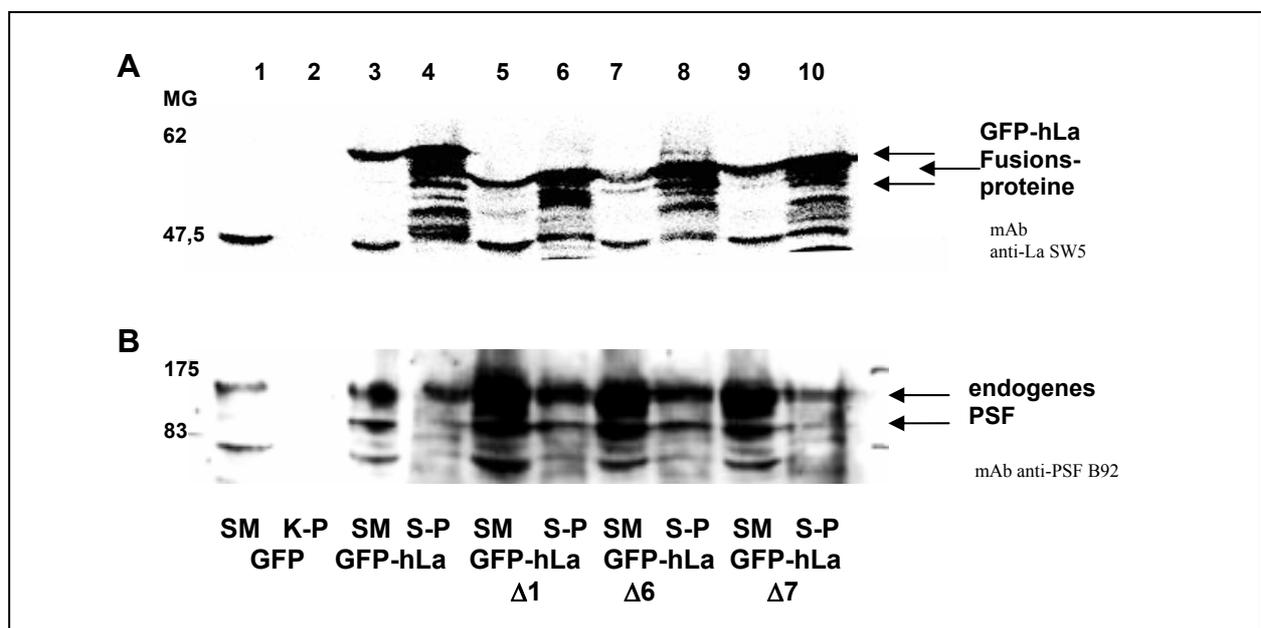
Zur Analyse durch Immunpräzipitation, ob bestimmte Bereiche des hLa-Proteins die Interaktion mit PSF vermitteln, wurden verschiedene pEGFP-hLa Konstrukte (Abb. 26) in 293T-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach 2 Tagen geerntet und die Zellextrakte für die Immunpräzipitation mittels monoklonaler anti-GFP Antikörper verwendet.



**Abb. 26: Schematische Übersicht über die für die Koimmunpräzipitation verwendeten GFP-hLa Fusionsproteine:** RRM – RNA-Erkennungsmotive; Dimer – Multimerisierung; NoLS – engl. *nucleolar localisation signal*; NLS – engl.: *nuclear localisation signal*

In der anschließenden Analyse der Proteine des Präzipitates durch SDS-PAGE und durch darauffolgende Western-Blotanalyse mit dem mAb anti-La Antikörper SW5 konnte nachgewiesen werden, daß alle GFP-hLa Fusionsproteine durch anti-GFP Antikörper präzipitiert wurden (siehe Abb. 27A: Spur 6, 8 und 10). Der Nachweis von PSF mit dem monoklonalen anti-PSF Antikörper B92 zeigte, daß PSF zusammen mit allen GFP-hLa Fusionsproteinen kopräzipitiert werden konnte (Abb.27B: Spur 6, 8, 10), wobei die Menge an kopräzipitierten PSF mit GFP-hLa $\Delta$ 7 geringer ist im Vergleich zum Präzipitat mit GFP-hLa, GFP-hLa $\Delta$ 1 oder GFP-hLa $\Delta$ 6 (Vergleiche Abb. 27B: Spur 10 mit Spuren 4, 6 und 8). Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, daß GFP-hLa $\Delta$ 7 sich ausschließlich im Zytoplasma befindet, während PSF sich in Spleißflecken im Zellkern befindet (siehe 4.4). Eine Interaktion der beiden Proteine ist daher auch aufgrund der unterschiedlichen intrazellulären Lokalisierung unwahrscheinlich.

Zusammenfassend konnte durch diese Experimente gezeigt werden, daß das La-Motiv und die potentielle Dimerisierungsdomäne nicht die Wechselwirkung mit PSF vermitteln. Die Interaktion zwischen den Proteinen hLa und PSF wird daher wahrscheinlich über andere als die hier untersuchten Bereiche des hLa-Proteins vermittelt. Die Ergebnisse der Kopräzipitation von GFP-hLa $\Delta$ 7 geben darüber hinaus einen Hinweis darauf, daß hLa und PSF im Zellkern interagieren.

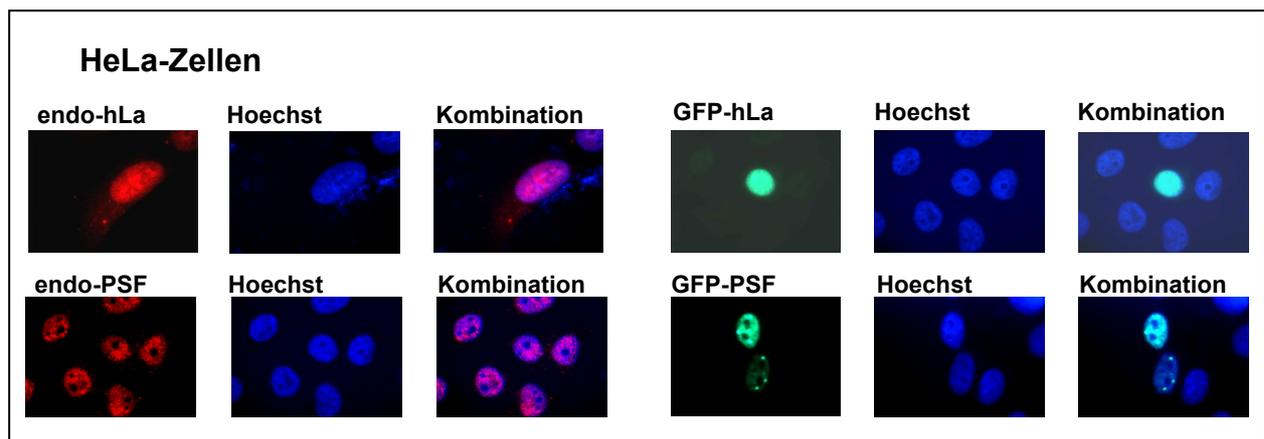


**Abb. 27: Koimmunpräzipitation von deletierten GFP-hLa Fusionsproteinen und endogenem PSF in 293T Zellen.** Spur 1: 10% Ausgangsmaterial des 293T Zellextraktes transfiziert mit pEGFP; Spur 2: 100% des Immunpräzipitates mit anti-GFP in pEGFP transfizierten Zellen (Negativkontrolle); Spur 3: 10% Ausgangsmaterial des 293T Zellextraktes transfiziert mit (Spur 5/ 7/ 9: deletierten) pEGFP-hLa; Spur 4: 100% des Immunpräzipitates mit anti-GFP in (Spur 6/ 8/ 10: deletierten) pEGFP-hLa transfizierten Zellen; SM: Startmaterial; K-P: Kontrollpellet; S-P: spezifisches Pellet; Die Proteine wurden in einem 12,5%igen SDS PA-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem A: mAb anti-La SW5 (Verdünnung 1:500) und mit B: anti-PSF B92 (Verdünnung 1:2000) analysiert.

#### 4.4 Kolokalisierung von hLa und PSF

Im Folgenden wurde versucht, weitere Hinweise für die Interaktion von hLa und PSF durch Aufzeigen einer Kolokalisierung mittels Immunfluoreszenz zu erhalten.

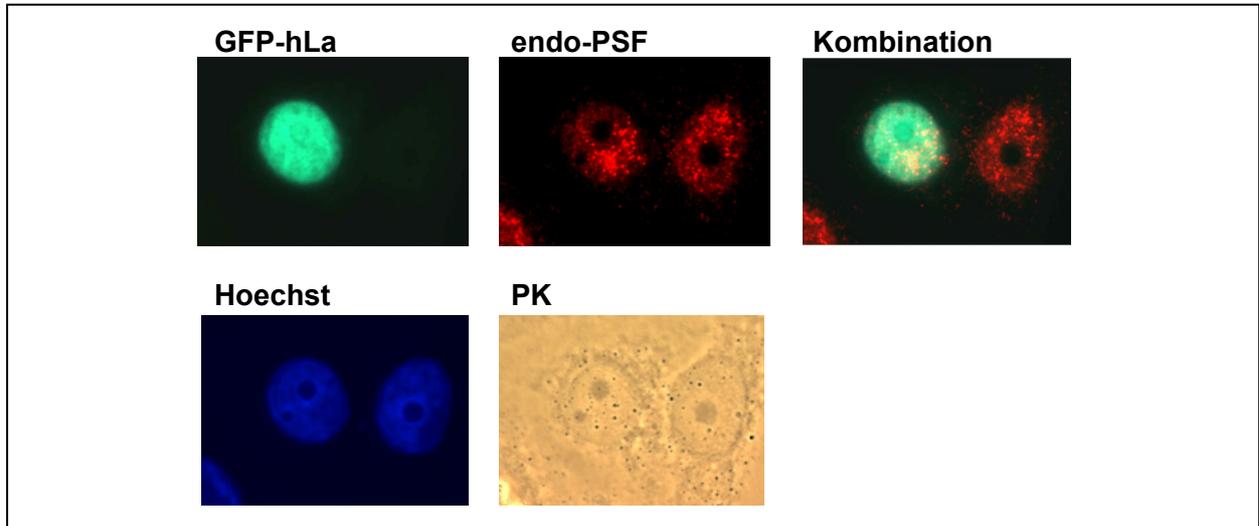
Zunächst wurde hierzu die Lokalisierung der beiden endogen exprimierten Proteine sowie der entsprechenden exogen exprimierten GFP-Fusionsproteine in verschiedenen Zellen untersucht. Die Lokalisierung der endogenen Proteine und GFP-Fusionsproteine wurde in Huh7-, HeLa- und U2OS-Zellen untersucht und es zeigten sich dabei keine signifikanten Zelltyp-spezifischen Unterschiede. In Abbildung 28 ist die Verteilung beider Proteine exemplarisch in HeLa-Zellen dargestellt. Das endogene hLa lokalisierte hauptsächlich im Zellkern, und nur ein geringer Teil war auch im Zytoplasma sichtbar. Im Gegensatz dazu wurde das GFP-hLa ausschließlich im Zellkern gefunden. Das endogene PSF akkumulierte in bestimmten Bereichen des Zellkerns, in Kernflecken, und war nicht in den Nukleoli nachweisbar. Die Fusion von PSF mit GFP führte dazu, daß diese Akkumulation des PSF in Zellkernbereichen verstärkt wird (Abb. 28).



**Abb. 28: Lokalisierung von hLa und PSF in HeLa-Zellen.** Das endogene hLa (endo-hLa) wurde mit dem monoklonalen Antikörper 3B9 gegen La detektiert (Verdünnung 1:500). Das endogene PSF (endo-PSF) wurde mit dem monoklonalen Antikörper B92 gegen PSF detektiert (Verdünnung 1:1000). Hoechst färbt spezifisch die DNA und wurde als Zellkernmarker eingesetzt. endo – endogen; Die "Kombination" zeigt eine Überlagerung der Proteinsignale und der DNA. Die Zellen wurden an Tag 3 nach Aussaat mittels Methanol/ Aceton fixiert. Vergrößerung 100x

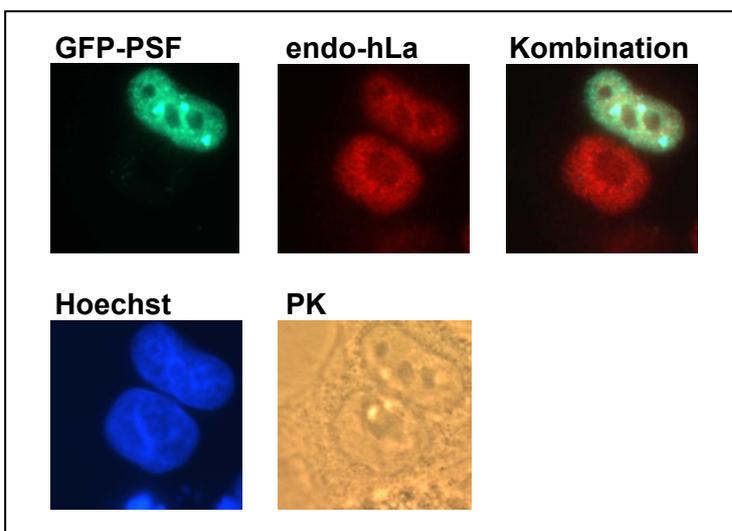
Für die Kolokalisierungsstudien wurden HeLa-Zellen mit pEGFP-hLa bzw. mit pEGFP-PSF transfiziert, an Tag 2 nach der Transfektion fixiert und endogenes hLa-Protein bzw. endogenes PSF-Protein mittels spezifischer Erst- und Zweitantikörper, an die Rhodamin gekoppelt ist, sichtbar gemacht. Des weiteren sollte untersucht werden, ob die Überexpression der Fusionsproteine einen Einfluß auf die Lokalisierung der endogenen Proteine hLa bzw. PSF haben.

Bei der Überlagerung des GFP-hLa Signals mit dem Signal des endogenen PSF konnte keine Kolokalisierung sichtbar gemacht werden ("Kombination" in Abb. 29). Insbesondere war auch unter diesen Bedingungen das endogene PSF noch immer in Kernflecken lokalisiert und weder in Nukleoli noch im Zytoplasma nachweisbar (Abb. 29).



**Abb. 29: Lokalisierung von GFP-hLa und endogenem PSF in HeLa-Zellen:** Hoechst färbt spezifisch die DNA und wurde als Zellkernmarker eingesetzt. Das endogene PSF wurde mit dem monoklonalen Antikörper gegen PSF (endo-PSF) B92 detektiert (Verdünnung 1:1000). endo – endogen; PK – Phasenkontrast; Die "Kombination" zeigt eine Überlagerung der GFP-hLa und der PSF-Signale. Die Zellen wurden an Tag 2 nach Transfektion mittels Methanol/ Aceton fixiert. Vergrößerung 100x

Die Kombination des GFP-PSF Signals mit dem Signal des endogenen hLa-Proteins zeigte ebenfalls keine überzeugende Kolokalisierung ("Kombination" in Abb. 30). Allerdings ist die Lokalisierung des endogenen hLa-Proteins im Gegensatz zu nicht-transfizierten Zellen verändert. Es konnte gezeigt werden, daß hLa nun nicht mehr in den Nukleoli zu detektieren war (Vergleich "endo-hLa" in Abb. 28 und Abb. 30).



**Abb. 30: Lokalisierung von GFP-PSF und endogenem hLa in HeLa-Zellen:** Hoechst färbt spezifisch die DNA und wurde als Zellkernmarker eingesetzt. Das endogene hLa wurde mit dem monoklonalen Antikörper 3B9 gegen endogenes hLa (endo-hLa) detektiert. endo – endogen; PK – Phasenkontrast; Die "Kombination" zeigt eine Überlagerung der GFP-PSF und der hLa-Signale. Die Zellen wurden an Tag 2 nach Transfektion mittels Methanol/ Aceton fixiert. Vergrößerung 100x

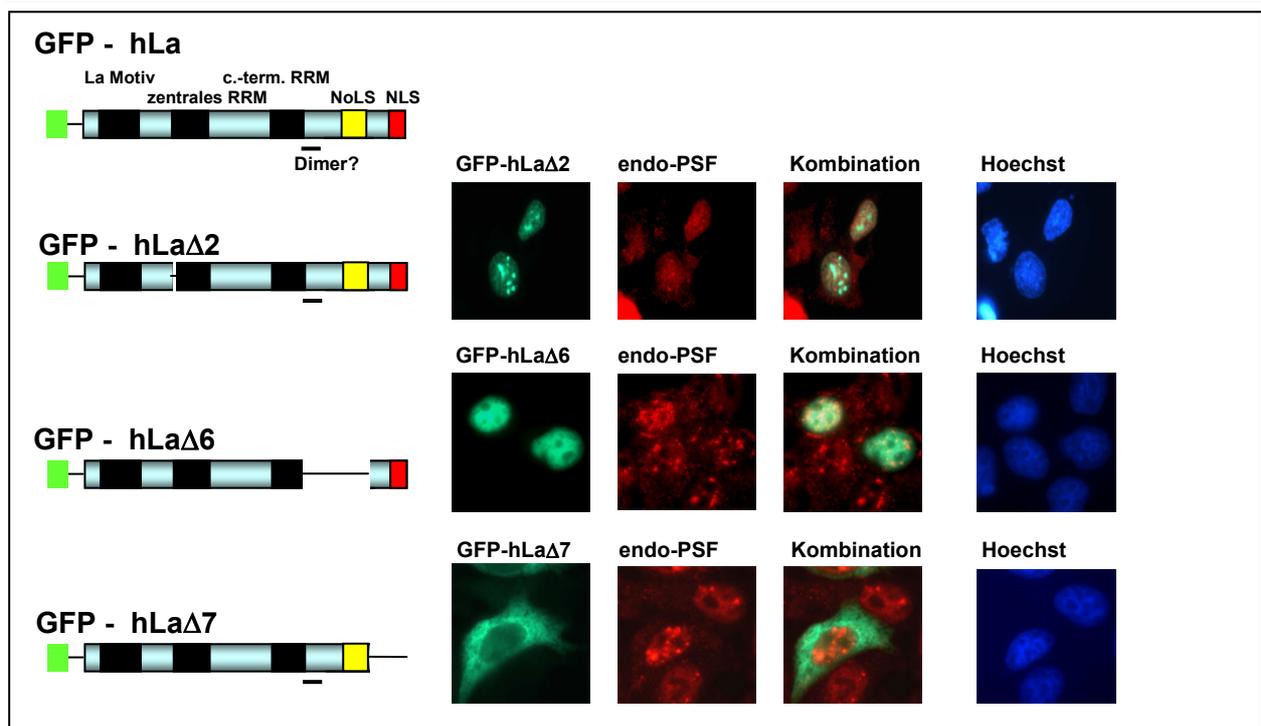
Außerdem wurde der Einfluß der Überexpression verschiedener GFP-hLa-Fusionsproteine, in denen Bereiche deletiert waren, die für die Lokalisierung des hLa-Proteins verantwortlich sind, untersucht. Hierzu wurden die Fusionsproteine in HeLa-Zellen überexprimiert, die Zellen fixiert und in der anschließenden Immunfärbung endogenes PSF sichtbar gemacht.

Im GFP-hLa $\Delta$ 2-Fusionsprotein ist der Bereich aa 113-118, der das RNP2 des RRM2 des La Proteins umfaßt, deletiert. Die Deletion  $\Delta$ 2 in GFP-hLa-Fusionsprotein führt zu einer Akkumulation des Proteins in den Nukleoli (63). Aufgrund der Interaktion von hLa und PSF wurde angenommen, daß eine Überexpression von GFP-hLa $\Delta$ 2 möglicherweise das PSF-Protein in Nukleoli rekrutiert und es dann dort nachweisbar würde. Die Überexpression von GFP-hLa $\Delta$ 2 hatte allerdings keinen Einfluß auf die Lokalisierung des endogenen PSF-Proteins. Beim Nachweis mit dem monoklonalen anti-PSF Antikörper B92 akkumulierte es noch immer in einem Fleckenmuster und blieb in den Nukleoli abwesend (Abb. 31).

Die Deletion  $\Delta$ 6 im GFP-hLa-Fusionsprotein, die den Bereich aa 274-354 mit einer vorhergesagten Dimerisierungsdomäne umfaßt, führt dazu, daß es sich nicht mehr in den Nukleoli befindet. Allerdings konnte nach Überexpression dieses Proteins ebenfalls keine Veränderung in der Lokalisierung des endogenen PSF beobachtet werden (Abb. 31).

Die Deletion des La-Protein spezifischen NLS im GFP-hLa $\Delta$ 7-Fusionsprotein (Deletion aa 353-393) führt zur zytoplasmatischen Lokalisierung. Selbst diese drastische Änderung der Lokalisierung des überexprimierten La-Fusionsprotein GFP-hLa $\Delta$ 7 hatte jedoch ebenfalls keinen Einfluß auf die Lokalisierung des endogenen PSF (Abb. 31).

Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß die Überexpression verschiedener GFP-hLa-Fusionproteine, deren Lokalisierung sich durch Deletionen in bestimmten Bereichen von der Lokalisierung des GFP-hLa unterscheiden, keinen nachweisbaren Einfluß auf die Lokalisierung des endogenen PSF hat.



**Abb. 31: Lokalisierung von verschiedenen GFP-hLa Proteinen und endogenem PSF in HeLa-Zellen:** Das endogene PSF (endo-PSF) wurde mit mAb B92 detektiert (Verdünnung 1:1000). Die "Kombination" zeigt eine Überlagerung der GFP-hLa- und der PSF-Signale. Die Zellen wurden an Tag 2 nach Transfektion mittels Methanol/Aceton fixiert. Vergrößerung 100x

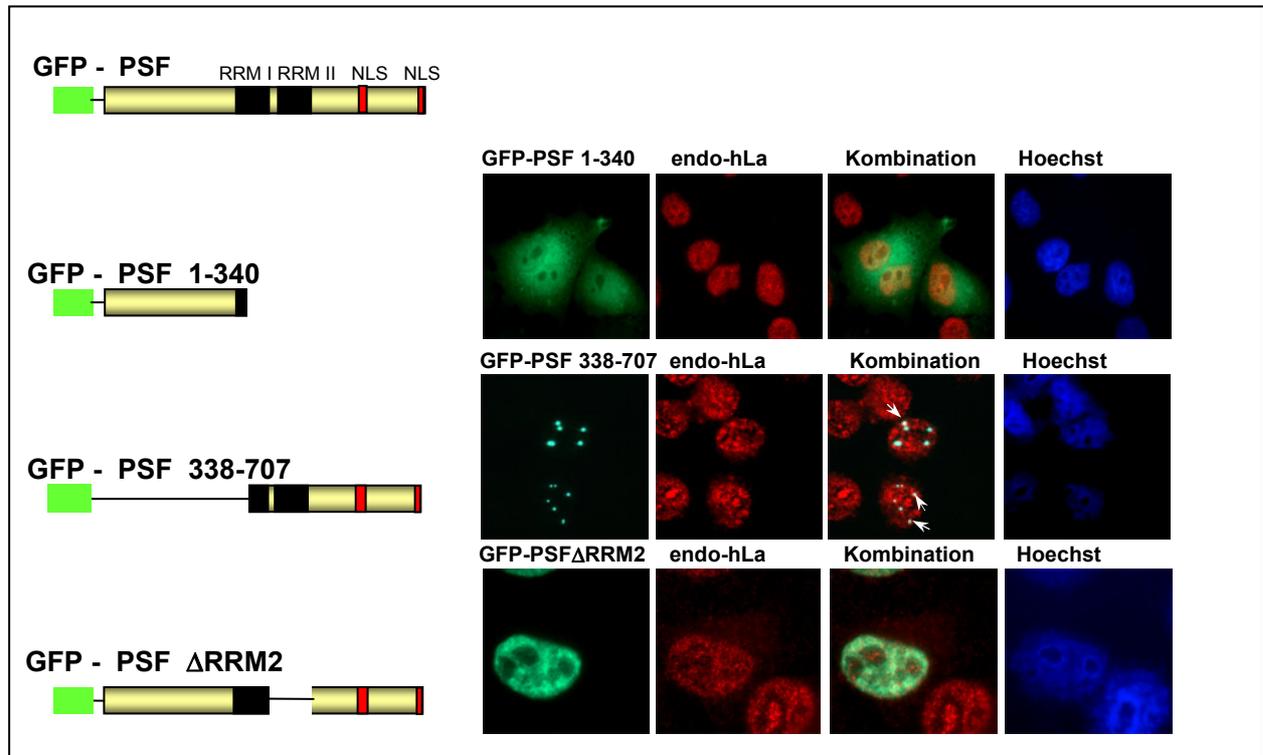
Im nächsten Schritt sollte der Einfluß der Überexpression verschiedener GFP-PSF Fusionsproteine, deren Lokalisierung sich ebenfalls durch Deletionen in bestimmten Bereichen von der Lokalisierung des PSF-Proteins voller Länge unterscheidet, auf die Verteilung des endogenen hLa-Proteins untersucht werden.

Die Deletion des carboxy-terminalen Bereiches von PSF, der die Kernlokalisierungssignale enthält, führt zu einer Verteilung von GFP-PSF 1-340 über die gesamte Zelle, wobei jedoch die Nukleoli ausgespart blieben (konsistent mit Beschreibung in (31)). Die Überexpression des GFP-PSF-Fusionsproteins 1-340 veränderte die Lokalisierung des endogenen hLa dahingehend, daß sich hLa jetzt nicht mehr in den Nukleoli sichtbar war (Vergleich Abb. 28 mit Abb. 32). Diese Beobachtung wurde auch schon nach Überexpression des GFP-PSF-Fusionsproteins gemacht (Abb.30).

Die Deletion des amino-terminalen Bereiches von PSF bis aa 338 führte zu einer verstärkten Akkumulation von PSF in den Spleißflecken. Nach Überlagerung mit dem endogenen hLa-Signal konnte in bestimmten Bereichen eine Kolokalisierung ausgemacht werden, allerdings war diese nur partiell (siehe Markierungen "→" in Abb. 32). Insgesamt war das endogene hLa-Protein wieder diffus im Zellkern verteilt und schien in den Nukleoli zu akkumulieren.

Die Mutante des PSF-Proteins mit der Deletion des RRM2 war nicht mehr im typischen Fleckenmuster lokalisiert, sondern diffus über den gesamten Zellkern verteilt. Auch hier

lokalisierte das PSF-Protein nicht in Nukleoli. Die Lokalisierung des endogenen hLa-Proteins war hier wieder diffus im Zellkern. Eine Fraktion des hLa-Proteins schien nach Überexpression des GFP-PSF $\Delta$ RRM2-Fusionsproteins in Nukleoli zu akkumulieren (Abb. 32).



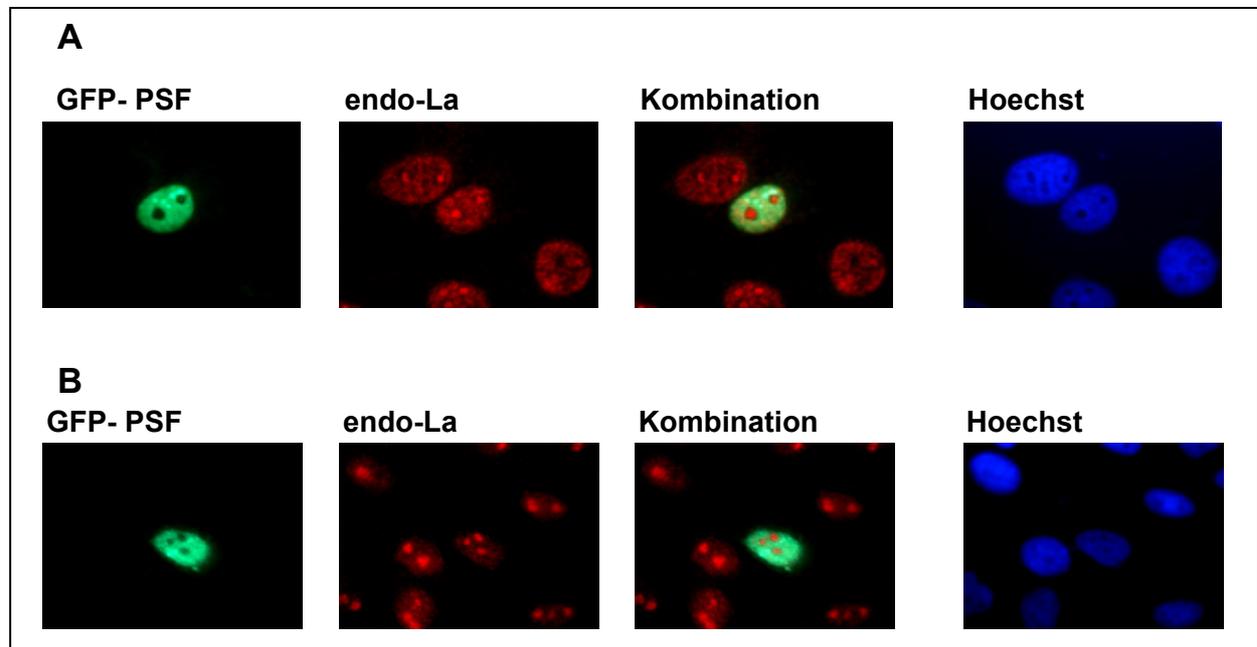
**Abb. 32: Lokalisierung von verschiedenen PSF-Deletionsmutanten, exprimiert als GFP-PSF-Fusionsproteine und Verteilung von endogenem hLa-Protein in HeLa-Zellen:** Das endogene hLa (endo-hLa) wurde mit mAb 3B9 detektiert (Verdünnung 1:500). Die "Kombination" zeigt eine Überlagerung der GFP-PSF- und der hLa-Signale. Die Zellen wurden an Tag 2 nach Transfektion mittels Methanol/ Aceton fixiert. Vergrößerung 100x

Weil in der Publikation von Bachmann et al. (12) gezeigt wurde, daß das endogene La-Protein in Nierenzellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze (CV-1 Zellen) in einem Fleckenmuster im Zellkern lokalisiert ist, wurde untersucht, ob zum einen mit den vorhandenen anti-La Antikörpern diese an die PSF-Proteinlokalisierung erinnernde Verteilung des La-Protein in CV-1 Zellen reproduziert werden kann, und ob diese La-Flecken eventuell mit exogen exprimiertem GFP-PSF-Fusionsprotein kolokalisieren.

Wie in Abbildung 33 gezeigt, war es mit den vorhandenen anti-La Antikörpern SW5 und 3B9 nicht möglich, das endogene La-Protein in nukleären Flecken zu zeigen. Das La-Protein zeigte auch hier bei Nachweise mit mAb anti-La 3B9 eine diffuse Verteilung im Zellkern (Abb. 33A). Beim Nachweis des La-Proteins mit dem mAb anti-La SW5 erschien es so, als ob das La-Protein in diesen Zellen stärker als in humanen Zellen in den Nukleoli lokalisiert (Abb. 33B). Diese Beobachtung steht aus unbekanntem Gründen im Gegensatz zu den Daten der Publikation, die mit dem Antikörper 1B5 eine Verteilung des endogenen La Proteins in CV-1 Zellen in

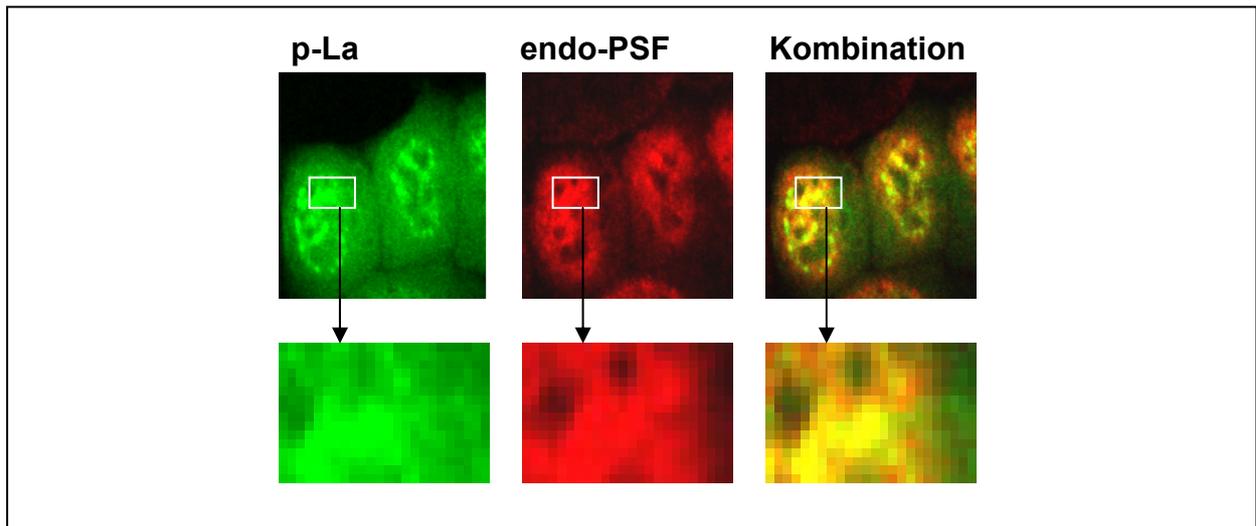
Spleißflecken zeigte und basierend auf dieser Beobachtung die Lokalisierung des endogenen La-Proteins als Zelltyp-abhängig beschrieb.

Eine Kolokalisierung von endogenem La-Protein und GFP-PSF-Fusionsprotein konnte auch in diesen Zellen nicht gezeigt werden ("Kombination" in Abb. 33A und B).



**Abb. 33: Lokalisierung von endogenem La und GFP-PSF in CV-1-Zellen:** A: Das endogene La wurde mit dem monoklonalen anti-La Antikörper 3B9 (Verdünnung 1:500) und in B mit dem mAb SW5 (Verdünnung 1:500) durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Die "Kombination" zeigt eine Überlagerung der GFP-PSF- und der La-Signale. Die Zellen wurden an Tag 2 nach Transfektion mittels Methanol/ Aceton fixiert. Vergrößerung 100x

Nach einer kürzlich erschienenen Publikation von Raats et al. (105), in der die Lokalisierung von phosphoryliertem hLa in Spleißflecken mittels eines entsprechenden mAbs im Zellkern beschrieben wurde, die der Lokalisierung von PSF sehr ähnlich ist, schien es denkbar, daß eventuell nur eine Subpopulation des hLa-Proteins mit PSF interagiert und kolokalisiert. Um dies zu untersuchen, wurde eine Kooperation mit dieser Arbeitsgruppe begonnen. In der indirekten Immunfluoreszenz konnte mit dem gleichen Phospho-hLa-spezifischen mAb gezeigt werden, daß das phosphorylierte hLa-Protein und endogenes PSF in bestimmten Flecken im Zellkern kolokalisieren ("Kombination" in Abb. 34). Allerdings konnte auch hier nur eine partielle Kolokalisierung in vereinzelten Spleißflecken gezeigt werden.



**Abb. 34: Partielle Kolokalisierung von endogenem phosphoryliertem hLa und endogenem PSF in HeLa-Zellen:** Das phosphorylierte La wurde mit einem rekombinanten monoklonalen Antikörper sichtbar gemacht (105). Das endogene PSF wurde durch den monoklonalen Antikörper B92 nachgewiesen (Verdünnung 1:1000). Die Überlagerung zeigt eine partielle Kolokalisierung. p – phosphoryliert; endo – endogen; Diese konfokalen Aufnahmen wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von J. Raats erstellt.

Somit konnte durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, daß zumindest eine Subpopulation von endogenem phosphoryliertem hLa (p-La) mit endogenem PSF kolokalisiert. Auch für PSF ist bisher nicht ausgeschlossen, daß es unterschiedliche Isoformen oder posttranslational modifizierte Varianten mit unterschiedlicher intrazellulärer Lokalisierung gibt.

Wegen der bekannten Assoziation von PSF mit der nukleären Matrix (94) und der in der vorliegenden Arbeit gezeigten starken Bindung des hLa-Proteins an PSF (siehe 4.2.4 und 4.3) schien es denkbar, daß durch eine Modulation der Fixierungsbedingungen La/ PSF-Proteinkomplexe *in situ* angereichert und dadurch leichter sichtbar gemacht werden könnten.

Durch die Präextraktion von Zellen mit Triton-X-100 vor der Fixierung mit Methanol/ Aceton (siehe 3.2.5.2) wurden sowohl das endogene hLa als auch das endogene PSF jedoch komplett aus den Zellen extrahiert. Auch verschiedene Inkubationszeiten mit Triton-X-100 von 30 sec bis 5 min änderten an diesem Ergebnis nichts. Diese Methode war deshalb zur Analyse der Kolokalisierung nicht geeignet.

Die Fixierung mittels Paraformaldehyd in CSK-Puffer (siehe 3.2.5.3) führte zu einer kompletten Extraktion von endogenem hLa. Das endogene PSF verblieb diffus im Zellkern ohne Anreicherung in Zellkernflecken und im Zytoplasma. Durch Fixierung mittels Paraformaldehyd in PHEM-Puffer (siehe 3.2.5.3) wurde das endogene PSF komplett aus den Zellen extrahiert, während das endogene hLa-Protein eine diffuse Verteilung über die gesamte Zelle zeigte. Die

GFP-Fusionsproteine waren von der Extraktion nicht betroffen und zeigten die Lokalisierung wie bei konventioneller Fixierung.

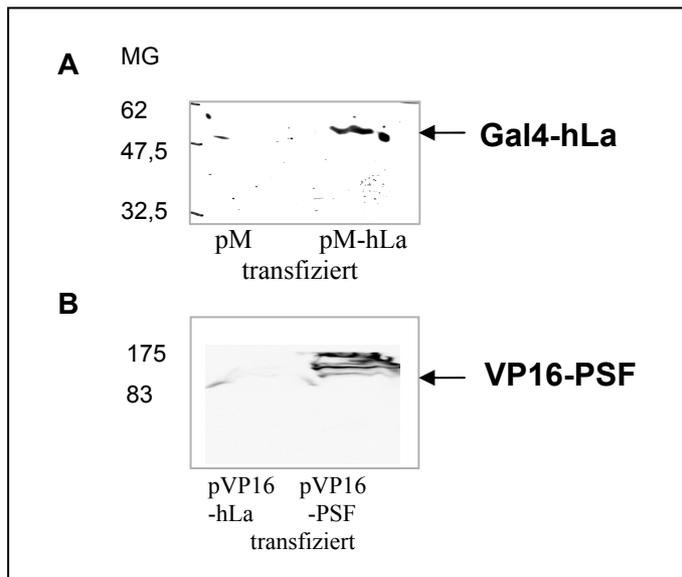
Zusammenfassend läßt sich sagen, daß eine Subpopulation des hLa-Proteins, die phosphorylierte Form, mit PSF in bestimmten Spleißflecken teilweise kolokalisiert (Abb. 34). Dies liefert einen weiteren experimentellen Hinweis für die Interaktion von PSF und hLa.

#### **4.5 Nachweis der La/ PSF Interaktion durch Säugetierzellen-2-Hybrid-System**

Um die oben beschriebene Interaktion zwischen La und PSF mit einer weiteren unabhängigen Methode zu untermauern, wurde das Säugetierzellen-2-Hybrid-System eingesetzt. Bei dieser Methode wird die Interaktion zweier Proteine durch die Expression des Reporter-Gens analysiert. Zur Bestätigung einer Interaktion von hLa und PSF wurde hLa in den Vektor pM, der die DNA-BD enthält, und PSF in den Vektor pVP16, der die AD enthält, kloniert. Um sicherzugehen, daß das die Gene für La und PSF sich auch tatsächlich im Leserahmen der Zielvektoren pM bzw. pVP16 befinden, wurden die Konstrukte sequenziert. Die Vektoren wurden zusammen mit dem Reporterplasmid in HeLa-Zellen transfiziert. Die Interaktion zwischen hLa und PSF konnte durch die Menge an exprimierter CAT an Tag 2 nach der Transfektion im ELISA charakterisiert werden. Als Positivkontrolle diente die Analyse der CAT Expression nach Expression der Fusionsproteine Gal4-p53 und VP16-T. Zur Negativkontrolle wurde die CAT-Expression untransfizierter Zellen, Zellen, die ausschließlich mit dem Reporterplasmid transfiziert wurden und Zellen, die mit den Plasmiden pM und pVP16 transfiziert wurden, herangezogen. Die Experimente wurden jeweils im Doppelansatz durchgeführt.

Um sicherzugehen, daß die Fusionsproteine auch tatsächlich exprimiert wurden, wurden 20 µg der Plasmide in 293T Zellen in einer 10-cm-Schale transfiziert. Die Zellen wurden in 100 µl SDS-Probenpuffer lysiert, sonifiziert und die Proteine des Lysats in einem 14%-igen SDS-PA Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Lysate im Western Blot mit einem anti-Gal4- bzw. anti-VP16-Antikörper analysiert.

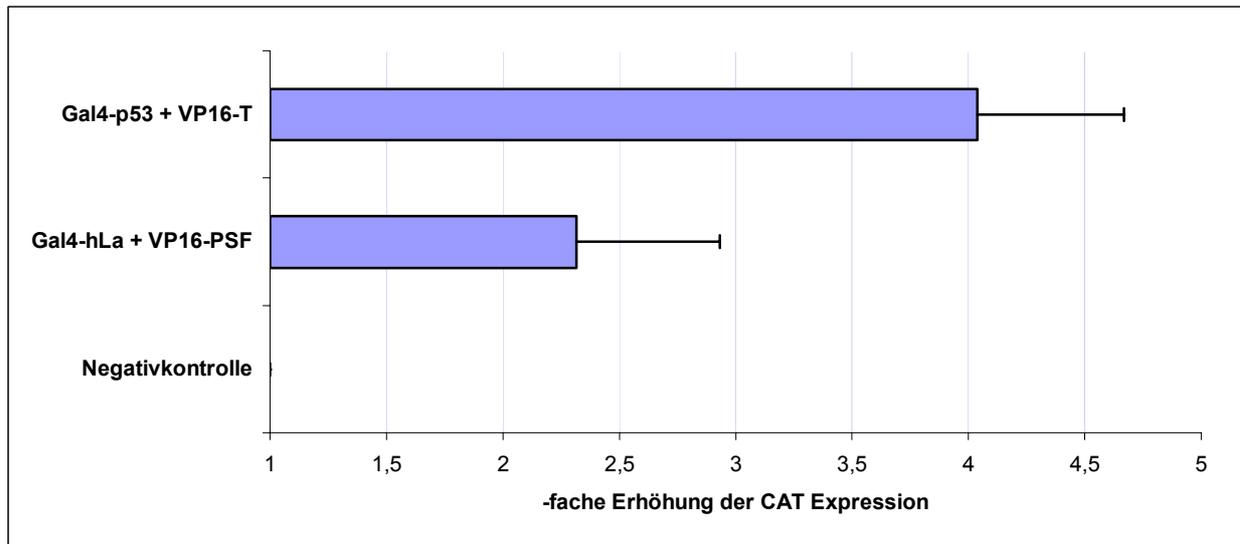
Abb. 35 zeigt, daß sowohl Gal4-hLa vom Vektor pM-hLa als auch VP16-PSF vom Vektor pVP16-PSF exprimiert wurden.



**Abb. 35: Expression von Gal4-hLa und VP16-PSF.** **A:** Gesamtlisat einer 10-cm-Schale 293T Zellen, transfiziert mit 20 µg pM-hLa, Western Blot Analyse mit polyklonalem anti-Gal4 Antikörper, Verdünnung 1:1500; **B:** Gesamtlisat einer 10-cm-Schale mit 293T Zellen transfiziert mit 20 µg pVP16-PSF; Western Blot Analyse mit monoklonalem anti-VP16 Antikörper, Verdünnung 1:750; Die Proteine der Lysate wurden in einem 14% igen SDS PA Gel aufgetrennt.

Zur Auswertung wurden die die Zellen an Tag 2 nach der Transfektion lysiert und im einem CAT ELISA nach Vorgaben des Herstellers bezüglich der CAT Expression analysiert (siehe 3.5.4.1). Es konnte gezeigt werden, daß die Kotransfektion von pM-hLa und pVP16-PSF zu einer 2,3 fachen Erhöhung der CAT-Expression gegenüber den Negativkontrollen führte. Die CAT Expression nach Kotransfektion von pM-p53 und pVP16-T führte im Mittel zu einer 4 fachen Erhöhung (Abb. 36). Die Interaktion von hLa und PSF ist also im Vergleich zur starken Interaktion von p53 und dem T-Antigen von SV40 als geringer einzustufen. Nach Einbeziehung der oben aufgeführten Negativkontrollen kann dennoch geschlossen werden, daß PSF und hLa in der Zelle miteinander interagieren und so die CAT-Expression regulieren.

Die Auswertung in Abb. 36 zeigt Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten nach Abgleich der Gesamtproteinkonzentration, bestimmt nach Bradford, und Abgleich der Transfektionseffizienz, bestimmt anhand der GFP-Signalintensität in der Western-Blotanalyse. Exemplarisch ist die Auswertung mit den Originalwerten der CAT-Expression und dem Abgleich mit den jeweiligen Kontrollen im Anhang wiedergegeben.



**Abb 36: Nachweis der Interaktion von hLa und PSF im Säugetierzellen-2-Hybrid-System:** Die CAT-Expression ist durch die Interaktion von La und PSF deutlich erhöht. Die Grafik spiegelt die Auswertung von 5 unabhängigen Experimenten wieder, die jeweils im Doppelansatz durchgeführt wurden. Die Negativkontrolle umfaßt die CAT-Expression in nicht-transfizierten Zellen, Zellen, die nur mit pG5CAT, und Zellen, die mit pVP16, pM und pG5CAT transfiziert wurden.

Nachdem gezeigt werden konnte wurde, daß hLa und PSF miteinander interagieren, wurde die Methode des Säugetierzellen-2-Hybrid-Systems auch gewählt, um die mögliche Bindungsstelle von hLa an PSF grob zu kartieren. Zu diesem Zweck wurden verschiedene hLa Mutanten an Gal4-DBD fusioniert. Abb. 37 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Konstrukte.

Bezeichnung der Mutation	deletierter Bereich	Region in La
pM-hLa $\Delta$ C	aa 222-384	carboxyterminale Hälfte (Kernlokalisierungssignal bleibt erhalten)
pM-hLa $\Delta$ 1	aa 11-99	konserviertes La-Motiv ((86), (87))
pM-hLa $\Delta$ 6	aa 274-354	vorhergesagte Dimerisierungsdomäne (62)
pM-hLa $\Delta$ 7	aa 353-393	Kernlokalisierungssignal (119)

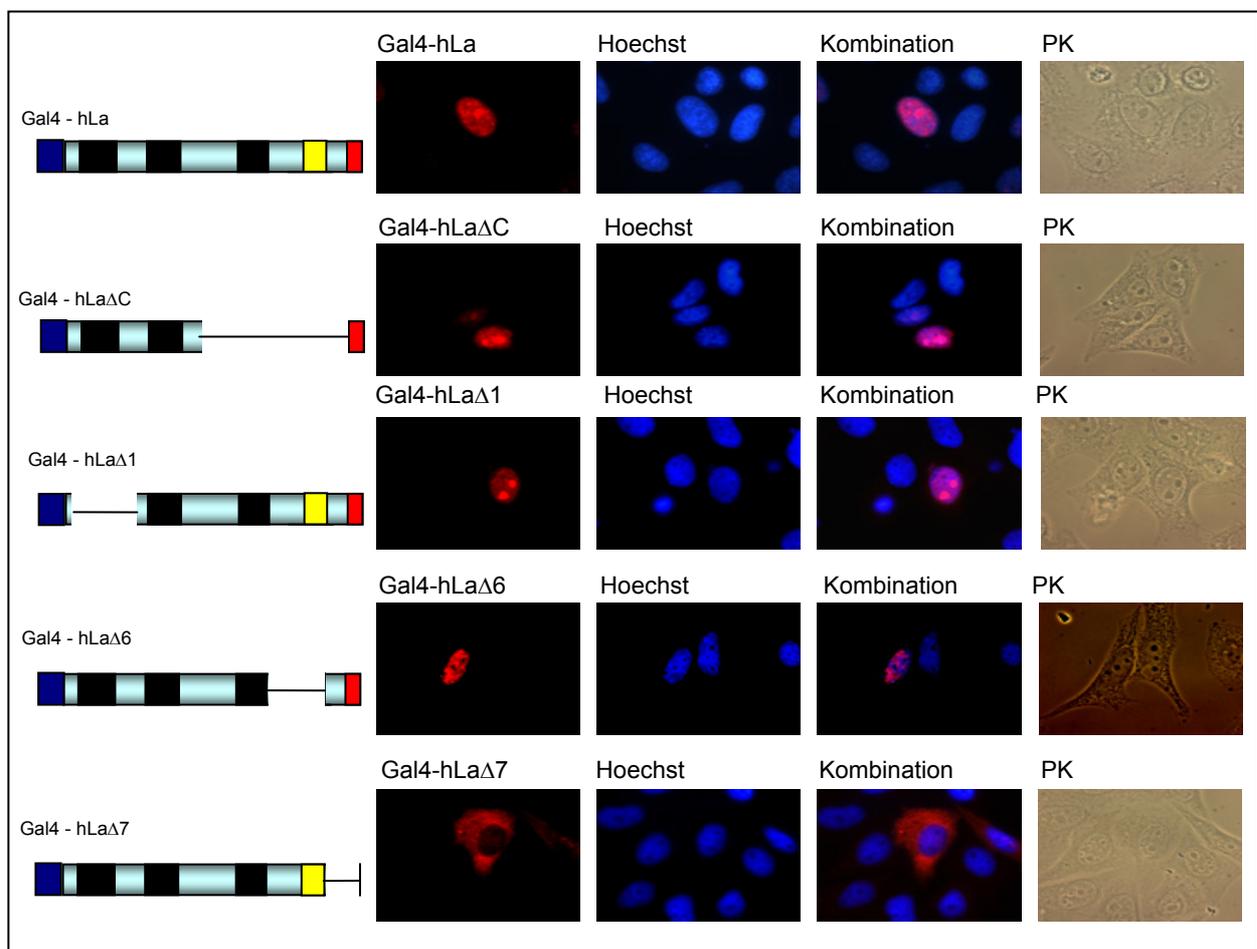
**Abb. 37: Übersicht über die verwendeten Konstrukte zur Charakterisierung der Interaktionsdomäne des hLa-Proteins und PSF.** aa – Aminosäure; RRM – RNA-Erkennungsmotiv

Die Konstrukte wurden ebenfalls sequenziert und die Fusionsproteine auf ihre Expression hin in HeLa-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

Es zeigte sich, daß die Fusion von Gal4-DBD an hLa zu einer Akkumulation in bestimmten Bereichen des Zellkerns führte. Der Vergleich der Hoechst-gefärbten Zellkerne mit den Kernstrukturen sichtbar im Phasenkontrastmikroskop ließ vermuten, daß es sich bei diesen Bereichen um die Nukleoli handelt (Abb. 38). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der Lokalisierung von GFP-hLa (Abb. 29), die eine diffuse Verteilung über den gesamten Zellkern zeigte. Die Fusion von Gal4-DBD an hLa $\Delta$ 1 und hLa $\Delta$ C führte sogar noch zu einer Verstärkung

dieser Akkumulation in den Nukleoli (Abb. 38). Von GFP-La $\Delta$ 1 ist bekannt, daß es die gleiche Verteilung zeigt wie GFP-hLa (63). Eine Akkumulation in bestimmten Bereichen des Zellkerns ist aber für dieses deletierte La-Protein nicht beschrieben.

Die Fusionsproteine Gal4-hLa $\Delta$ 6 und Gal4-hLa $\Delta$ 7 zeigten eine Verteilung, wie sie für die jeweiligen GFP-Fusionsproteine beobachtet wurde (Vergleich Abb. 31 mit Abb. 38). Die Deletion in der vorhergesagten Dimerisierungsdomäne des hLa-Proteins (entspricht hLa $\Delta$ 6) führte dazu, daß das Fusionsprotein diffus im Kern unter Ausparung der Nukleoli verteilt war. Die Deletion des hLa-spezifischen Kernlokalisierungssignals (entspricht hLa $\Delta$ 7) führte dazu, daß das Fusionsprotein ausschließlich zytoplasmatisch lokalisierte.



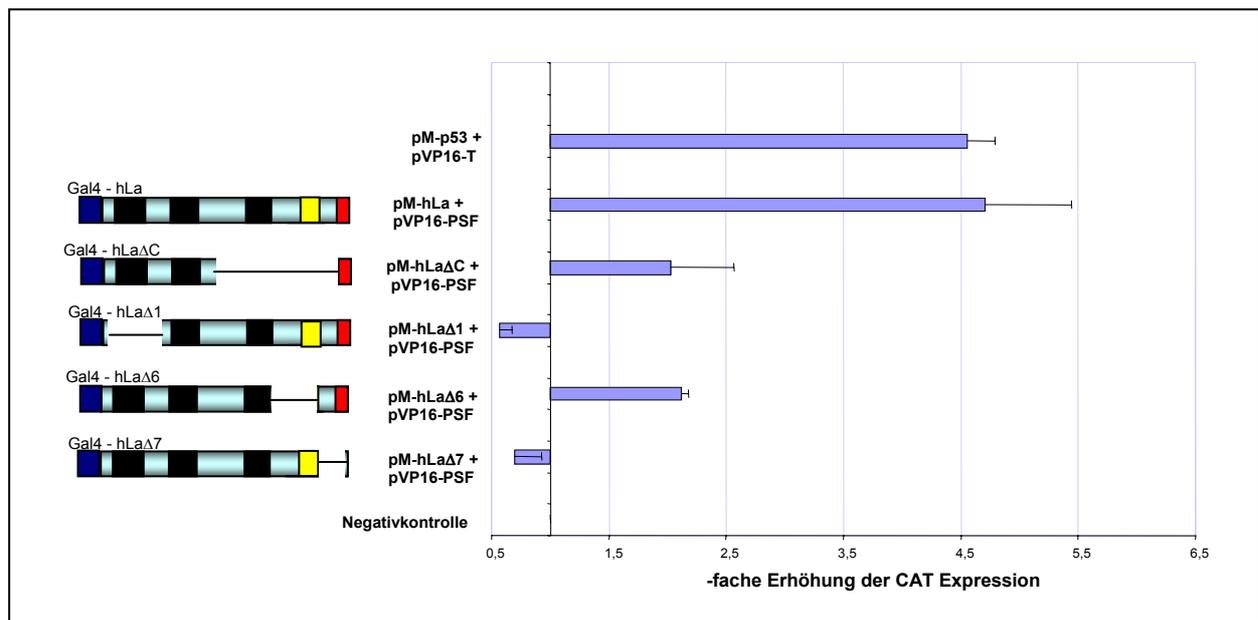
**Abb. 38: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie zum Nachweis der Expression von Gal4-hLa-Fusionsproteinen in HeLa Zellen.** Die Fusionsproteine wurden durch den monoklonalen anti-Gal4 Antikörper (Verdünnung 1:1000) sichtbar gemacht. Die "Kombination" zeigt eine Überlagerung der Gal4-hLa- und der Hoechst-Signale. Die Zellen wurden an Tag 2 nach Transfektion mittels Methanol/ Aceton fixiert. PK – Phasenkontrast; Vergrößerung 100x

Im Säugetierzellen-2-Hybrid-System und anschließendem CAT ELISA konnte gezeigt werden, daß die Kotransfektion von pM-hLa $\Delta$ 1 zusammen mit pVP16-PSF die CAT-Expression nicht induziert (Abb. 39). Möglicherweise interagiert dieses Protein nicht mit PSF, weil sich die

Deletionsmutante des La-Proteins in der Lokalisierung von der des Wildtyp-hLa-Proteins unterscheidet.

Die Kotransfektion von pM-hLa $\Delta$ 7 und pVP16-PSF führte ebenfalls nicht zur Induktion der Expression von CAT. Auch hier könnte dies auf den gravierenden Unterschied in der intrazellulären Lokalisierung der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp-hLa-Protein zurückzuführen sein.

Die Kotransfektion von pM-hLa  $\Delta$ C und pM-hLa  $\Delta$ 6 zusammen mit pVP16-PSF führte zu einer verminderten CAT-Expression im Vergleich zu pM-hLa und pVP16-PSF, die in diesen Experimenten signifikant erhöht war.



**Abb. 39: Nachweis der Interaktion der Proteine hLa und PSF im Säugetierzellen-2-System:** Die Kotransfektion von Gal4-hLa-Mutanten, deletiert im aminoterminalen Bereich oder in der Kernlokalisationssequenz, mit PSF induziert nicht die Expression von CAT. Die Grafik spiegelt die Auswertung von 2 unabhängigen Experimenten wieder, die jeweils im Doppelansatz durchgeführt wurden. Die Negativkontrolle umfaßt die CAT Expression in nicht-transfizierten Zellen, Zellen, die nur mit pG5CAT, und Zellen, die mit pVP16, pM und pG5CAT transfiziert wurden.

Die vorliegenden Daten zeigen, daß hLa und PSF in Säugerzellen interagieren. Die Versuche, die Interaktionsdomäne zu beschreiben, die die Bindung von hLa an PSF vermitteln könnte, führten zu der interessanten Beobachtung, daß Gal4-hLa Fusionsproteine, die durch eine Deletion im Zytoplasma lokalisieren (Gal4-hLa $\Delta$ 7), bzw. in den Nukleoli lokalisiert ist (Gal4-hLa $\Delta$ 1) nicht mit PSF interagieren. Die Interaktion mit PSF findet also nur mit hLa statt, welches im Zellkern und dort nicht in den Nukleoli lokalisiert ist. Diese Beobachtung ist konsistent mit der Kopräzipitation von PSF mit GFP-hLa und GFP-hLa $\Delta$ 6, und damit, daß PSF nur in geringen Teilen mit GFP-hLa $\Delta$ 7 präzipitiert werden konnte (Abb. 27). Die Koimmunpräzipitationsstudien

ließen auf eine Interaktion von PSF mit hLa $\Delta$ 1 schließen, konnten aber im Säugetierzellen-2-Hybrid System bisher nicht bestätigt werden.

## 4.6 Interaktion von PSF und HBV-RNA.B

In den oben beschriebenen Studien wurde PSF als Interaktionspartner des hLa-Proteins identifiziert. Diese Interaktion wurde anschließend hinsichtlich ihrer Bedeutung in der Replikation von HBV untersucht.

Da beide Proteine RNA-bindende Proteine sind (Übersichtsartikel (117) und (132)) sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Interaktion auf die Bindung des hLa-Proteins an HBV-RNA.B hat, und ob durch die Interaktion mit PSF möglicherweise das hLa-Protein aus einem hLa/HBV-RNA Komplex durch z.B. Änderung der Konformation herausgelöst werden kann. Durch ein solches Ereignis könnte die Stabilisierung der HBV-RNA durch das La-Protein aufgehoben werden und die HBV-RNA könnte degradiert werden.

Die Interaktion des rekombinanten hLa-Proteins mit HBV-RNA.B wurde bereits im Detail beschrieben (62). PSF bindet *in vitro* u.a. an U5-snRNA (102). In dieser Studie wurden aufgrund von SELEX Analysen verschiedene RNA-Sequenzen identifiziert, die von PSF präferentiell gebunden werden. Nachdem diese Sequenzen mit der Datenbank verglichen wurden, konnte eine 89%ige Homologie von einer dieser Sequenzen zur HBV-RNA festgestellt werden. Diese potentielle PSF-Bindungsstelle (nts 1305-1323) befindet sich in unmittelbarer Nähe der La-Bindungsstelle (nts 1273-1290). In sogenannten „*electromobility shift assays*“ (EMSA) sollte daher zunächst geklärt werden, ob PSF tatsächlich an HBV-RNA.B bindet. Hierzu mußte PSF rekombinant hergestellt und aufgereinigt werden.

### 4.6.1 Aufreinigung von His<sub>6</sub>-PSF aus Prokaryoten

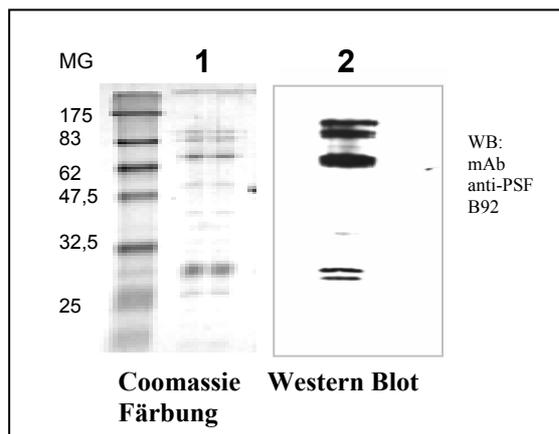
Für die Analyse der Bindung von PSF an HBV-RNA.B mußte das rekombinant hergestellte Protein zunächst aufgereinigt werden.

Die cDNA-Sequenz des in dieser Studie benutzten PSF-Proteins lag einkloniert in einen pET15b-Vektor vor (freundliche Gabe von J. Patton). In diesem Vektor ist die Expression des PSF-Proteins unter der Kontrolle eines mit IPTG-induzierbaren T7-Promotors. Das Protein wurde mit einer amino-terminalen His<sub>6</sub>-Markierung versehen, welcher eine Aufreinigung des Proteins mittels Ni-NTA-Technologie ermöglichte.

Nach der unter 3.1.5 beschriebenen Expression des Proteins wurde aus den *E.coli* Zellen ein Lysat hergestellt, welches alle löslichen und nicht sezernierten Proteine enthält. Die intensive heterologe Expression rekombinanter Proteine kann in *E.coli* zur Bildung von Einschlußkörpern

(engl.: *inclusion bodies*) führen, welche große Mengen dieses Proteins enthalten. Da diese Kompartimente durch eine native Aufreinigung nicht aufgeschlossen werden und das Protein somit verloren gehen könnte, kann die Zugabe von Harnstoff unter Umständen die Ausbeute an Protein durch Aufschluß dieser Körperchen beträchtlich erhöhen.

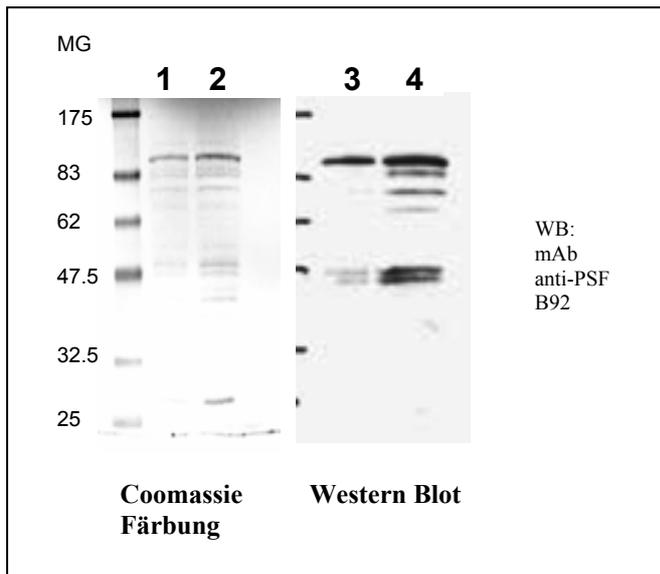
Die Reinigung erfolgte zunächst unter nativen Bedingungen (siehe 3.3.1.2). Das Eluat wurde in der SDS-PAGE analysiert. Durch die Färbung des 12,5% igen SDS-PA Gels mittels Coomassie (siehe 3.4.2.1) wurden mehrere Banden sichtbar. Hauptsächlich wurde eine Doppelbande bei einem Molekulargewicht von ca. 28 kD, eine Bande bei ca. 60 kD, eine Bande bei ca. 70 kD und eine weitere Doppelbande bei ca. 83 kD nachgewiesen (siehe Abb. 40; Spur 1). Die Western-Blotanalyse des Eluates mit dem monoklonalen Antikörper B92 gegen PSF zeigte, daß die Doppelbanden bei ca. 28 kD und ca. 83 kD immunreaktiv sind. Zusätzlich wurde eine dominante Bande bei ca. 60 kD vom mAb anti-PSF B92 erkannt (siehe Abb. 40; Spur 2). Bei einer Aufreinigung unter nativen Bedingungen kam es offensichtlich zur Degradation des ca. 100 kD großen Proteins PSF.



**Abb. 40: Darstellung der Eluate nach Aufreinigung des rekombinanten PSF-Proteins unter nativen Bedingungen:** Das rekombinante PSF konnte unter diesen Bedingungen nur sehr grob gereinigt werden. Spur 1: Coomassie Färbung: 1 µg der Proteine des His<sub>6</sub>-PSF Eluates wurden aufgetragen; Spur 2: Western Blot mit monoklonalem anti-PSF Antikörper B92 (Verdünnung 1:2000): 2 µg der Proteine des His<sub>6</sub>-PSF Eluates wurden aufgetragen. Die Proteine der Eluate wurden in einem 12,5% igen SDS PA Gel aufgetrennt.

Um mögliche unlösliche Aggregate des His<sub>6</sub>-PSF-Proteins in den "*inclusion bodies*" aufzulösen und die dann löslichen Proteine der Aufreinigung zugänglich zu machen, wurde die Aufreinigung auch unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (siehe 3.3.1.3). Nachdem das eluierte His<sub>6</sub>-PSF durch Dialyse gegen abnehmende Mengen Harnstoff bis zu einer Konzentration von 0 renaturiert wurde, wurden 5 und 10 µg der Proteine des Eluates in der SDS-PAGE in einem 12,5%igen Gel aufgetrennt und die Proteine mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Abb. 41 zeigt, daß das rekombinante PSF-Protein unter denaturierenden Bedingungen mit einer sehr viel höheren Reinheit gewonnen werden konnte. Es wurde eine dominante Bande bei ca. 100 kDa nach der Coomassie-Färbung detektiert, die auch durch den monoklonalen anti-PSF Antikörper B92 erkannt wurde. Außerdem wurde eine Doppelbande bei ca. 50 kD durch Coomassie angefärbt, die ebenfalls von B92 erkannt wurde (Abb. 41; Vergleich Spuren 1 und 2

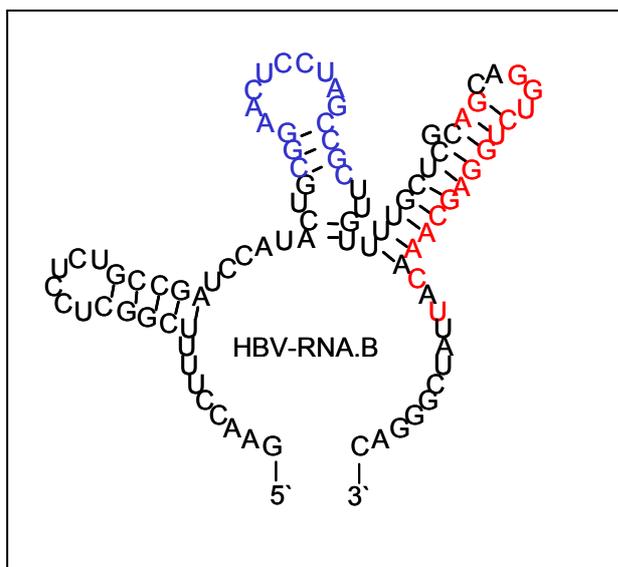
mit Spuren 3 und 4). Wahrscheinlich handelt es sich auch hierbei um ein Degradationsprodukt von PSF.



**Abb. 41: Darstellung der Proteine der Eluate nach Aufreinigung des rekombinanten PSF-Proteins unter denaturierenden Bedingungen:** Das rekombinante PSF-Protein voller Länge konnte unter diesen Bedingungen besser gereinigt werden. Spuren 1 und 2: Coomassie Färbung: 5 µg bzw. 10 µg der Proteine des His<sub>6</sub>-PSF Eluates wurden aufgetragen; Spuren 3 und 4: Western Blot mit monoklonalem anti-PSF Antikörper B92 (Verdünnung 1:2000): 5 µg bzw. 10 µg der Proteine des His<sub>6</sub>-PSF Eluates wurden aufgetragen. Die Eluate wurden in einem 12,5% igen SDS PA Gel aufgetrennt.

#### 4.6.2 PSF bindet an HBV-RNA.B

Es war bekannt, daß das mLa-Protein spezifisch an eine Haarnadelschleifenstruktur der HBV-RNA bindet (57). Dieser Bereich umfaßt die Region nt 1243-1333 der viralen RNA und wird im Nachfolgenden als HBV-RNA.B bezeichnet (siehe Abb. 42). Im Gegensatz zur spezifischen Bindung des mLa-Proteins in *UV-Crosslink* Experimenten (58) war die Bindung von rekombinantem hLa-Protein an HBV-RNA.B in EMSAs unspezifisch, aber hoch-affin ((62), (32)).



**Abb 42: Computer-vorhergesagte Struktur der HBV-RNA.B** (aus (56)). Die hLa-Bindungsstelle (nt 1273-1290) auf der HBV-RNA ist blau gekennzeichnet. Die potentielle PSF Bindungsstelle (nt 1305-1323) ist rot markiert.

Aufgrund von SELEX Analysen waren bereits bestimmte RNA-Sequenzen bekannt, von denen vermutet wird, daß das PSF-Protein an diese präferentiell bindet (102). Nach dem Vergleich dieser Sequenzen mit der Sequenz der HBV-RNA zeigte sich, daß drei Regionen (nt 200-216; nt

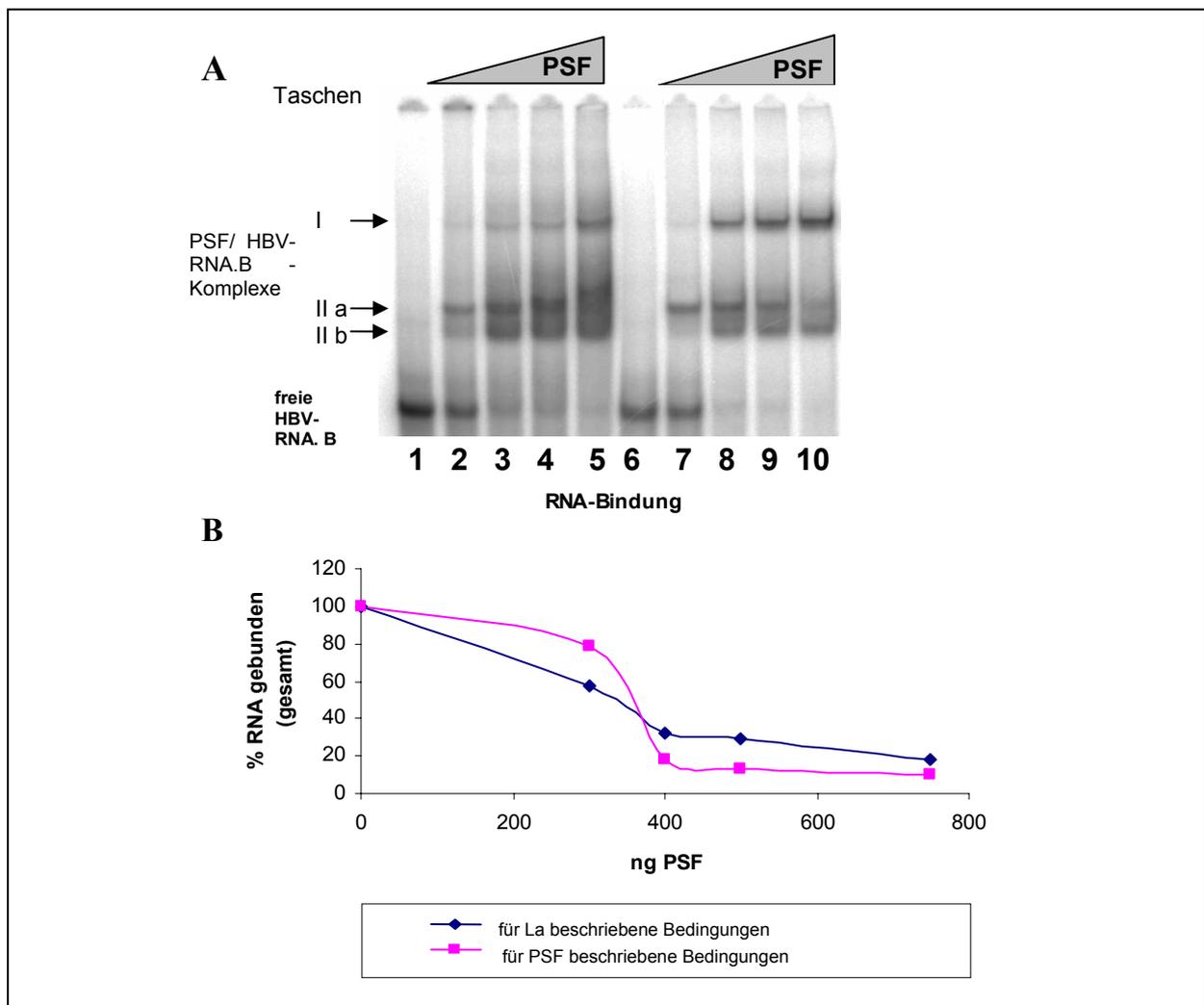
1304-1322 und nt 2231-2243) hohe Homologie zu potentiellen PSF-Bindungsstellen aufwiesen. Die RNA-Sequenz mit der höchsten Homologie von 89% wurde in dem Bereich der HBV-RNA.B gefunden (Abb. 42, blau markiert). Somit bestand die Möglichkeit, daß das PSF-Protein an die Region nt 1304-1323 der HBV-RNA bindet.

Diese Hypothese sollte nun experimentell belegt werden. Hierzu wurde die Bindung des rekombinant hergestellten PSF-Proteins an die *in vitro* transkribierte, radioaktiv-markierte HBV-RNA.B in einem nativen EMSA untersucht. Die Analysen wurden wie unter 3.7.4 beschrieben durchgeführt. In einer ersten Analyse wurde die Bindung von PSF an HBV-RNA.B unter Bedingungen durchgeführt, die als optimale Bedingungen für die Bindung von hLa an HBV-RNA.B beschrieben wurden (62). Im Vergleich zu diesem Ansatz wurde die Bindung von PSF an HBV-RNA.B unter Bedingungen untersucht, die für die Bindung von PSF an U5-snRNA beschrieben wurde (102).

Es zeigte sich, daß das PSF-Protein unter beiden Bedingungen an HBV-RNA.B bindet (siehe Abb. 43). Die Bindung von PSF an die radioaktiv-markierte HBV-RNA.B führte zur Ausbildung von drei Protein/ RNA-Komplexen unterschiedlicher Mobilität. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um einen Komplex mit PSF-Protein voller Länge mit RNA (Abb. 43; I) und um zwei PSF-Degradationsprodukte, die auch an HBV-RNA.B binden können (Abb. 43; II a und b).

Die Quantifizierung der Menge an gebundener RNA (Abb. 43B) ergab, daß die Gesamt-HBV-RNA.B unter den unterschiedlichen Bedingungen gleich gut bindet. Es konnte allerdings beobachtet werden, daß unter den Bedingungen, die für die Bindung des hLa-Proteins als optimal beschrieben wurden, die Komplexe II a und II b im Vergleich zur Ausbildung des Komplexes I bevorzugt gebildet werden. Im Gegensatz dazu wurde unter den Bedingungen, die für die Bindung von PSF an U5-snRNA beschrieben sind, die Ausbildung des Komplexes I im Vergleich zu den Komplexen II a und II b bevorzugt.

Da angenommen wird, daß es sich bei Komplex I um einen Komplex aus PSF voller Länge mit HBV-RNA.B handelt, wurden in weiteren Experimenten die von Peng et al. beschriebenen Bedingungen (102) gewählt.



**Abb. 43: PSF bindet an HBV-RNA.B:** Im nativen EMSA konnte gezeigt werden, daß PSF unter verschiedenen Bedingungen an HBV-RNA.B bindet. A: Es wurden jeweils steigende Konzentrationen an PSF (0, 300, 400, 500, 750 ng) gegen eine konstante Konzentration (10 fmol) an HBV-RNA.B titriert. Spuren 1-5 zeigen die Bindung von PSF an HBV-RNA.B unter den für das La-Protein beschriebenen Bedingungen. Spuren 6-10 zeigen die Bindung unter den für das PSF-Protein beschriebenen Bedingungen. Spur 1 und Spur 6 zeigen die HBV-RNA.B ohne Zusatz von PSF-Protein. B: Quantitative Analyse der PSF/ HBV-RNA.B-Komplexbildung. Es wurde die prozentuale Zunahme des  $^{32}\text{P}$ -RNA-Signals gegen die Zunahme der PSF-Konzentration aufgetragen.

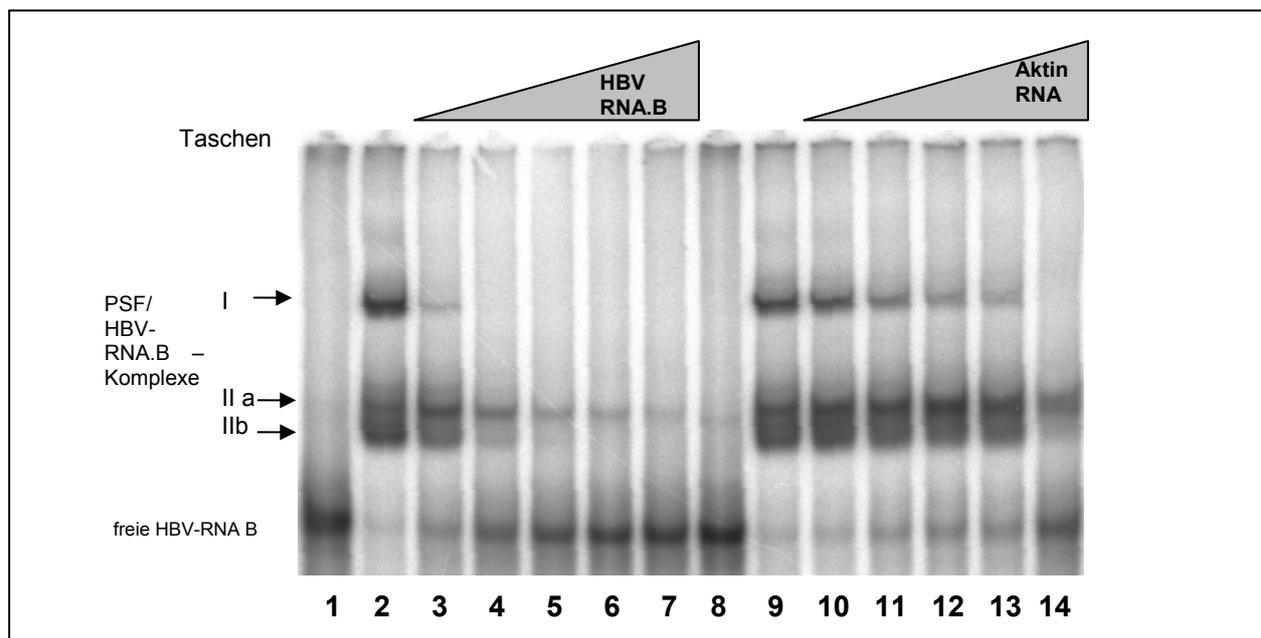
Die Bindungsanalysen zeigten, daß rekombinantes PSF-Protein mit der HBV-RNA.B unter verschiedenen Bedingungen interagiert. Bei einer Zugabe von 400 ng PSF-Protein zu 10 fmol radioaktiv markierter HBV-RNA.B war die Bindung optimal. Diese Mengen an rekombinantem PSF-Protein und HBV-RNA.B wurden daher in den folgenden Experimenten eingesetzt. Das Signal der radioaktiv-markierten RNA war in einem linearen Detektionsbereich, sodaß eine Quantifizierung im Phosphoimager möglich war.

In den vorliegenden Analysen konnte PSF als ein bisher nicht beschriebenes HBV-RNA.B-bindendes Protein identifiziert werden.

### 4.6.3 Spezifität der Bindung von PSF an HBV-RNA.B

Um die Eigenschaft der Bindung von rekombinantem PSF-Protein an HBV-RNA.B näher zu charakterisieren, wurde die Spezifität dessen Bindung an HBV-RNA.B im nativen EMSA analysiert. Hierzu wurden konstante Konzentrationen an PSF-Protein und radioaktiv markierter HBV-RNA.B mit steigenden Konzentrationen an nicht-markierter HBV-RNA.B bzw. eines Fragmentes eines Aktintranskriptes inkubiert. Die nicht-markierten RNAs kompetieren hierbei mit der radioaktiv-markierten HBV-RNA.B um die Bindung durch PSF. Die Spezifität wird so über das Maß der Kompetition ausgedrückt. Ein Überschuss an spezifisch bindender, nicht-markierter RNA verdrängt die radioaktiv-markierte RNA, sodaß die Signalintensität für den Komplex aus Protein/radioaktiv-markierte RNA abnimmt, während ein Überschuss an unspezifisch bindender, nicht-markierter RNA keinen Einfluß auf die Signalintensität des Komplexes hat.

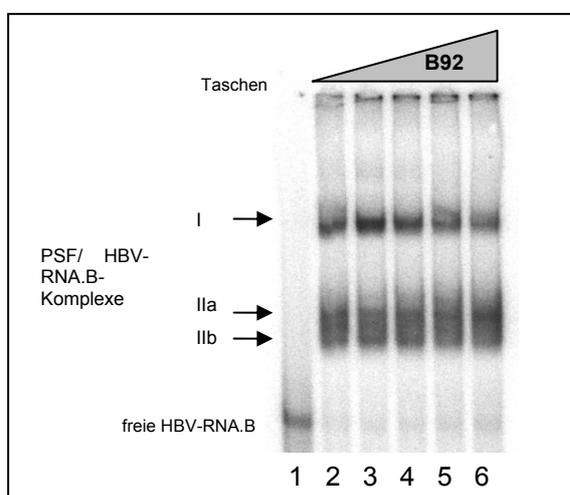
Die RNAs der Kompetitoren wurden ebenfalls durch *in vitro* Transkription synthetisiert. Diese Synthese beinhaltet im Gegensatz zu jener für die HBV-RNA.B keine radioaktive Markierung, und die Quantifizierung erfolgte photometrisch. Die Konzentrationen der Kompetitoren wurden in den Versuchen stufenweise erhöht und lagen bei einem bis zu 500-fachen molaren Überschuss gegenüber der radioaktiv markierten HBV-RNA.B.



**Abb. 44: PSF bindet HBV-RNA.B spezifisch:** A: Je 400 ng PSF-Protein wurden mit 10 fmol  $^{32}\text{P}$ -markierter HBV-RNA.B und ohne (Spur 2 und 9) oder mit (Spur 3-7 und Spur 10-14) steigenden Konzentrationen an nicht-markierter HBV-RNA.B oder Aktin-RNA inkubiert und im EMSA analysiert. Der molare Überschuss der Kompetitoren war 0, 10, 50, 100, 200 und 500fach. In Spur 1 und 8 wurde die  $^{32}\text{P}$ -markierte HBV-RNA.B ohne Protein und ohne Kompetitoren aufgetragen.

Wie aus Abb. 44 ersichtlich, kompetierte die nicht-markierte HBV-RNA.B in einem höheren Maß als das nicht-markierte Aktin-Transkript. Die Wirkung auf den Komplex I war hierbei deutlicher, als auf die Komplexe II a und II b. Das deutet darauf hin, daß dieser Komplex I insgesamt weniger spezifisch ist (Abb. 44; Vergleich Spuren 2-7 mit Spuren 9-14). Die Quantifizierung der Signalintensitäten im Phosphoimager bestätigte diesen visuellen Eindruck. Während die Zugabe eines 10 molaren Überschusses an nicht-markierter HBV-RNA.B bereits zu einer Reduktion des RNA-Signals um 65% führte, wäre ein ca. 400 molarer Überschuß an nicht-markierter Aktin-mRNA nötig, um zu einer solchen Reduktion zu führen. Die Bindung von PSF an HBV-RNA.B kann somit als spezifisch bezeichnet werden.

Um zu beweisen, daß es sich bei dem HBV-RNA.B bindenden Protein tatsächlich um PSF handelt und nicht um kontaminierende bakterielle Proteine, die unabsichtlich mit aufgereinigt wurden, wurden 400 ng PSF-Protein mit steigenden Konzentrationen des monoklonalen anti-PSF Antikörpers B92 für 1 h auf Eis inkubiert, bevor die HBV-RNA.B dazugegeben wurde. Die Bindung des Antikörpers an das Protein sollte einen Komplex mit der RNA bilden, der aufgrund der stark erhöhten Masse im nativen Gel sehr viel höher laufen sollte als der Protein/ RNA-Komplex. Wie Abb. 45 zeigt, wurde ein solcher Komplex nicht beobachtet. Auch die Auflösung des Protein/ RNA-Komplexes, die potentiell durch die höhere Affinität des Antikörpers zum Protein induziert werden könnte, wurde nicht beobachtet. Die Zugabe des anti-PSF mAb B92 führte im Gegensatz zu einer Zunahme der Signalintensität in den Taschen, sodaß angenommen wird, daß der Protein/ RNA-Komplex durch die Zugabe des Antikörpers so groß (und vielleicht auch noch stabiler) geworden ist, daß er nicht mehr in das 8%-ige Polyacrylamidgel einlaufen konnte. Außerdem war mit zunehmender Menge an zugegebenem Antikörper eine Abnahme der Signalintensität des Komplexes I um bis zu 25% bei 16 µg mAb B92 zu beobachten, während die Signalintensität der Komplexe II a und II b nicht vermindert wurde.



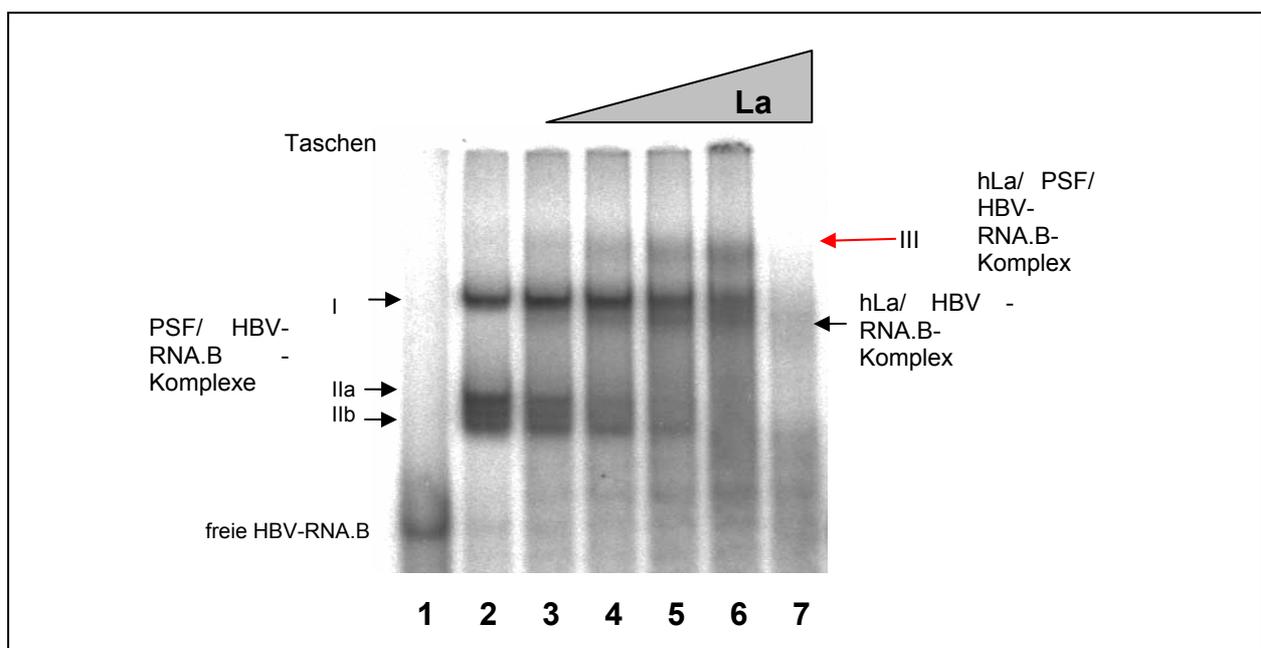
**Abb. 45. Die Zugabe von anti-PSF mAb B92 führt nicht zu einem Supershift des PSF/ HBV-RNA.B-Komplexes:** Es wurden jeweils 4 µg, 8 µg, 12 µg und 16 µg an anti-PSF mAb B92 mit 400 ng PSF vor der Zugabe von 10 fmol radioaktiv-markierter HBV-RNA.B inkubiert. Spur 1: 10 fmol HBV-RNA.B; Spur 2: 400 ng PSF + 10 fmol HBV-RNA.B. Spuren 3 bis 6: wie Spur 2 aber mit steigenden Mengen an anti-PSF mAb B92

Mit dem verfügbaren mAb anti-PSF B92 war es nicht möglich, einen Beweis dafür zu erbringen, daß es sich bei dem Protein, das zur Bildung eines Protein/ HBV-RNA.B Komplexes führte, tatsächlich um PSF handelt. Um diese zentrale Frage zu klären, müßten in Zukunft entweder ein anderer Antikörper oder andere Methoden gewählt werden.

#### 4.7 Bindung von PSF und hLa an HBV-RNA.B *in vitro*

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde publiziert, daß rekombinantes hLa-Protein im nativen EMSA an HBV-RNA.B bindet (62). Da PSF, wie oben gezeigt (Abb. 43 und Abb. 43), ebenfalls an diese RNA bindet und eine Interaktion der beiden Proteine gezeigt wurde (siehe 4.2.4, 4.3, 4.4 und 4.5), wurde untersucht, ob beide Proteine zusammen an die RNA binden.

Hierzu wurden 400 ng PSF und 10 fmol radioaktiv markierte HBV-RNA.B mit steigenden Konzentrationen an hLa-Protein unter den für PSF beschriebenen Bedingungen (102) inkubiert. Im nativen EMSA konnte die Ausbildung eines dritten Komplexes beobachtet werden (Abb. 46; Spuren 5 und 6). Da ein Komplex aus der RNA zusammen mit beiden Proteinen sehr viel größer sein sollte und damit langsamer in das Gel laufen sollte, wurde aufgrund der Mobilität des sehr viel größeren Komplexes (III) angenommen, daß das PSF-Protein gemeinsam mit dem hLa-Protein an die HBV-RNA.B bindet. Außerdem konnte die Auflösung der PSF/ HBV-RNA.B-Komplexe beobachtet werden. Dies kann als ein weiterer Hinweis dafür gewertet werden, daß sich PSF gemeinsam mit La im dritten Komplex befindet.



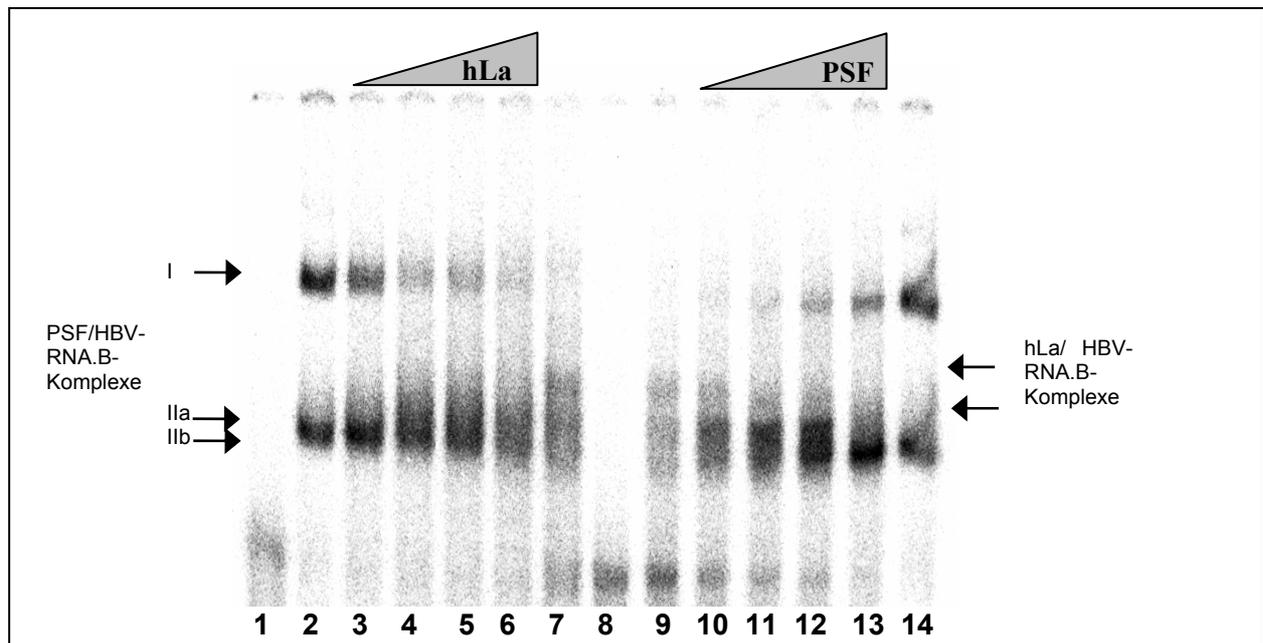
**Abb. 46: PSF bindet zusammen mit hLa an HBV-RNA.B:** A: Je 400 ng PSF wurden mit 10 fmol <sup>32</sup>P-markierter HBV-RNA.B und ohne (Spur 2) oder mit (Spur 3-6) steigenden Konzentrationen an hLa im EMSA analysiert. Spur 3 : 50 ng hLa; Spur 4 : 100 ng hLa; Spur 5 : 200 ng hLa; Spur 6 : 400 ng hLa; Spur 7 : 400 ng hLa mit 10 fmol RNA.B (ohne PSF)

Die Ausbildung eines hLa/HBV-RNA.B-Komplexes war unter diesen Bedingungen kaum sichtbar (Abb. 46; Spur 7). Die gewählten Bedingungen waren offensichtlich wenig geeignet für die hLa-HBV-RNA.B-Bindung. In weiteren Experimenten müßten noch Bedingungen gefunden werden, unter denen sowohl rekombinantes PSF- als auch rekombinantes hLa-Protein optimal an HBV-RNA.B binden.

Die Ausbildung eines Triple-Komplexes aus PSF/hLa/HBV-RNA.B konnte zwar wiederholt gezeigt werden, allerdings war die Signalintensität des Komplexes III schwankend. Ein Grund dafür könnte die teilweise mangelnde Qualität des *in vitro* Transkriptes sein.

Was auch immer die Gründe für die schwankende Signalintensität für die Komplexbildung III sein mag, die Auflösung der PSF/HBV-RNA.B-Komplexe nach Zugabe steigender Mengen an hLa-Protein war problemlos reproduzierbar.

In einem Titrationsexperiment, in dem steigende Mengen an PSF-Protein gegen konstante Mengen an hLa-Protein aufgetragen wurden, konnte ebenfalls gezeigt werden, daß sich hLa/HBV-RNA.B Komplexe auflösen (Abb. 47). Dies spricht dafür, daß hLa und PSF um die Bindung an HBV-RNA.B konkurrieren (Abb. 47; Vergleich Spur 3-6 mit Spur 10-13).



**Abb. 47: Die Proteine hLa und PSF konkurrieren um die Bindung an HBV-RNA.B:** Je 400 ng PSF-Protein wurden ohne (Spuren 2 und 14) oder mit steigenden Mengen an hLa-Protein (Spuren 3 bis 6; 50-100-200-400 ng hLa) bzw. je 400 ng an hLa-Protein ohne (Spuren 7 und 9) oder mit steigenden Mengen an PSF-Protein (Spuren 9 bis 13; 50-100-200-400 ng PSF) und mit 10 fmol  $^{32}\text{P}$ -markierter HBV-RNA.B inkubiert und im EMSA analysiert. Die Zugabe des einen Proteins löst die Komplexbildung des anderen Proteins mit der RNA auf. In den Spuren 1 und 8 wurden 10 fmol der HBV-RNA.B allein aufgetragen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die rekombinant hergestellten Proteine hLa und PSF *in vitro* unabhängig voneinander mit HBV-RNA.B Komplexe bilden können und um die Bindung an die RNA konkurrieren.

## **4.8 *In vivo* Interaktion des PSF-Proteins mit HBV-RNA**

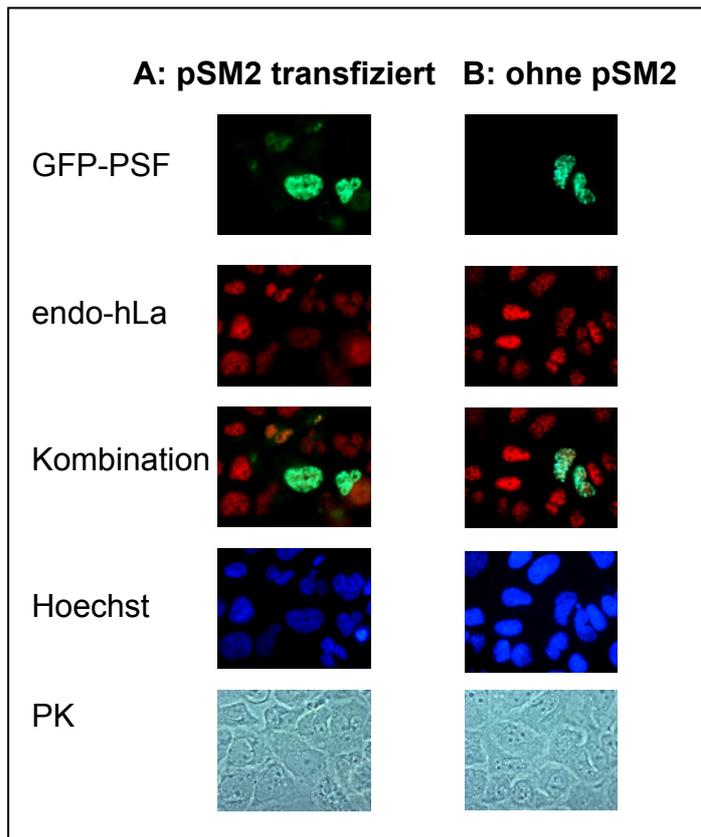
Die experimentell oben gut belegte Interaktion des PSF-Protein mit der HBV-RNA.B *in vitro*, machte es interessant zu prüfen, ob diese Interaktion *in vivo* stattfindet und sich funktionell auswirkt. Hierzu wurde zunächst der Einfluß der exogenen Expression eines GFP-PSF-Fusionsproteins durch Transfektion eines entsprechenden Expressionsvektors (pEGFP-PSF) auf die Lokalisierung des endogenen hLa-Proteins und auf die Expression hepadnaviraler Genprodukte in humanen Zelllinien untersucht.

### **4.8.1 Lokalisierung von GFP-PSF und GFP-La in HBV transfizierten Zellen**

In der Immunfluoreszenz wurde zunächst untersucht, ob die intrazelluläre Lokalisierung der endogenen Proteine PSF und hLa oder deren GFP-Fusionsproteine durch die Expression des HBV-Genoms vom Vektor pSM2, der das Genom als Dimer enthält, beeinflußt wird. Die Zellen wurden an Tag 2 nach der Transfektion fixiert.

Wie der Vergleich in Abb. 48 gezeigt, blieb die Lokalisierung von GFP-PSF in Huh7-Zellen von der Transfektion des HBV Genoms unbeeinflußt. GFP-PSF war wie in nicht- HBV-produzierenden Zellen fleckenförmig im Zellkern verteilt. Auch in diesen Zellen war PSF nicht in Nukleoli lokalisiert.

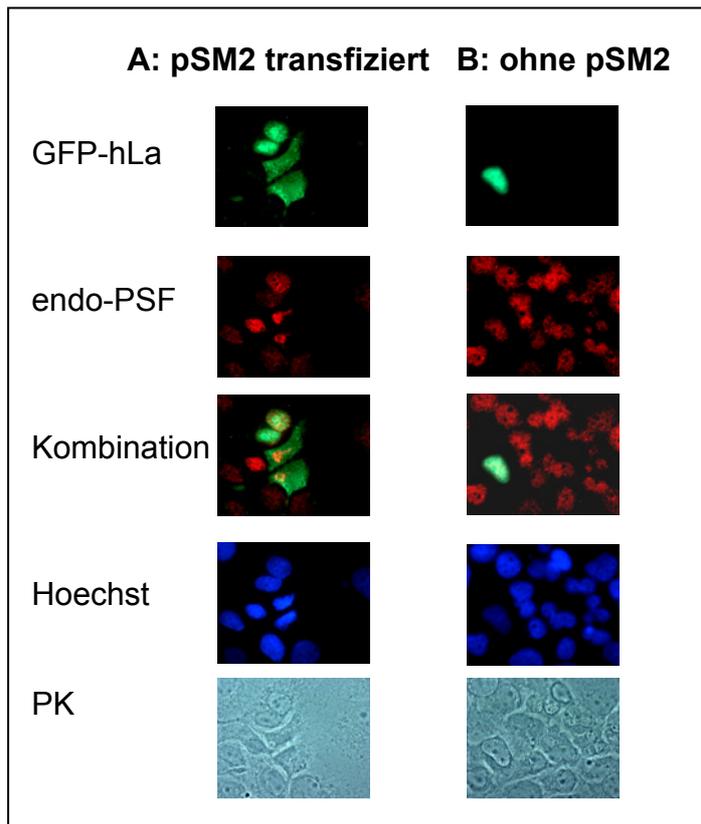
In Zellen, die sowohl GFP-PSF als auch HBV-Proteine exprimierten, wurde ebenfalls die Lokalisierung des endogenen hLa-Proteins analysiert. Auch hier konnte keine Veränderung in der intrazellulären Lokalisierung des hLa-Proteins beobachtet werden, unabhängig davon ob die Zellen HBV exprimierten oder nicht.



**Abb. 48: Lokalisierung von GFP-PSF-Fusionsprotein und endogenem hLa-Protein in Huh7-Zellen:** **A:** Huh7 Zellen transfiziert mit dem Tandem Dimer HBV-Genom in pSM2; **B:** Huh7 Zellen ohne HBV Expression; Das endogene hLa-Protein wurde mit dem monoklonalen Antikörper 3B9 (Verdünnung 1:500) nachgewiesen. endo – endogen; PK – Phasenkontrast; Die "Kombination" zeigt eine Überlagerung der GFP-PSF- und der La-Signale. Aufgenommen am Tag 2 nach der Transfektion

Die Lokalisierung des GFP-hLa-Fusionsproteins wurde durch die Expression des HBV-Genomes stark verändert, denn es wurde nun auch im Zytoplasma sichtbar (Abb. 49A). Dies erinnert an den in der Literatur beschriebenen Export des hLa-Proteins in das Zytoplasma nach Infektion mit Herpes Simplex Virus Typ I (12). Des weiteren wurde in HBV-Genom exprimierenden Zellen auch eine Veränderung der Lokalisierung des endogenen PSF beobachtet. Das endogene PSF, das in nicht-transfizierten Zellen in Flecken im Kern und abwesend in den Nukleoli gezeigt wurde (Abb. 49B), war in Zellen, in denen das GFP-hLa-Fusionprotein diffus über die gesamte Zelle verteilt war, kompakt im Zellkern zu detektieren (Abb. 49A).

Da die Transfektion mit pSM2 durch die angewendete Methode der indirekten Immunfluoreszenz nicht direkt nachgewiesen wurde, bleibt es bisher eine noch zu beweisende Annahme, daß in den HBV-produzierenden Zellen das GFP-hLa-Fusionsprotein teilweise ins Zytoplasma exportiert wurde und das endogene PSF im Zellkern in einer kompakteren Form deponiert wurde.



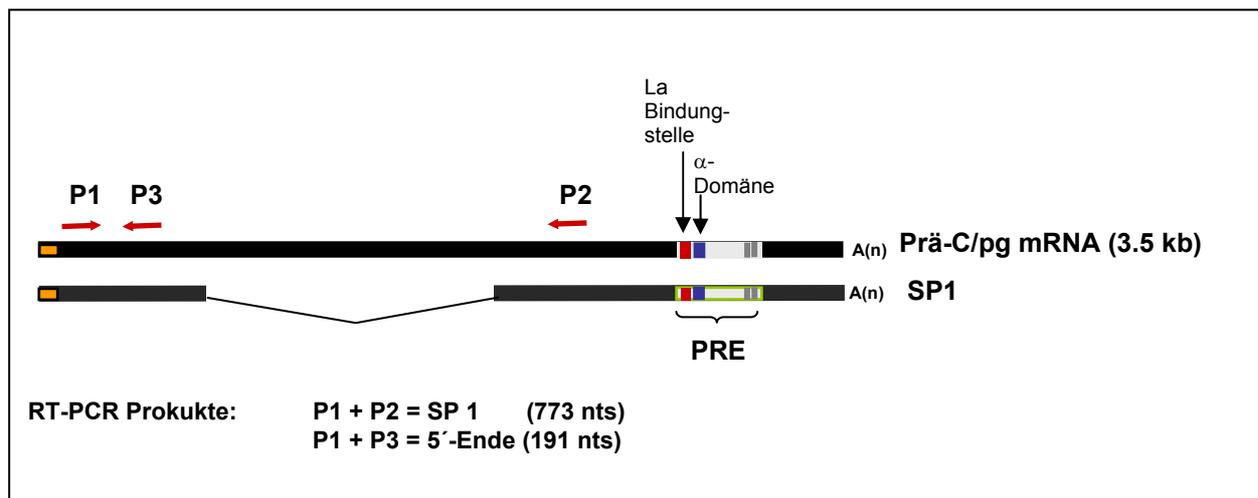
**Abb. 49: Lokalisierung von GFP-hLa und endogenem PSF in Huh7-Zellen** : **A:** Huh7-Zellen transfiziert mit dem Tandemdimer-HBV-Genom tragenden Plasmid pSM2; **B:** Huh7 Zellen ohne HBV-Genom-DNA-Transfektion; Das endogene PSF-Protein wurde mit dem monoklonalen Antikörper B92 sichtbar gemacht (Verdünnung 1:1000). endo – endogen; PK – Phasenkontrast; Die "Kombination" zeigt eine Überlagerung der GFP-hLa- und der PSF-Signale.

#### 4.8.2 Einfluß der Überexpression von PSF auf die prägenomische RNA des HBV

PSF ist als ein essentieller Faktor beim Spleißen von prä-mRNA beschrieben worden (48). Außerdem wurde gezeigt, daß das Spleißen der prägenomischen mRNA von HBV zur Expression von Fusionsproteinen führen kann, die ein toxisches und karzinogenes Potential haben (121).

Zur Untersuchung einer funktionellen Relevanz der Interaktion von PSF mit HBV-RNA und für die Prüfung, ob es einen Einfluß auf die Replikation des Virus *in vivo* hat, wurden Huh7-Zellen mit den Plasmiden pSM2 und pEGFP-PSF transfiziert.

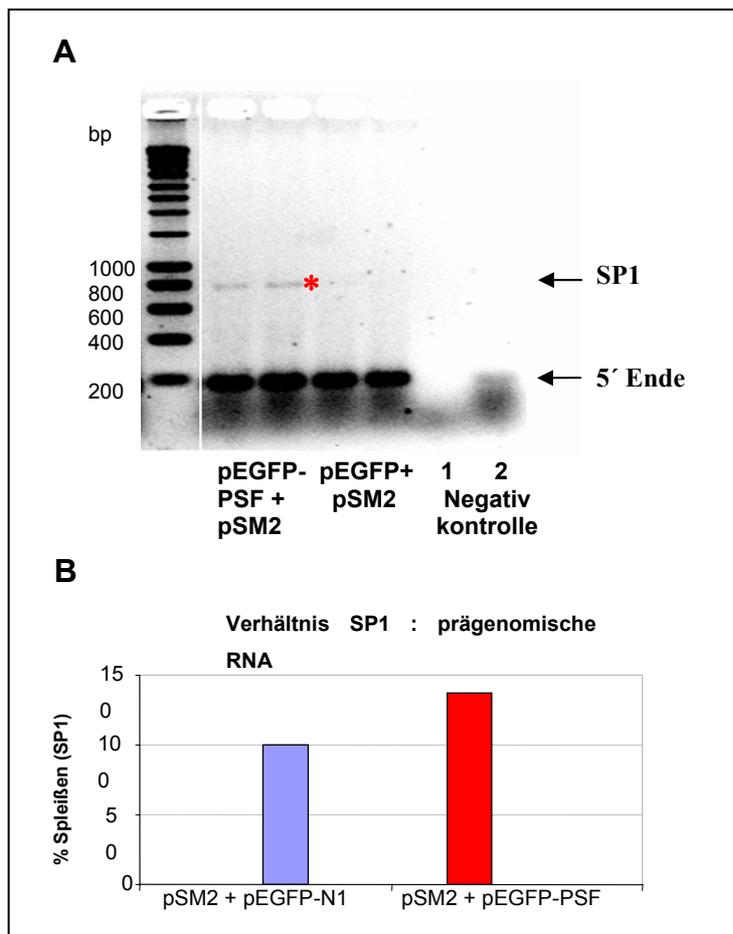
Die RNA der Zellen wurde am Tag 2 nach der Transfektion isoliert. In einer Ein-Schritt-RT-PCR wurde das 5'-Ende der prägenomischen mRNA (pg mRNA) in Form einer cDNA amplifiziert, sodaß ein Produkt von 191 nt entstehen konnte. Außerdem wurde ebenfalls in der Ein-Schritt-RT-PCR durch die Wahl spezifischer *primer* die mRNA in Form von cDNA amplifiziert, die als Hauptspleißprodukt der prägenomischen mRNA gilt und im weiteren als SP1 bezeichnet wird. In Abbildung 50 ist die Position der primer in der pg RNA dargestellt.



**Abb. 50: Schematische Darstellung der pg RNA und des Hauptspleißproduktes SP1:** Die *primer*, die zur Amplifikation der cDNAs verwendet wurden sind mit **P** bezeichnet. Außerdem sind die erwarteten RT-PCR Produkte angegeben. Die La-Bindungsstelle ist in rot, die  $\alpha$ -Domäne, in der wahrscheinlich das PSF-Protein an HBV-RNA bindet, ist in blau, die PTB-Bindungsstellen sind in grau dargestellt. PRE – posttranskriptionell regulatorisches Element

Nach Vereinigung der beiden Amplifikate (5'-Amplifikat und SP1), Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese und anschließender Färbung des Gels mit Ethidiumbromid (Abb. 51A) konnte das Verhältnis der beiden RNAs durch die Quantifizierung der Amplifikate indirekt bestimmt werden (Abb. 51B). Die Quantifizierung der Signale im MultiImager ergab, daß die Signalintensität von SP1 um 37% gegenüber der prägenomischen RNA erhöht ist in Zellen, die mit pEGFP-PSF transfiziert wurden im Vergleich zu Zellen, die mit pEGFP-N1 transfiziert wurden.

Zur Negativkontrolle dieses Experimentes wurden Zellen nur mit dem pEGFP-N1 und pSM2 transfiziert. Zur Negativkontrolle der Ein-Schritt-RT-PCR wurde zu einem Ansatz kein *template* zugesetzt. In dieser Kontrolle wurde kein Amplifikat gebildet (Abb. 51A; Negativkontrolle 1). Man kann daher davon ausgehen, daß die eingesetzten Reagenzien frei von Kontaminationen waren. In einer zweiten Negativkontrolle wurde die aus pEGFP-N1 und pSM2 transfizierten Zellen isolierte RNA als *template* verwendet. Vor der Ein-Schritt-PCR wurde die Reverse Transkriptase durch Inkubation für 3 min bei 95°C inaktiviert. Die Aktivität der hitzestabilen Taq-Polymerase wird durch diese Inkubation nicht beeinflusst. In dieser Negativkontrolle konnte eine Amplifikation des 5'-Endes detektiert werden (Abb. 51A; Negativkontrolle 2). Man muß davon ausgehen, daß es sich hierbei um eine DNA-Verunreinigung der Probe handelt.



**Abb. 51: RT-PCR zum Nachweis der prägenomischen (pg) RNA und des Hauptspleißproduktes (SP1):**

A: Agarosegelelektrophorese und anschließende Ethidiumbromidfärbung des Gels mit den amplifizierten cDNAs. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt. B: Quantifizierung des Verhältnisses SP1 zu prägenomischer RNA aus Signalintensität in (A). Die RNA wurde am Tag 2 nach der Transfektion isoliert. Die Darstellung spiegelt die Amplifikation zum Zeitpunkt von Zyklus 20

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, daß durch die Überexpression des Spleißfaktors PSF das Spleißen von HBV-RNA wesentlich verstärkt wird.

#### 4.8.3 Einfluß der Überexpression von PSF auf die Bildung von HBsAg

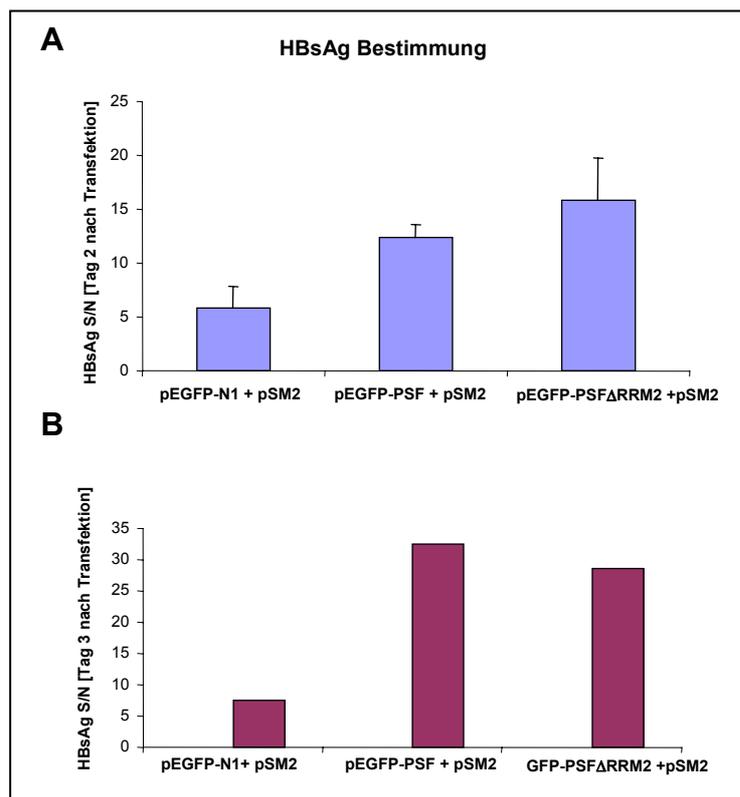
Des weiteren wurde untersucht, welchen Einfluß eine Überexpression von PSF auf die Bildung von HBV-Partikeln hat. Hierzu wurden ebenfalls pEGFP-PSF und pSM2 zusammen in Huh7-Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde auch der Einfluß einer Überexpression einer PSF-Deletionsmutante, die kein RRM2 besitzt (pEGFP-PSF $\Delta$ RRM2), untersucht. Es ist bekannt, daß dieses RNA-Erkennungsmotiv dafür verantwortlich ist, daß PSF in nukleären Flecken lokalisiert ist (31). Es wird vermutet, daß diese Veränderung der Lokalisierung mit einer Änderung der Funktionen von PSF einhergeht. Möglicherweise kann PSF so HBV-RNA nicht mehr binden.

An den Tagen 2 und Tag 3 nach der Transfektion wurden jeweils die Mediumüberstände abgenommen und in einem ELISA auf das HBs-Ag (engl.: *hepatitis B virus surface antigen*), dem Hauptoberflächenprotein des HBV, analysiert (siehe 3.4.4.2). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit pEGFP-N1 transfiziert wurden.

Die Analyse im ELISA ergab, daß in den Überständen der Zellen, in denen PSF überexprimiert wurde, am Tag 2 mehr als doppelt soviel HBsAg (Faktor 2,1) nachweisbar war im Vergleich zu

Zellen, die mit pEGFP-N1 transfiziert worden waren (Abb. 52A). Die Analyse der Überstände von pEGFP-PSF $\Delta$ RRM2 zeigte demgegenüber sogar eine noch deutlichere Erhöhung der HBsAg-Werte. In diesem Fall war eine 2,7-fache Erhöhung an HBsAg nachweisbar (Abb. 52A). Es ist denkbar, daß die Erhöhung der HBsAg Werte durch die vermehrte Sekretion von viralen Polymerase-Oberflächen-Fusionsproteinen (HBSP) ist, die ebenfalls im HBsAg ELISA detektiert werden und von dem Hauptpleißprodukt der prägenomischen RNA bekanntermaßen synthetisiert wird (121). Die vermehrte Expression dieses Fusionsproteins könnte das Ergebnis der durch RT-PCR nachgewiesenen Verstärkung des Spleißens nach Überexpression von PSF sein (Abb. 51).

Nach dem gleichen Prinzip wie oben beschrieben, wurden die Mediumüberstände auch am Tag 3 nach der Kontransfektion auf HBsAg hin analysiert. Es zeigte sich, daß der Effekt einer Überexpression von PSF nach drei Tagen noch deutlicher war im Vergleich zu Tag 2. Es wurde eine 4,4-fache Erhöhung der HBsAg-Werte gemessen. Die Steigerung von HBsAg nach Transfektion von pEGFP-PSF $\Delta$ RRM2 lag bei einem Faktor von 3,8 (siehe Abb. 52B).

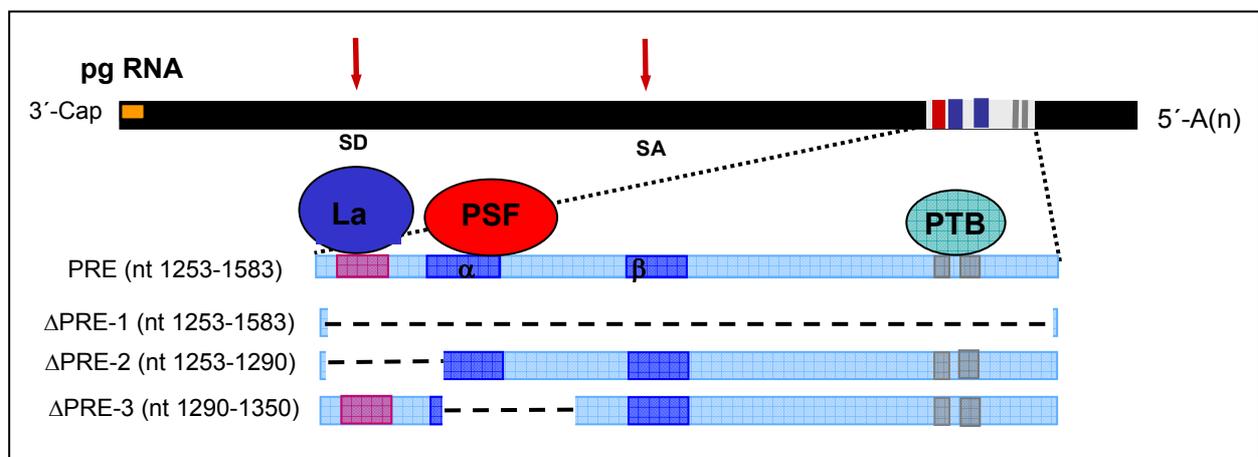


**Abb. 52: Überexpression von PSF in Huh7-Zellen, kotransfiziert mit pSM2, führt zu einer Erhöhung von HBsAg im Zellkulturmedium: A:** Bestimmung von HBsAg durch ELISA am Tag 2 nach der Transfektion. **B:** am Tag 3 nach der Transfektion.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, welchen Einfluß PSF auf die Bildung von Viruspartikeln, gemessen anhand der HBsAg-Mengen, hat, wenn das pEGFP-PSF zusammen mit HBV-Konstrukten transfiziert wird, die in einem HBV-Bereich deletiert sind, der als posttranskriptionell regulatorisches Element (PRE) bezeichnet wird. Aufgrund der SELEX

Analysen (102) und der vorliegenden Ergebnisse (4.6.2 und 4.6.3) wird vermutet, daß PSF in diesem Bereich an die HBV-RNA bindet.

Dieser Bereich zwischen nt 1152-1684 ist möglicherweise für den Export der viralen RNA wichtig (66). Hierzu wurde das Plasmid pCMT, das ein Überlängengenome von HBV mit der prägenomischen RNA unter der Kontrolle eines CMV Promoters enthält, zusammen mit pEGFP-PSF in Huh7-Zellen transfiziert. Am Tag 2 nach Transfektion wurden die Mediumüberstände zur Vermessung des HBsAg Gehaltes durch ELISA entnommen. In Abbildung 53 ist eine schematische Übersicht der Mutationen, Bindungstellen und Funktionselemente in den prägenomischen HBV-RNAs der verschiedenen pCMT-Konstrukte dargestellt.



**Abb. 53:** Schematische Übersicht über die prägenomische (pg) RNA des HBV und über die verwendeten Deletionen im PRE der HBV-Genome, kloniert im Vektor pCMT. SD: engl.: *splice donor*; SA: engl.: *splice acceptor*

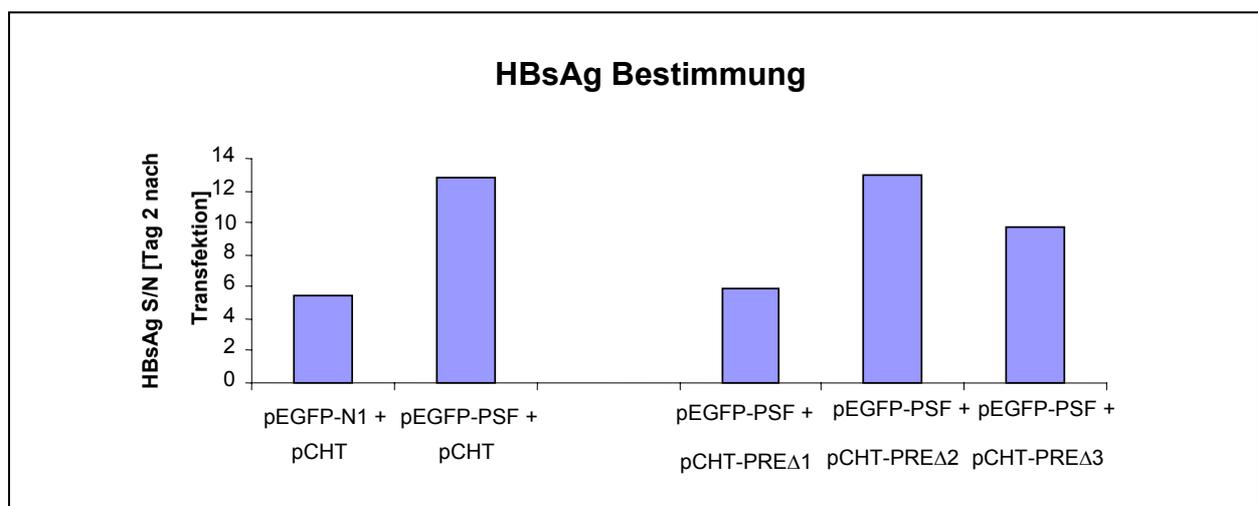
Es zeigte sich, daß die Überexpression von PSF auch in der Kotransfektion mit dem pCMT-Expressionsvektor eine deutliche Erhöhung der Menge an HBsAg bewirkt. Auch hierbei wurde eine mehr als eine Verdoppelung des HBsAg-Wertes gemessen (Faktor 2,3, Abb. 54).

Die Deletion des Bereiches nt 1253-1583 (PRE Δ1), die das gesamte PRE umspannt, führte zusammen mit der Überexpression von PSF zu einem rapiden Abfall der Menge an HBsAg auf ein Niveau, das dem ohne Einfluß von PSF entsprach. Es ist bekannt, daß eine Deletion dieses Bereiches dazu führt, daß die HBV-RNA nicht mehr gespleißt wird und insgesamt weniger RNA synthetisiert wird (32). Diese Beobachtung könnte durch eine fehlende PSF-Bindungsstelle begründet sein.

Die Deletion des Bereiches nt 1253-1290 im PRE (PRE Δ2), in dem die vorhergesagte PSF-Bindungsstelle erhalten bleibt, hat keinen Einfluß auf die durch die Überexpression von PSF hervorgerufene Steigerung der HBsAg-Mengen (Abb. 54). In vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe von T.Heise, in der diese Studien durchgeführt wurden, konnte gezeigt

werden, daß die Deletion dieses Bereiches keinen Einfluß auf die Synthese und das Spleißen der HBV-RNA hat (32). PSF kann also immer noch binden und seinen Einfluß auf das Spleißen ausüben, was zur Erhöhung der HBsAg-Werte führen könnte.

Eine Deletion des Bereiches nt 1290-1350 im PRE der prägenomischen RNA (PRE  $\Delta$ 3) führte zusammen mit der Überexpression von PSF zu einer Reduktion der Mengen an HBsAg im Vergleich zur Kotransfektion mit dem Plasmid pCHT, das das gesamte PRE enthält. Trotzdem waren die Werte gegenüber der Negativkontrolle um den Faktor 1,8 erhöht (Abb. 54). Da in diesem Konstrukt die vorhergesagte PSF-Bindungsstelle nicht mehr erhalten ist, ist es möglich, daß noch weitere Elemente im PRE für die modulierende Wirkung von PSF von Bedeutung sind.



**Abb. 54: PSF bindet an das PRE der prägenomischen RNA.** Eine Deletion des PRE (PRE $\Delta$ 1) geht einher mit einem verringerten HBsAg-Wert nach Überexpression von PSF. Zur HBsAg-Bestimmung wurden die Überstände von Huh7-Zellen an Tag 2 nach Transfektion im HBsAg-ELISA analysiert.

Aufgrund der beschriebenen SELEX Analysen wurde angenommen, daß PSF mit hoher Wahrscheinlichkeit im Bereich nt 1305-1323 der HBV-RNA bindet. Dieser Bereich ist im PRE der prägenomischen RNA lokalisiert. Eine Deletion des PRE zusammen mit einer Überexpression von PSF führte zu einer Verminderung der HBsAg-Werte. Die Bindung von PSF an das PRE scheint also einen Einfluß auf das HBsAg zu haben. Eine Deletion des Bereiches nt 1253-1290 hat keinen Einfluß auf die durch die Überexpression von PSF erreichte Steigerung der Mengen an HBsAg. Da die vorhergesagte PSF-Bindungsstelle hinter diesem Bereich liegt, war dieses Ergebnis zu erwarten. Eine Deletion des Bereiches nt 1290-1350, in dem die vorhergesagte PSF-Bindungsstelle liegt, sollte zu einer Verringerung der HBsAg-Werte führen. Dies war jedoch nicht der Fall, stattdessen wurde eine Erhöhung der Mengen an HBsAg gegenüber den Kontrollen gemessen.

## 5 Diskussion

Das Hepatitis B Virus (HBV), das bei Menschen akute und chronische Leberentzündungen verursacht, ist der Hauptvertreter der Familie der *Hepadnaviridae*. Weltweit sind mehr als 350 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert und obwohl ein sehr effektiver Impfstoff gegen das Virus zur Verfügung steht, bleibt die HBV- Infektion weltweit eine der am meisten verbreiteten viralen Infektionen. Die Therapie chronisch Infizierter ist oft nicht erfolgreich und nicht selten von massiven Nebenwirkungen begleitet. Daher besteht ein dringender Bedarf an neuartigen antiviralen Strategien, die effektiv und mit minimalen Nebenwirkungen zur Eliminierung des Virus führen.

Um die Immunreaktion gegen virale Antigene *in vivo* untersuchen zu können und so möglicherweise Ansätze für neue Therapiemöglichkeiten zu finden, wurde vor einigen Jahren ein transgenes Mausmodell entwickelt, welches den Virus repliziert und zum Studium der Immunpathogenese genutzt wurde (23). Proteolytisch prozessierte Formen von HBsAg werden auch in MHC-assoziiierter Form auf der Oberfläche der Hepatozyten präsentiert. Nach Injektion von HBsAg-spezifischen CTLs wurden diese HBs-MHC Komplexe erkannt und führte dazu, daß die virale DNA, die viralen Proteine sowie die virale RNA durch einen Zytokine-induzierten, nicht-zytotoxischen Mechanismus sehr effizient eliminiert wurden (49). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass der Abbau der viralen RNA durch einen Zytokine-abhängigen posttranskriptionellen Mechanismus bewerkstelligt wurde. Interessanterweise korrelierte der Abbau der viralen RNA zeitlich mit dem Auftreten von trunkierten Formen des mLa-Proteins, die vermutlich durch proteolytische Spaltung generiert wurden. Diese Beobachtung sowie weitere Experimente führten zur Annahme, daß das mLa-Protein die HBV-RNA stabilisiert und sie vor Abbau durch zelluläre RNasen schützt ((58),(56),(57)). Weiterführende *in vitro* RNA-Bindungsstudien mit dem hLa-Protein und der HBV-RNA.B zeigten, daß im Gegensatz zum Mausmodell die Bindung des hLa-Proteins an die HBV-RNA nicht spezifisch und unabhängig vom Phosphorylierungsstatus des Proteins ist (62). Zusätzliche Experimente zeigten, daß die Bindung des rekombinanten hLa-Proteins an die virale RNA.B durch Faktoren in Zellkernextrakten moduliert wird (Ehlers et al., eingereicht). Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, daß die Bindung des La-Proteins an die HBV-RNA.B durch weitere zelluläre Faktoren vermittelt sein könnte.

Obwohl inzwischen viele Publikationen zur Interaktion des La-Proteins mit verschiedenen RNAs erschienen sind, ist vergleichsweise wenig über La-Protein- interagierende Proteine bekannt. Wie bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben, wurde in einer Reihe von Publikationen

über die Existenz weiterer zellulärer Faktoren spekuliert, die die Bindung des La-Proteins an unterschiedliche virale und zelluläre RNAs vermitteln oder beeinflussen. Eine Identifizierung eines Interaktionspartners war daher sowohl hinsichtlich der näheren Charakterisierung der Bindung des La-Proteins an die HBV-RNA, insbesondere in Bezug auf die Stabilisierung dieser RNA, als auch für das bessere Verständnis der Funktionen des La-Proteins im Allgemeinen von großer Bedeutung.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, konnte ein bisher nicht bekannter Interaktionspartner des hLa-Proteins identifiziert werden. Die Interaktion des hLa-Proteins mit dem PSF-Protein konnte mittels Koimmunpräzipitation, im Säugetier-Zwei-Hybrid-System sowie durch partielle Kolokalisierung mit phosphoryliertem La-Protein und dem PSF-Protein in der Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigt werden.

Um erste Anhaltspunkte darüber zu gewinnen, ob der neue Interaktionspartner möglicherweise im Lebenszyklus des HBV eine Rolle spielt, wurde durch *in vitro* Bindungsstudien im EMSA gezeigt, daß das PSF-Protein spezifisch an die HBV-RNA.B bindet. Weiterhin zeigten Kotransfektionsexperimente mit HBV- und PSF-Expressionvektoren, daß die Überexpression des neuen Interaktionspartners die Genexpression von HBV in lebenden Zellen moduliert. Damit wurde eine neue Funktion des PSF-Proteins entdeckt.

## **5.1 Identifizierung von PSF als potentiellen Interaktionspartner des hLa-Proteins**

Wie zuvor bereits erwähnt, sind wahrscheinlich weitere zelluläre Faktoren als die bisher beschriebenen an der Komplexbildung aus hLa-Protein und RNA beteiligt. Solche Faktoren sollten über Affinitätschromatographie des His<sub>6</sub>-hLa-Proteins identifiziert werden. Dabei sollte versucht werden, eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion zu erhalten, damit das zytoplasmatische hLa-Protein und das kernständige hLa-Protein separat voneinander bezüglich verschiedener Interaktionspartner untersucht werden konnte. Aufgrund der hohen Mobilität des hLa-Proteins (63), das während der Fraktionierung in großen Mengen aus dem Kern austrat (Abb. 11), war eine Trennung des His<sub>6</sub>-hLa-Proteins in eine reine zytoplasmatische und eine reine Kernfraktion nicht möglich. Hierfür müßten andere Fraktionierungsprotokolle angewendet werden, die z.B. zum Verschluß der Kernporen führen.

Wie in 4.2.1 gezeigt, war es möglich, das His<sub>6</sub>-hLa-Protein aus eukaryotischen Zellen mittels der Affinitätschromatographie spezifisch aufzureinigen. Durch die hoch-stringenten Pufferbedingungen können aber mögliche Protein-Protein-Interaktionen getrennt werden.

Möglicherweise sind durch diese Methode potentielle Interaktionspartner verloren gegangen, dennoch war es erforderlich, diese Bedingungen zu wählen, um die Anzahl an kontaminierenden Proteinen zu minimieren. Die koeluiierenden Proteine wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Methode der Silberfärbung und die Verunreinigungen mit Keratin stellten ein Problem für die anschließenden massenspektroskopischen Analysen der aus dem Gel ausgeschnittenen Proteinbanden dar. In Zukunft sollten daher andere Färbetechniken wie z.B. mit *SYPRO orange* zum Einsatz kommen, die einen sauberen und sensitiveren Nachweis von Proteinen erlauben.

Neben dem PSF-Protein der vollen Länge von 100 kD (Abb. 18) wurde ein PSF-Signal bei ~ 50 kD identifiziert, wobei es sich vermutlich um ein Degradationsprodukt von PSF handelt (Abb. 16). Tatsächlich ergaben Literaturrecherchen, daß PSF als prä-mRNA Spleißfaktor nach Freisetzung aus Zellen durch Lyse besonders sensitiv für proteolytische Spaltung ist (78), wobei ein ~ 50 kD großes Fragment entsteht ((116), (80)). Dieses auch als p49-Protein bezeichnete Fragment stellt die amino-terminale Hälfte des PSF-Proteins dar, was durch Peptidsequenzierung festgestellt wurde (116). Diese Ergebnisse sprechen sehr dafür, daß die amino-terminale Hälfte von PSF mit dem His<sub>6</sub>-hLa-Protein koeluierte. Möglicherweise wird die Interaktion von PSF mit dem hLa-Protein über diese Region vermittelt. Da sich in der amino-terminalen Hälfte des PSF-Proteins eine Prolin-/ Glutamin-reiche Domäne (PQ in Abb. 55) befindet, die vermutlich die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt, ist es wahrscheinlich, daß die Interaktion des PSF-Proteins mit dem hLa-Protein über diese Domäne vermittelt wird.

Die Identifizierung von PSF als ein mit der Kernmatrix assoziiertes Protein (94), das möglicherweise wenigstens zum Teil an das hLa-Protein gebunden ist, bietet eine mögliche Teilerklärung dafür, warum ein Teil des hLa-Proteins während der Fraktionierung in eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion im Zellkern zurückgehalten wurde (Abb.11).

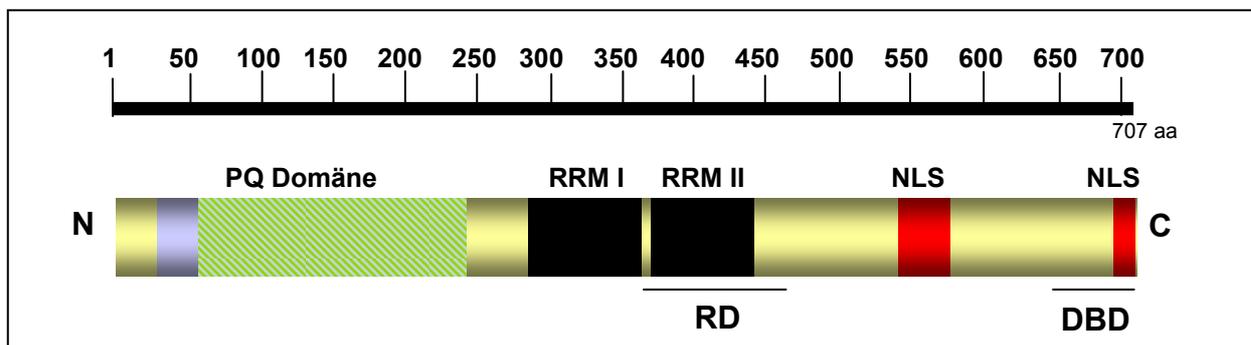
Das multifunktionelle Protein PSF (Polypyrimidintrakt bindendes Protein (PTB) assoziierter Spleißfaktor, auch als hPOMP100 (steht für *humane pairing on membrane protein 100 kD*) bezeichnet, wurde initial im Komplex mit PTB beschrieben (100). Tatsächlich ist ein Großteil des PSF-Proteins mit der Kernmatrix assoziiert und nicht an PTB gebunden (94).

PSF wurde auch als Tyrosin-phosphoryliertes Protein, das mit der Kernmatrix assoziiert ist, beschrieben (97). Es wird vermutet, daß PSF in verschiedenen Kernkompartimenten, wie der Kernmatrix (94), dem Kernplasma ((31), Abb. 28), den Spleißflecken ((31), Abb. 28) oder dem Nukleolus (112) vorhanden ist und dort vermutlich verschiedene Funktionen ausübt. Dies könnte durch die unterschiedliche Lokalisierung reguliert sein, die eventuell abhängig vom

Phosphorylierungsstatus ist, der durch die Proteinkinase C $\alpha$  und eine Tyrosin-Kinase bestimmt wird ((117), (108)).

Die Sequenz der PSF cDNA zeigte, daß zwei Isoformen des Proteins existieren: eine 707 aa, eine andere 669 aa lang. Da das PSF-Protein nur durch ein Gen kodiert ist, ist es sehr wahrscheinlich, daß die beiden Isoformen durch alternatives Spleißen gebildet werden (100).

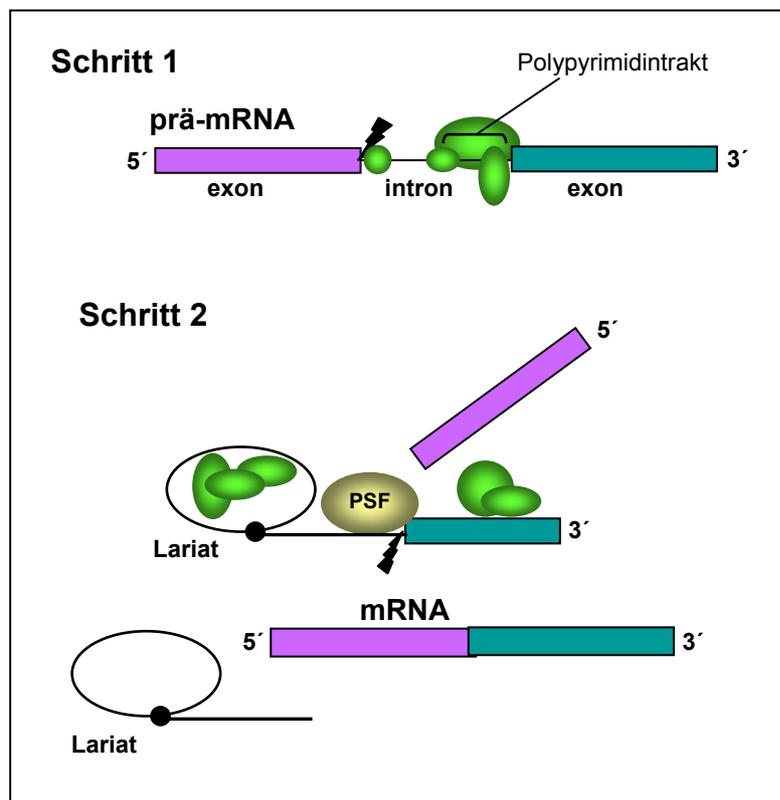
In Abbildung 55 ist die Dömänenstruktur des PSF-Proteins schematisch dargestellt. Der aminoterminalen Bereich ist durch einen hohen Gehalt an Prolin und Glutamin gekennzeichnet. Es wird vermutet, daß diese Region die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt, und daß dies für die Zusammensetzung der verschiedenen Komponenten der Spleißosomen notwendig ist (100). Das RNA-bindende Protein PSF zeichnet sich weiterhin durch die Präsenz von zwei konservierten RNA-Erkennungsmotive (RRM) aus (100), wobei die Lokalisierung von PSF in Spleiß-assoziierten Kerndomänen durch das RRM 2 bestimmt wird (31). Weiterhin wurden im carboxyterminalen Bereich des Proteins zwei Kernlokalisierungssignale identifiziert, die gemeinsam für den vollständigen Import des Proteins in den Zellkern notwendig sind (31).



**Abb. 55: Domänenstruktur des PSF-Proteins:** Die Größe der einzelnen Domänen ist am oben angegebenen Maßstab in Aminosäuren (aa) grob ablesbar. P – Prolin-reiche Region (blau); Q – Glutamin-reiche Region (grün); RRM – RNA-Erkennungsmotive (schwarz); NLS – Nukleus-Lokalisierungssignal (rot); RD – Repressor-Domäne; DBD – DNA-Bindungsdomäne

Erste funktionelle Analysen zeigten, daß das PSF-Protein am Spleißen von prä-mRNA beteiligt ist (100). In früheren Studien wurden PSF und eines seiner Degradationsprodukte (68 kD-Fragment) als SAP102 und SAP68 (Spleißosomen-assoziierte Proteine) des Komplexes B von Spleißosomen identifiziert. Die Spleißosomen sind nukleäre Protein-RNA-Komplexe, die aus snRNPs (engl.: *small nuclear ribonucleoproteins*) aufgebaut sind und welche je nach Art der enthaltenen snRNA mit U1-, U2-, U4/U6- und U5-snRNPs bezeichnet werden. Diese Komplexe spielen eine wichtige Rolle sowohl bei der Bildung der Spleißosomen, als auch während der beiden katalytischen Schritte des Spleißens. PSF bindet an den Polypyrimidintrakt des Introns einer prä-mRNA und agiert als essentieller Faktor beim zweiten katalytischen Schritt des Spleißens (48). In Abbildung 56 sind das Spleißen von prä-mRNA und die Position von PSF in

diesem Ereignis schematisch dargestellt. Weitere unten erwähnte Studien bestätigten, daß PSF eine Rolle beim Spleißen spielt. So konnte PSF zusammen mit 25S Partikeln aufgereinigt werden, die U4-, U5- und U6-snRNPs enthalten, und es konnte gezeigt werden, daß es mit U1A interagiert (84). Dieser U1-snRNP-freie Komplex (auch SF-A genannt) spielt sowohl beim Spleißen als auch bei der Polyadenylierung (84) eine Rolle. Außerdem konnte gezeigt werden, daß PSF an U5-snRNA bindet und mit dem U4/U6.U5-Tri-snRNP kosedimentiert (102).



**Abb. 56: Das Spleißen der prä-mRNA erfolgt in zwei Schritten.** Während des ersten Schrittes sammeln sich Spleißfaktoren an cis-Elementen von Exon und Intron. Durch einen Schnitt an der 5'-Exon-Intron Spleißstelle wird das 5'-Exon vom Intron gelöst und das Intron bildet eine Schleife (Lariat). Während des zweiten Schrittes interagiert PSF mit dem Polypyrimidintrakt. Nach einem zweiten Schnitt entsteht durch eine kovalente Verknüpfung der Exons die reife mRNA. Das Lariat wird abgebaut. adaptiert nach (117)

Die Transkription und die Prozessierung von mRNA sind Ereignisse, die nicht unabhängig voneinander stattfinden, sondern sich gegenseitig beeinflussen können ((103), (104)). Hierbei wird vermutet, daß die carboxy-terminale Domäne der RNA-Polymerase II eine Art Plattform bietet, auf welcher die Transkription mit dem Spleißen und andere Schritte der Genexpression miteinander verbunden werden können (104). Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß PSF an die carboxy-terminale Domäne der RNA Polymerase-II bindet, und daß PSF zusammen mit seinem homologen Interaktionspartner  $p54^{nrb}$  an die 5'-Spleißstelle innerhalb eines Transkriptions-/Spleiß-Komplexes bindet (72). Es wird diskutiert, daß diese beiden Proteine den Kontakt zwischen RNA-Polymerase II und snRNPs während des gekoppelten Transkriptions-/Spleiß-Ereignisses vermitteln.

Das PSF-Protein ist ebenfalls als Faktor beschrieben, der an der Transkription beteiligt ist. So wurde z.B. gezeigt, daß PSF an die DNA-Bindungsdomäne der Hormonrezeptoren TR (engl.:

*thyroid hormone receptor*) und RXR (engl.: *retinoic X receptor*) bindet und über eine Interaktion mit Sin3A die Transkription unterdrückt (90). Außerdem wurde beschrieben, daß PSF das Gens den Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren-Antwort-Element P450sc bindet und so die transkriptionelle Aktivität dieses Elementes inhibiert ((128), (129)). In der Studie wurde die Domäne in PSF, über die PSF die Transkription inhibiert, auf den Bereich aa 361-464 eingeengt (engl.: *repressor domain* – RD in Abb. 55).

Außerdem wurde gezeigt, daß PSF sowohl Einzelstrang- (*single stranded*, ss) als auch Doppelstrang- (*double stranded*, ds) DNA bindet und die Renaturierung von komplementären ssDNAs erleichtert (5). In dieser Studie wurde auch gezeigt, daß die Phosphorylierung von PSF durch Proteinkinase C $\alpha$  die Bindung von PSF an DNA stimuliert.

Eine neue Publikation brachte PSF erstmals in Zusammenhang mit einer viralen RNA. Es wurde gezeigt, daß PSF an ein Instabilitätselement (engl.: *cis-acting instability element* – INS) der HIV-1 *gag/pol*- und *rev*-mRNAs bindet, was eine Inhibierung der Expression dieser RNAs zur Folge hat (138).

Die Zusammenfassung über PSF zeigt, daß es sich hierbei, ebenso wie bei dem hLa-Protein, um ein multifunktionelles Protein handelt, welches anscheinend über die verschiedensten Wege in zelluläre Prozesse und im Fall von HIV auch in die virale Genexpression eingreifen kann und diese moduliert. Somit war ein Protein als Interaktionspartner des hLa-Proteins gefunden, welches nicht nur für das Verständnis von Funktionen des hLa-Proteins von Bedeutung ist, sondern möglicherweise auch von besonderer Bedeutung für den Lebenszyklus des HBV ist.

## 5.2 Bestätigungen der Interaktion von hLa und PSF

Um die Interaktion von hLa und PSF zu bestätigen, kamen mehrere unabhängige Methoden zur Anwendung. Hierbei wurden Systeme wie das Säugetierzellen-2-Hybrid System gewählt, die auch einen Einblick in die tatsächliche Situation in der Zelle geben sollten. Zunächst wurden Koimmunpräzipitationen durchgeführt, um die Interaktion der endogenen Proteine hLa und PSF zu zeigen. Im Vergleich zu Bindungsstudien zwischen rekombinanten, bakteriell exprimierten Proteinen, kann man hier davon ausgehen, daß die Proteine in Zellextrakten mit ihren normalen Modifikationen vorlagen. So wird das hLa-Protein durch die konstitutiv aktive Casein-Kinase II phosphoryliert und ca. 85 % des La-Proteins liegen in phosphorylierter Form vor (69). Auch PSF wird phosphoryliert, allerdings liegen hier keine Daten über den Einfluß der Phosphorylierung auf die Funktionen oder die Lokalisierung von PSF vor. Es ist bekannt, daß PSF über die Proteinkinase C $\alpha$  und die Tyrosinkinase phosphoryliert werden kann ((108), (97)). Für weitere Studien sollten daher Phosphatase-Inhibitoren genutzt werden, um den Einfluß einer

Phosphorylierung auf die Interaktion des hLa- mit dem PSF-Protein zu analysieren. Weiterhin können Proteine auch anderweitig modifiziert werden (Sumolierung, Acetylierung, usw.). All diese Modifikationen könnten eine Interaktion modulieren.

Zusätzlich ist der Aufschluß der Zellen ein Ereignis, bei dem *in vivo* vorliegende Interaktionen zerstört und artifiziell kreiert werden könnten. So werden beim Aufschluß der Zellen die natürliche Kompartimentierungen unterschiedlicher Komponenten aufgehoben und Proteine und Nukleinsäuren treffen aufeinander, die normalerweise getrennt sind. Unter Verwendung von Gesamt-Zellextrakten und Kernextrakten konnte eine Koimmunpräzipitation des endogenen hLa-Proteins und des endogenen PSF-Proteins durch die vorhandenen anti-La Antikörper nicht zweifelsfrei belegt werden.

Diese Problematik machte es notwendig, eine Koimmunpräzipitation mit überexprimiertem GFP-hLa-Fusionsprotein durchzuführen. Unter Verwendung von gereinigten mAb anti-GFP Antikörpern konnte das GFP-hLa-Fusionsprotein erfolgreich präzipitiert werden. Mittels dieser Methode war es möglich, eindeutig eine spezifische Koimmunpräzipitation des endogenen PSF mit dem GFP-hLa-Fusionproteins zu zeigen (Abb. 23 und Abb. 27). Diese Strategie hatte zudem den Vorteil, daß verschiedene GFP-hLa-Mutanten auf eine Bindung an PSF getestet werden konnten. Durch die Verwendung verschiedener pEGFP-hLa-Konstrukte (Abb. 26) sollte somit eine Aussage über die Bindungsdomäne, die die Interaktion von hLa mit PSF vermittelt, ermöglicht werden. Da PSF mit allen verwendeten GFP-hLa-Fusionsproteinen kopräzipitierte (Abb. 27), konnte keine Aussage über die Größe und die Lokalisierung einer dabei beteiligten Bindungsdomäne getroffen werden. Allerdings war die Effizienz der Kopräzipitation in pEGFP-hLa $\Delta$ 7-transfizierten Zellen geringer im Vergleich zu den anderen Zelllysaten. GFP-hLa $\Delta$ 7 ist ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 31). Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Interaktion des hLa-Proteins mit PSF auf den Zellkern beschränkt ist. Daß ein Teil von PSF dennoch zusammen mit GFP-hLa $\Delta$ 7 präzipitiert werden konnte, ist möglicherweise auf die durch die Lyse verursachten artifiziellen Bedingungen zurückzuführen. Für diese Experimente wurden keine zytoplasmatische und nukleäre Zellfraktionen eingesetzt und daher ist es gut möglich, daß das GFP-hLa $\Delta$ 7-Fusionprotein mit dem PSF im artifiziellen Gemisch der Komponenten des Lysats eine unspezifische Wechselwirkung eingehen konnte.

Um weitere Hinweise für die Interaktion zwischen den Proteinen hLa und PSF zu erhalten, wurden Koloalierungsstudien mittels Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Wenn beide Proteine interagieren, sollten sie zumindest z. T. am gleichen Ort in der Zelle nachzuweisen sein. Allerdings sind diese Lokalisierungsdaten gegebenenfalls nur als unterstützende Bestätigung der mit anderen Methoden nachgewiesenen Interaktionen von

Komponenten zu werten und keinesfalls ohne weitere Studien aussagekräftig. Besonders in Zusammenhang mit PSF ist dies zu berücksichtigen, da PSF initial im Komplex mit PTB identifiziert wurde (100). Weitere Studien belegten zudem, daß PSF mit PTB kopräzipitierte (94) und es ist daher ausreichend belegt, daß PSF und PTB miteinander interagieren. Entgegen der Erwartung aufgrund dieser publizierten Ergebnisse, konnte durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie keine Kolokalisierung von PSF und PTB gefunden werden (94). Die Kolokalisierungsstudien sind unter anderem wegen der Notwendigkeit der Fixierung der Zellen für die anschließende indirekte Immunfluoreszenzanalyse potentiell mit Artefakten behaftet, denn es ist durchaus denkbar, daß während der Fixierung Protein-Protein-Interaktionen zerstört werden oder ein Protein extrahiert wird. Da bei diesem Vorgang die Zellen "getötet" werden, ist diese Technik kritisch zu betrachten, wenn man die tatsächliche Situation in lebenden Zellen untersuchen will.

Die exogen überexprimierten GFP-hLa- bzw. GFP-PSF-Fusionsproteine und der anschließende Nachweis des jeweils anderen endogenen Proteins mittels spezifischer Antikörper ergab keine eindeutige Kolokalisierung der endogenen mit den entsprechenden Fusionsproteinen (siehe 4.4). Da das hLa-Protein diffus über den Zellkern verteilt ist, ist der Nachweis einer Kolokalisierung von vornherein erschwert.

Durch die Koelutionsexperimente und durch die Koimmunpräzipitation wurde gezeigt, daß wahrscheinlich nur eine Subpopulation des endogenen hLa-Proteins mit PSF interagiert und diese Fraktion in der Immunfluoreszenz durch die diffuse Lokalisierung verdeckt sein könnte. Daher wurde in weiterführenden Studien ein spezieller rekombinanter monoklonaler Antikörper gegen das endogene hLa-Protein verwendet, der ausschließlich das phosphorylierte hLa-Protein erkennt.

Mit Hilfe dieses rekombinanten anti-La Antikörpers konnte eine partielle Kolokalisierung von phosphoryliertem hLa mit PSF durch konfokale Mikroskopie gezeigt werden (Abb. 34). Diese Studien wurden durch die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von J. Raats ermöglicht. Das endogene phospho-hLa-Protein (p-hLa) wurde unter Verwendung dieses Antikörpers als ein in Spleiß-assoziierten Kerndomänen konzentriertes Protein identifiziert (105). Dieses Lokalisierungsmuster unterschied sich von einer anderen etwa zeitgleich beschriebenen Lokalisierung des phosphorylierten hLa-Proteins (69), die mit einem polyklonalen Antikörper durchgeführt wurde, der angeblich ebenfalls spezifisch die phosphorylierte Form des hLa erkennt, aber eine diffuse Lokalisierung von p-hLa im Nukleoplasma ergab. Der verwendete Antikörper war jedoch polyklonal, hatte offensichtlich eine geringere Sensitivität als der rekombinante Antikörper und erkannte darüber hinaus auch eine geringe Menge der nicht-

phosphorylierten Form des hLa-Proteins (69). Dies bedeutet wahrscheinlich, daß die Lokalisierung des p-hLa in Kernflecken durch die Erkennung von nicht-phosphoryliertem hLa in diesen Experimenten überdeckt wurde. Da das phosphorylierte hLa bekanntermaßen mit Pol III-Transkripten assoziiert ist, während das nicht-phosphorylierte hLa-Protein mit 5' TOP-mRNAs assoziiert ist (69), wäre es denkbar, daß das PSF-Protein in einem Komplex aus p-hLa und Pol III-Transkripten enthalten ist und dort eine Rolle in der RNA-Prozessierung spielt. Eventuell könnte die Interaktion des p-hLa-Proteins mit PSF die Prozessierung von RNA-Polymerase III-Transkripten modulieren.

Die Kolo-kalisierung des p-hLa-Proteins und PSF in Kernflecken läßt die Vermutung zu, daß nur das phosphorylierte hLa-Protein mit dem PSF-Protein in Spleiß-assoziierten Kerndomänen interagiert. Da PSF als ein essentieller Faktor für das Spleißen von prä-mRNA beschrieben ist, kann dies als ein weiterer Hinweis dafür betrachtet werden, daß das hLa-Protein bei Spleißprozessen eine Rolle spielt.

Ein weiterer unabhängiger Beweis einer Interaktion sollte durch die Verwendung eines Säugetierzellen-2-Hybrid System erbracht werden. Es konnte auf diese Weise bestätigt werden, daß die Koexpression der Gal4-hLa- und VP16-PSF-Fusionsproteine zur einer ca. 2,3-fachen Aktivierung der Expression des Reportergens CAT im Vergleich zur 4-fachen CAT-Aktivitätserhöhung durch die Interaktion der Kontrollproteine p53 und dem T-Antigen von SV40 führte. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, daß Gal4-hLa und VP16-PSF in lebenden Zellen interagieren, wobei jedoch noch zu prüfen bleibt, ob die Wechselwirkung direkt oder z.B. über ein von beiden Proteinen gebundenes RNA-Molekül vermittelt wird. Weiterführende Studien zeigten allerdings, daß das hLa-Protein und das PSF-Protein um die Bindung an die HBV-RNA konkurrieren (siehe 4.7). Die These, daß die Protein-Protein-Interaktion durch eine gemeinsam gebundene RNA vermittelt wird, scheint daher unwahrscheinlich, ist aber nicht auszuschließen.

Durch die Expression von Gal4-hLa-Fusionsproteinen mit zielgerichteten Mutationen im La-Proteinbereich sollte es möglich sein, auch die beteiligte Bindungsdomäne im hLa-Protein zu kartieren. Die erzielten Ergebnisse zeigen, daß die Koexpression des Gal4-hLa $\Delta$ -1- und des VP16-PSF-Fusionsproteins nicht die Expression des CAT-Reportergens stimulierte. Daher wurde zunächst angenommen, daß ein Bereich in der amino-terminalen Hälfte von aa 11-99 die Bindung des hLa-Proteins an PSF vermittelt. Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse unter Zuhilfenahme der Daten aus der Koimmunpräzipitation (Abb. 27) und der Immunfluoreszenzlokalisierung (Abb. 38) wurde diese Theorie jedoch verworfen. Die Lokalisierung des Gal4-hLa $\Delta$ 1-Fusionsproteins unterschied sich von der des GFP-hLa $\Delta$ 1-

Fusionsproteins (Vergleich (63) und Abb. 38). Bisher konnte diese unterschiedliche Lokalisierung nicht erklärt werden. Es könnte aber mit dem Gal4-Anteil zusammenhängen. Durch die unterschiedliche Lokalisierung könnte in diesem Fall eine Interaktion eventuell unmöglich geworden sein. Die Interaktion der Fusionsproteine Gal4-hLa $\Delta$ 6 und VP16-PSF konnte die CAT-Expression wieder aktivieren. Das Fusionsprotein Gal4-hLa $\Delta$ 6 konnte in der Immunfluoreszenzmikroskopie im Nukleoplasma und hier nicht in den Nukleoli detektiert werden, ebenso wie für das GFP-hLa $\Delta$ 6-Fusionsprotein gezeigt (Vergleich Abb. 31 und Abb. 38). Außerdem konnte keine Interaktion von Gal4-hLa $\Delta$ 7 und VP16-PSF im Säugetierzellen-2-Hybrid System und im anschließenden CAT-ELISA gezeigt werden. Das Gal4-hLa $\Delta$ 7-Fusionsprotein ist ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert und kann daher nicht mit dem kernständigen PSF assoziiert sein. Dies führte zur Hypothese, daß die Proteine PSF und hLa vermutlich im Nukleoplasma einen Komplex bilden, was die Annahme der Koimmunpräzitationsstudien bestätigt.

Die vorliegenden Ergebnissen zeigen eindeutig eine Interaktion des hLa- mit dem PSF-Protein und sprechen für eine Interaktion ausschließlich im Nukleoplasma in den Spleiß-assoziierten Kerndomänen. *In vivo* scheint nur das phosphorylierte hLa-Protein an der Komplexbildung beteiligt zu sein. Die Quantifizierung der PSF-Signale in den Koelutionsexperimenten und den Koimmunpräzitationen ergab, daß nur ca. 20% des zellulären PSF-Proteins mit dem hLa-Protein komplexiert sind. Es ist also wahrscheinlich nur ein Teil des endogenen PSF-Proteins mit einem Teil des vorhandenen, phosphorylierten hLa-Proteins assoziiert ist.

### 5.3 Oligomerisierungsstatus des hLa-Proteins

Es wurde berichtet, daß das La-Protein eine Dimerisierungsdomäne enthält, die für dessen Funktion bei der Translationskontrolle wichtig ist (25). Andere Untersuchungen mit dem rekombinanten hLa-Protein zeigten die Ausbildung von hLa-Multimeren, die durch Gelfiltration nachgewiesen wurden (62). Im Gegensatz dazu wurde durch eine analytische Ultrazentrifugation von rekombinantem hLa keine Dimerisierung bzw. Multimerisierung nachgewiesen (70). Daher handelt es sich um eine interessante, offene Frage, ob das endogene hLa-Protein *in vivo* tatsächlich Dimere bilden kann oder nicht.

In dieser Arbeit konnte durch Koelution und Koimmunpräzitation gezeigt werden, daß das hLa-Protein in lebenden Zellen keine Multimere oder Dimere bildet. Wie in Abb. 13 und Abb. 16 gezeigt wurde, konnte das endogene hLa nicht zusammen mit einem eukaryotisch exprimierten His<sub>6</sub>-hLa aufgereinigt werden. Des weiteren zeigte die Immunpräzitation mit

mAb anti-GFP in pEGFP-hLa transfizierten Zellen, daß endogenes hLa nicht mit GFP-hLa kopräzipitierte (Abb. 23). Diese Daten deuten darauf hin, daß das endogene hLa keine Homodimere bildet.

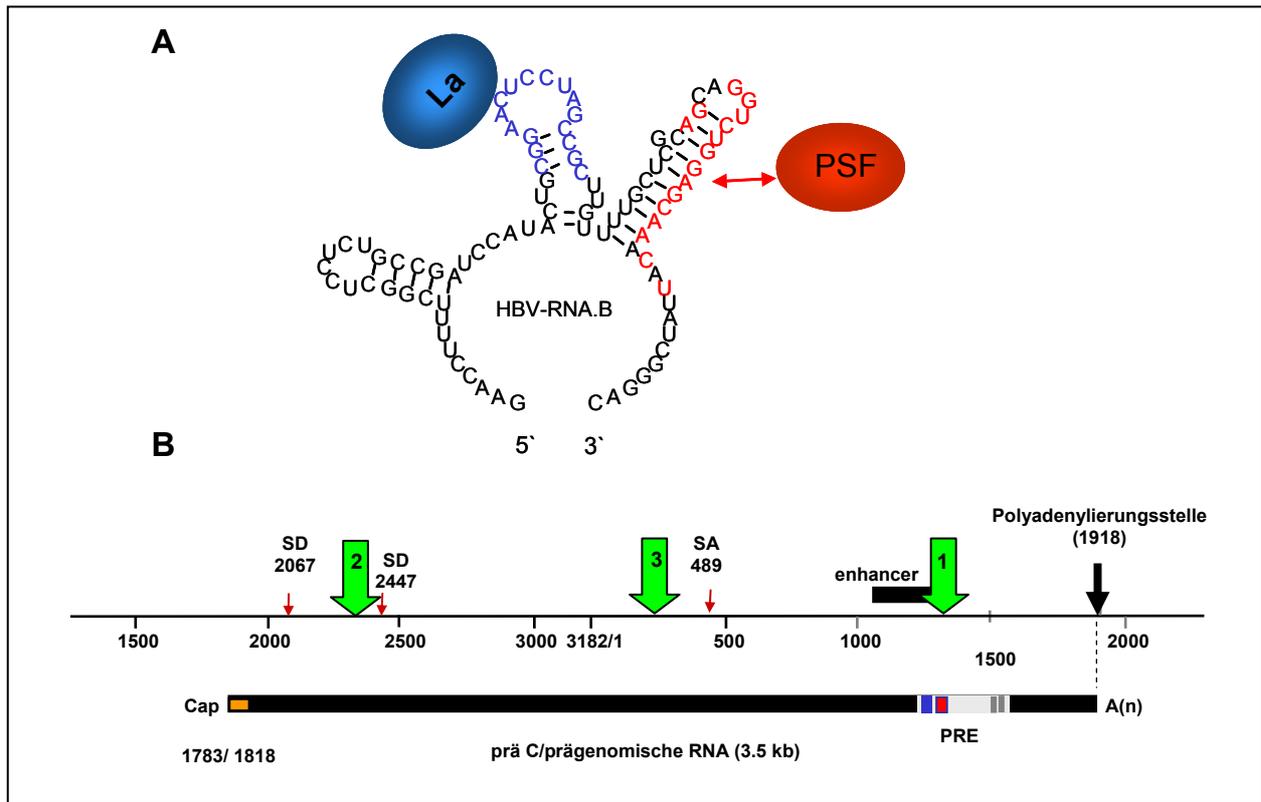
Die Widersprüchlichkeit zwischen den beschriebenen Beobachtungen einer Oligomerisierung von hLa ((25), (62)) und den vorliegenden Daten könnte dadurch begründet sein, daß das hLa-Protein bei den in der Gelfiltration eingesetzten hohen Konzentrationen, die in einer *in vivo* Situation nicht vorhanden sind, mit sich selbst assoziiert. Außerdem wurden die eingesetzten rekombinanten Proteine in Bakterien exprimiert, wodurch sämtliche Modifikationen, die das Protein in der eukaryotischen Zelle erhält, nicht vorhanden sind. Damit erscheint die Übertragung der Ergebnisse bei Verwendung solcher Methoden auf die tatsächliche Situation fraglich.

#### **5.4 Interaktion von PSF mit HBV-RNA.B**

Wie bereits dargelegt lag die Vermutung nahe, daß weitere zelluläre Faktoren die Bindung des La-Proteins an HBV-RNA beeinflussen. Eine Interaktion mit einem anderen Protein könnte das La-Protein möglicherweise aus der Bindung an HBV-RNA lösen und somit für einen Abbau durch RNasen zugänglich machen. Da der Phosphorylierungsgrad der bisher unbekanntenen Faktoren eine Rolle spielt ((58), und bisher unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe von T. Heise), wäre es denkbar, daß die Phosphorylierung des Interaktionspartners die Bindung des La-Proteins an die HBV-RNA moduliert.

Nachdem PSF als Interaktionspartner des La-Proteins identifiziert wurde, war es von Interesse zu untersuchen, ob PSF, welches zwei RNA-Erkennungsmotive (RRMs) enthält, allein an die virale RNA bindet, oder ob es zusammen mit dem La-Protein an die RNA bindet. Interessanterweise wurden kürzlich in einer Studie, die die Bindung von PSF an U5- snRNA beschreibt, 25 potentielle PSF-Erkennungssequenzen in einer RNA publiziert (102). Diese Sequenzen wurden durch ein Selektionsverfahren, welches auf der RNA-Bindungsaktivität von PSF beruht, aus einer RNA Bibliothek gewonnen. Dieses Verfahren wird als SELEX (engl.: *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*; (43)) bezeichnet. Der Vergleich dieser potentiellen PSF-Erkennungssequenzen mit der Sequenz der HBV-RNA gab einen ersten Hinweis darauf, daß PSF an die HBV-RNA.B binden kann. Die Gegenüberstellung dieser Sequenzen mit der komplette viralen RNA-Sequenz (Galibert-Sequenz; (39)) ergab, daß eine dieser Sequenzen eine 89%-ige Homologie zur HBV-RNA.B aufweist (nt 1305-1323), in einem Bereich in unmittelbarer Nähe zur La-Bindungsstelle (nt 1273-1290) (Abb. 57A). Außerdem wurden zwei weitere potentielle PSF-Bindungsstellen in der HBV-RNA im Bereich nt 2231-

2243 und im Bereich nt 200-216 identifiziert, die eine Homologie von 84% bzw. 75% aufwiesen (Abb. 57B).



**Abb. 57: Vergleich der HBV-RNA Sequenz mit vorhergesagten PSF-Bindungsstellen.** A: PSF (rot) bindet an der HBV-RNA.B in unmittelbarer Nähe zur La-Bindungsstelle (blau). B: Weitere potentielle PSF-Bindungsstellen mit hoher Homologie zur Sequenz der HBV-RNA. Bereich 1: nt 1305-1323, 89%ige Homologie (in HBV-RNA.B enthalten); Bereich 2: nt 2231-2243, 84%ige Homologie; Bereich 3: nt 200-216, 75%ige Homologie; SD – *splice donor*; SA – *splice acceptor*

Da PSF als Interaktionspartner des hLa-Proteins gefunden wurde, welches an HBV-RNA.B bindet (Abb. 57A), wurde in ersten Experimenten untersucht, ob PSF auch an dieses Fragment der HBV-RNA bindet. In EMSAs konnte gezeigt werden, daß PSF spezifisch an HBV-RNA.B bindet und zur Ausbildung von drei Protein/ RNA-Komplexen (RNP I, IIa und IIb) unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität führte (Abb. 43). Weshalb mehrere Komplexe gebildet werden, und welcher Komplex das PSF-Protein voller Länge enthält, konnte bisher nicht geklärt werden. Da die Analysen mittels eines nativen Gels durchgeführt wurden, kann weder über das Laufverhalten noch über die Größe des Komplexes und somit auch nicht über die Größe des Proteins eine Aussage getroffen werden. Es ist sowohl möglich, daß im RNP I das PSF der vollen Länge enthalten ist, als auch, daß es sich hierbei um einen multimeren Proteinkomplex handelt, der sich aufgrund der hohen Mengen an PSF gebildet haben könnte. Daher ist es in zukünftigen Studien notwendig, die Bindungsbedingungen zu optimieren.

Aus bisher unbekanntem Gründen war es nicht möglich mit dem mAb anti-PSF B92 einen *Supershift* der verschiedenen RNPs zu bewirken (Abb. 45). Möglicherweise ist dies darauf

zurückzuführen, daß das Epitop, das von B92 erkannt wird, durch die Faltung des rekombinanten Proteins oder durch die Bindung der RNA verdeckt ist. In weiteren Analysen sollte dieser zentrale Punkt der Beweisführung unbedingt geklärt werden. Aufgrund der Problematik mit B92 sollte versucht werden, eigene Antikörper gegen PSF zu generieren.

Die verwendete HBV-RNA.B ist Teilstück eines bestimmten Bereiches der HBV-RNA, dem posttranskriptionell regulatorischen Elementes (PRE). Das PRE soll den Transport nicht-gespleißter viraler Transkripte vom Nukleus in das Zytoplasma vermitteln (65). Bisher unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe implizieren, daß dieses Element in der HBV-RNA essentiell für das Spleißen ist. Es ist außerdem bekannt, daß das PRE aus zwei Subelementen aufgebaut ist (29). Strukturanalysen zeigten, daß es sich hierbei um zwei konservierte Haarnadelschleifenstrukturen handelt, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domänen (120). In dieser Publikation wurde auch beschrieben, daß die  $\alpha$ -Domäne sich im Bereich nt 1292-1321 der HBV-RNA befindet. Es wird vermutet, daß für Funktionen des PRE die Ausbildung solcher Haarnadelschleifenstrukturen notwendig sind und diese Bindungsstellen für zelluläre Proteine dienen könnten. Bisher sind zwei zelluläre Faktoren beschrieben, die in diesem Element an HBV-RNA binden, das La-Protein im Bereich nt 1273-1290 (56) und PTB in den Bereichen 1531-1539 und nt 1548-1573 (136). In den vorliegenden Ergebnissen konnte das PSF-Protein als ein neuer Faktor identifiziert werden, der im PRE bindet. Basierend auf den publizierten potentiellen PSF-Bindungsstellen in einer RNA (siehe Abb. 57, (102)) konnte nach Abgleich mit der HBV-RNA Sequenz festgestellt werden, daß PSF wahrscheinlich im Bereich nt 1305-1323 in der  $\alpha$ -Domäne des PRE der HBV-RNA bindet. Möglicherweise ist die Bindung des Spleißfaktors PSF an dieses Element für die Funktion des PRE beim Spleißen essentiell. In unmittelbarer Nähe der vermuteten PSF-Bindungsstelle liegen die La-Bindungsstelle und zwei Spaltstellen einer Endoribonuklease (57). Es wäre denkbar, daß die Bindung von PSF als neu identifizierter Interaktionspartners des La-Proteins an das PRE die Bindung des La-Proteins an die HBV-RNA moduliert. Somit könnte die Funktion des La-Proteins als Stabilisierungsfaktor der HBV-RNA durch PSF beeinflusst werden.

## 5.5 Interaktion von PSF und hLa mit HBV-RNA.B

Da sowohl das hLa-Protein als auch PSF an HBV-RNA.B binden ((62), siehe 4.6) und beide Proteine miteinander interagieren (siehe 4.2; 4.3; 4.4 und 4.5), sollte untersucht werden, ob diese Proteine unabhängig voneinander oder als Komplex an HBV-RNA.B binden. Vor allem in Hinblick auf das übergeordnete Ziel dieser Arbeit, dem Auffinden eines Interaktionspartners, der die Spezifität der Bindung des La-Proteins an die HBV-RNA vermittelt und somit dessen

Stabilisierung möglicherweise modulieren kann, waren diese Untersuchungen von besonderem Interesse.

Wie in den Abbildungen 46 und 47 gezeigt, führte die Zugabe einer steigenden Menge an hLa-Protein zur Auflösung der PSF/ HBV-RNA.B Komplexe, während die Zugabe steigender Mengen PSF zur Auflösung der hLa/ HBV-RNA.B Komplexe führte. Es wird daher angenommen, daß hLa und PSF um die Bindung an HBV-RNA.B in Konkurrenz treten. Hierbei ist anzumerken, daß unter den gewählten Bedingungen die hLa/ HBV-RNA.B-Komplexbildung im Vergleich zur beschriebenen Interaktion des hLa-Proteins und der HBV-RNA.B nur schwer nachweisbar war (62). Es müssen deshalb noch Bedingungen entwickelt werden, unter denen beide Proteine optimal an die RNA binden.

Eine weitere, wenn auch seltenere Beobachtung war das Auftreten eines zusätzlichen Komplexes, von dem aufgrund seines Laufverhaltens angenommen wird, daß es sich hierbei um einen PSF/ hLa/ HBV-RNA.B Komplex handelt. Dieser könnte ein reines Artefakt sein, möglicherweise induziert durch die hohen Mengen an Protein, die eingesetzt wurden. Jedoch ist bisher auch nicht auszuschließen, daß PSF und hLa tatsächlich zusammen an HBV-RNA.B binden können. Da diese Beobachtung nur selten gemacht wurde, während die Konkurrenz um die Bindung in jedem der durchgeführten Experimente beobachtet wurde, wird die These der Konkurrenz des hLa-Proteins und PSF um die Bindung an HBV-RNA.B bevorzugt. Aufgrund der vorliegenden Daten wird angenommen, daß die Interaktion des hLa-Proteins mit PSF durch die Konkurrenz um die Bindung an die HBV-RNA aufgelöst wird. Da PSF als ein für das Spleißen essentieller Faktor beschrieben wurde und das La-Protein als stabilisierender Faktor der HBV-RNA, liegt es nahe anzunehmen, daß die Konkurrenz zwischen PSF und La um die Bindung an die HBV-RNA ein Regulator für die virale Genexpression ist. Diese Ergebnisse offenbaren einen potentiellen neuen Ansatzpunkt für die Entwicklung einer antiviralen Strategie, die auf die Degradation der HBV-RNA abzielt. Wenn man davon ausgeht, daß das La-Protein die HBV-RNA *in vivo* stabilisiert und PSF tatsächlich das La-Protein aus dieser Bindung verdrängen kann, wäre hierdurch ein Medikamenten-induzierter Abbau der viralen RNA durch zelluläre RNasen denkbar, der letztendlich, wie im Mausmodell bereits gezeigt, zur vollständigen Eliminierung der Virusproduktion führen könnte. Sinn macht die präklinische Etablierung und Evaluierung einer solchen antiviralen Strategie jedoch erst, wenn sehr viel mehr Informationen über die Effekte der Expression und Funktionsmodulation des PSF-Proteins in lebenden Zellen durch detaillierte Untersuchungen vorliegen.

## 5.6 Einfluß einer Überexpression von GFP-PSF auf die HBV-Genexpression

Erste Hinweise aus *in vitro* Experimenten legen die Vermutung nahe, daß rekombinantes, bakteriell exprimiertes PSF spezifisch die  $\alpha$ -Domäne des PREs bindet. Insbesondere die Region, in der die PSF-Bindungsstelle vermutet wird, erscheint für ein effektives Spleißen von Bedeutung (T. Heise, bisher unveröffentlichte Daten). Da PSF als essentieller Spleißfaktor beschrieben wurde ((100), (48)), war es von Interesse, den Einfluß von PSF auf das Spleißen von HBV-RNA zu untersuchen. In Abbildung 51 ist dargestellt, daß in Zellen, in denen GFP-PSF überexprimiert ist, vermehrte Mengen des Spleißproduktes SP1 nachweisbar waren, während dies in den Negativkontrollen nicht der Fall war. Daraus wurde geschlossen, daß das PSF-Protein das Spleißen der HBV-RNA fördert. Da dem PSF-Protein eine Rolle bei der Transkription zugeschrieben wird (siehe 5.1), wäre es darüberhinaus denkbar, daß dieser Effekt durch eine generelle Erhöhung der Genexpression bedingt ist. Da aber die Verhältnisse der prägenomischen RNA zu SP1 experimentell bestimmt wurden, kann dies ausgeschlossen werden.

In EMSAs wurde gezeigt, daß rekombinantes PSF-Protein spezifisch an HBV-RNA.B bindet. Daher kann man annehmen, daß die Verstärkung des Spleißens über die Bindung von PSF an das PRE vermittelt wird. Diese vielversprechenden ersten Hinweise müssen jedoch noch in weiteren zukünftigen Experimenten bestätigt werden. Hierfür könnten die unter Abbildung 53 aufgeführten PRE $\Delta$ -Konstrukte und weitere in der Arbeitsgruppe von T.Heise vorhandene Konstrukte zum Einsatz kommen.

Es ist bekannt, daß das Spleißen der prägenomischen RNA zu Fusionsproteinen mit einem potentiell toxischen Effekt führen kann (121). Der Vergleich in der Immunfluoreszenz zeigte allerdings, daß sich die Form der Zellen am Tag 2 nach der Transfektion von pEGFP-PSF und pSM2 nicht von der Form der Zellen unterschied, die nur mit pEGFP-PSF transfiziert wurden. Es konnte auch kein Hinweis für proapoptotische Vorgänge, die z.B. durch eine Chromatin-Kondensation angezeigt werden würden, beobachtet werden (Vergleich Abb. 48A und 48B). Die Richtigkeit dieser Aussage bedarf jedoch weiterer Experimente, wobei zusätzliche Methoden zur Anwendung kommen müßten, die auch zeigen können, welche Zellen HBV-Proteine und HBV-RNA exprimieren. Außerdem sollten in Zukunft verschiedene Zeitpunkte nach der Transfektion für die Analyse in der Immunfluoreszenz und weitere Experimente zum Nachweis der Apoptose gewählt werden. Möglicherweise ist in den aufgeführten Ergebnissen der Zeitpunkt für das Aufzeigen eines toxischen Effektes des Spleißens auf die Zellen durch

Immunfluoreszenzmikroskopie zu früh gewählt worden. Tatsächlich wurde beschrieben, daß die Expression eines Fusionsproteins erst 76 Stunden nach Transfektion die Apoptose induziert (121).

Ein weiterer Indikator für die virale Genexpression ist die Menge an synthetisiertem HBsAg, die in einem ELISA gemessen werden kann. Da das PSF-Protein zumindest auf der Ebene des Spleißens in die virale Genexpression eingreift, war es von Interesse, die HBsAg-Mengen nach Überexpression von PSF zu messen. Im HBsAg-ELISA konnte gezeigt werden, daß eine Überexpression von PSF die HBsAg-Mengen deutlich erhöht. Dieser Effekt war auch zu beobachten, wenn das RRM2 von PSF nicht vorhanden war (Abb. 52). Eine Deletion des RRM2 führt zu einer Verteilung von PSF über den gesamten Zellkern (Abb. 32). Die Erhöhung der HBsAg-Mengen war folglich nicht auf die Lokalisierung von PSF in Spleiß-assoziierte Kerndomäne zurückzuführen.

Ein Spleißen der HBV-RNA kann zur Bildung eines 10,4 kD Oberflächenprotein-Polymerase-Fusionsproteins (HBSP) führen (121). Außerdem wurde ein weiteres Oberflächenprotein-Polymerase-Fusionsprotein, welches durch das Spleißen entsteht, beschrieben (64). Dieses 43 kD Glykoprotein weist große Ähnlichkeit mit dem Oberflächenprotein auf. Die mRNA stammt von der prägenomischen RNA mit einer Deletion von 454 nt im Bereich nt 2247-2902. Dieses Fusionsprotein wurde in Zelllysaten, sekretierten Virionen sowie subviralen Partikeln identifiziert. Es enthält den amino-Terminus der Polymerase und den größten Teil des HBsAg. Dieses Oberflächenprotein-Polymerase-Fusionsprotein kann das L-Protein in der Virion-Reifung ersetzen (64). Da eine Überexpression von PSF zu einer Verstärkung des Spleißens führt (siehe 4.8.2), ist es möglich, daß dadurch die Expression von Fusionsproteinen erhöht wird. Da das Epitop des HBsAg, welches im ELISA erkannt wird, im Fusionsprotein vorhanden ist, kann die Erhöhung der HBsAg-Expression mit der Bildung von Fusionsproteinen erklärt werden. Die erhöhten HBsAg-Mengen könnte auch durch eine verstärkte Expression der subgenomischen RNA erklärt werden. Da PSF als ein Transkriptionsfaktor beschrieben ist, ist diese Möglichkeit derzeit nicht auszuschließen. Aber auch posttranskriptionelle Ereignisse, wie eine Zunahme der Bildung von Viruspartikeln, eine Zunahme des Exports der RNA, die Verstärkung der Transkription oder die Steigerung der Sekretion der Virionen und der subviralen Partikel durch die Überexpression von PSF sind denkbare Erklärungen. Bislang konnten noch keine Anhaltspunkte dafür erbracht werden, welche dieser Theorien der tatsächlichen Situation entsprechen könnte. In jedem Fall konnte gezeigt werden, daß PSF die virale Genexpression

moduliert und somit einen Ansatzpunkt in der Entwicklung antiviraler Strategien darstellen könnte.

Interessanterweise konnte die Überexpression von PSF die HBsAg-Mengen nicht erhöhen, wenn das PRE deletiert wurde ( $\Delta$ PRE1 in Abb. 53, Abb. 54). Dieses Element in der prägenomischen RNA ist damit wichtig für den Effekt, den PSF auf die HBsAg-Expression ausübt. Dies kann als ein Hinweis dafür gewertet werden, daß das Spleißen der prägenomischen RNA einen Einfluß auf die HBsAg-Expression ausübt, und daß dieser Effekt durch PSF vermittelt sein könnte. Eine Deletion im Bereich der vorhergesagten PSF-Bindungsstelle führt zwar zu einer Verringerung der durch die PSF-Überexpression erhöhten HBsAg-Expression, allerdings sind hierbei die Werte weiterhin erhöht gegenüber der Negativkontrolle. Möglicherweise hat die Überexpression von PSF auch Effekte auf das Spleißen in anderen bisher nicht untersuchten Bereichen der prägenomischen RNA. Nach Abgleich der publizierten RNA Sequenzen, die präferentiell von PSF gebunden werden können (102), wurden weitere Homologien in der HBV-RNA gefunden. Im Bereich nt 2231-2243 konnte eine 84% ige Homologie und im Bereich nt 200-216 eine 75% igen Homologie festgestellt werden (Abb. 57). Eventuell kann PSF über verschiedene Bereiche das Spleißen der prägenomischen RNA regulieren. Eine weitere Möglichkeit, wie PSF die Genexpression beeinflussen könnte, ist über die Interaktion mit PTB. Es ist bekannt, daß PTB ebenfalls im PRE an die prägenomische RNA bindet, in den Bereich nt 1531-1539 und nt 1548-1573 (136). In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, daß eine Überexpression von PTB die PRE-vermittelte Genexpression erhöht. Es wurde diskutiert, ob ein weiterer zellulärer Faktor, der mit PTB interagiert, notwendig ist, um die Bindung von PTB an das PRE zu erleichtern. Möglicherweise könnte PSF dieser Faktor sein, der den PTB vermittelten Export der PRE-haltigen RNA vermittelt.

Das PSF-Protein als neu identifizierter Interaktionspartner des hLa-Proteins greift daher maßgeblich in den Lebenszyklus des HBV ein. Möglicherweise kann durch die Interaktion von PSF mit dem hLa-Protein letzteres aus seiner Bindung an die HBV-RNA verdrängt werden, wodurch eventuell die RNA durch RNasen degradiert werden kann. Da die Aminosäuresequenz des mPSF zu 94% homolog zu der des humanen PSF ist, ist es möglich, die hier gewonnenen Daten auf das Mausmodell zu übertragen. Der Einfluß des PSF-Proteins auf die Stabilität der HBV-RNA sollte hierzu in zukünftigen Studien untersucht werden.

## 5.7 Weiterführende Experimente

Die in dieser Arbeit aufgeführten Experimente zur Identifizierung und Charakterisierung von PSF als einem neuen Interaktionspartner des hLa-Proteins sind durchaus mit der Annahme vereinbar, daß diese Protein-Protein-Interaktion auch oder zusätzlich durch eine RNA vermittelt wird. Da beide Wechselwirkungspartner RNA-bindende Proteine sind (siehe 1.2 und 5.1), sind weiterführende Experimente nötig, um dies zu klären. Das Vorschalten eines RNase-Verdauers der Zellextrakte, die für die Koelutions- und Koimmunpräzipitationsexperimente eingesetzt wurden, könnten hier eindeutige Beweise liefern. Durch die vorliegenden Kenntnisse zur Konkurrenz der beiden Proteine um die Bindung an HBV-RNA.B scheint die Möglichkeit einer RNA-vermittelten Interaktion zwar unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen.

Da das phosphorylierte hLa-Protein mit PSF zum Teil kolokalisiert, sollte in weiterführenden Studien untersucht werden, ob die Interaktion beider Proteine abhängig vom Phosphorylierungsstatus des hLa-Proteins bzw. des PSF-Proteins ist. Hierzu sind Experimente angedacht, in denen einerseits die Casein-Kinase II, durch die das La-Protein phosphoryliert wird, überexprimiert werden soll, und andererseits die Proteinkinase C und die Thyrosinkinase, durch die das PSF-Protein wahrscheinlich phosphoryliert wird, aktiviert bzw. gehemmt werden sollen.

Ein wichtiger Aspekt der Interaktionsstudien ist die bisher noch ausstehende Lokalisierung der Bindungsdomäne, über welche die Interaktion vermittelt wird. Da in der Arbeitsgruppe von T. Heise verschiedene hLa- und PSF-Deletionsmutanten vorhanden sind, sollten diese in Zukunft zum Einsatz kommen und auf diese Weise entsprechende Informationen erhalten werden können. Über eine Koelution mit rekombinanten, bakteriell exprimierten His<sub>6</sub>-hLa, die in verschiedenen Bereichen deletiert sind, sollten hierzu weitere Erkenntnisse über die Bindungsdomäne gewonnen werden können.

Es wird wiederkehrend diskutiert, daß das hLa-Protein zumindest indirekt am Spleißen beteiligt ist ((133), (38), (105)). Dennoch gibt es bisher keine eindeutigen Beweise hierfür. Die Interaktion mit dem essentiellen Spleißfaktor PSF geben einen weiteren Hinweis darauf, daß das hLa-Protein möglicherweise ebenfalls an Spleißprozessen beteiligt ist. Hierzu sind jedoch eine Reihe weiterer Studien notwendig.

In Bezug auf eine HBV-Infektion sollte in zukünftigen Studien untersucht werden, wodurch die Erhöhung der HBsAg-Expression nach exogener Überexpression des PSF-Proteins begründet ist. Weitere Erkenntnisse hierzu könnten durch eine Western-Blotanalyse mit einem Antikörper, der spezifisch das Fusionsprotein HBSP erkennt, erreicht werden. Außerdem sollten in einer

---

Northern-Blotanalyse die viralen RNA-Mengen gegenüber einer Kontrolle quantifiziert werden, um herauszufinden, ob der Effekt der Überexpression von PSF auf eine veränderte Regulation der Transkription zurückzuführen ist.

Außerdem wäre es essentiell herauszufinden, ob das hLa-Protein und das PSF-Protein auch *in vivo* um die Bindung der HBV-RNA konkurrieren, und welchen Einfluß diese Konkurrenz auf den Lebenszyklus des Virus hat. Durch die Anwendung der RNA-Interferenz-Technologie sollte untersucht werden, in welchem Maße eine Depletion des hLa-Proteins und/ oder des PSF-Proteins den viralen Lebenszyklus betrifft, und ob das hLa-Protein und/ oder das PSF-Protein als antivirale Zielstrukturen in Betracht gezogen werden können. Die selektive Inaktivierung des endogenen hLa-Proteins und der Effekt eines solchen Prozesses auf den Lebenszyklus des HBV wird bereits in der Arbeitsgruppe von T. Heise untersucht.

Mit den hier vorliegenden Ergebnissen ist eine fundierte Grundlage zum Erreichen des übergeordneten Zieles dieser Arbeit, der Suche nach neuen Strategien für die Entwicklung von effektiveren Therapeutika für die chronische Hepatitis B und Viruseliminierung, gelegt.

## Literatur

1. **Achsel, T. B., H.; Kastner, B.; Bachi, A.; Wilm, M.; Lührmann, R.** 1999. A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation *in vitro*. *Embo J* **18**:5789-5802.
2. **Adilakshmi, T., and R. O. Laine.** 2002. Ribosomal protein S25 mRNA partners with MTF-1 and La to provide a p53-mediated mechanism for survival or death. *J Biol Chem* **277**:4147-51.
3. **Adilakshmi, T., and R. O. Laine.** 2002. Ribosomal protein S25 mRNA partners with MTF-1 and La to provide a p53-mediated mechanism for survival or death. *J Biol Chem* **277**:4147-51. Epub 2001 Dec 7.
4. **Aigner, S., J. Lingner, K. J. Goodrich, C. A. Grosshans, A. Shevchenko, M. Mann, and T. R. Cech.** 2000. Euplotes telomerase contains an La motif protein produced by apparent translational frameshifting. *Embo J* **19**:6230-6239.
5. **Akhmedov, A. T., and B. S. Lopez.** 2000. Human 100-kDa homologous DNA-pairing protein is the splicing factor PSF and promotes DNA strand invasion. *Nucleic Acids Res* **28**:3022-30.
6. **Alfano, C. S., D.; Babon, J.; Kelly, G.; Jacks, A.; Curry, S.; Conte, M. R.** 2004. Structural analysis of cooperative RNA binding by the La motif and central RRM domain of human La protein. *Nat Struct Mol Biol* **11**:323-329.
7. **Ali, N., G. J. Pruijn, D. J. Kenan, J. D. Keene, and A. Siddiqui.** 2000. Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* **275**:27531-40.
8. **Ali, N., and A. Siddiqui.** 1997. The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:2249-54.
9. **Alspaugh, M. A., N. Talal, and E. M. Tan.** 1976. Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* **19**:216-22.
10. **Ayukawa, K., S. Taniguchi, J. Masumoto, S. Hashimoto, H. Sarvotham, A. Hara, T. Aoyama, and J. Sagara.** 2000. La Autoantigen Is Cleaved in the COOH Terminus and Loses the Nuclear Localization Signal during Apoptosis. *J Biol Chem* **275**:34465-34470.
11. **Bachmann, M., H. Althoff, H. Troster, C. Selenka, D. Falke, and W. E. Muller.** 1992. Translocation of the nuclear autoantigen La to the cell surface of herpes simplex virus type 1 infected cells. *Autoimmunity* **12**:37-45.
12. **Bachmann, M., D. Falke, H. C. Schroder, and W. E. Muller.** 1989. Intracellular distribution of the La antigen in CV-1 cells after herpes simplex virus type 1 infection compared with the localization of U small nuclear ribonucleoprotein particles. *J Gen Virol* **70**:881-91.
13. **Belsham, G. J., N. Sonenberg, and Y. V. Svitkin.** 1995. The role of the La autoantigen in internal initiation. *Curr Top Microbiol Immunol* **203**:85-98.
14. **Bhattacharya, R., K. Perumal, K. Sinha, R. Marais, and R. Reddy.** 2002. Methylphosphate cap structure in small RNAs reduces the affinity of RNAs to La protein. *Gene Expr* **10**:243-53.
15. **Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye-binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
16. **Broekhuis, C. H., G. Neubauer, A. van Der Heijden, M. Mann, C. G. Proud, W. J. van Venrooij, and G. J. Pruijn.** 2000. Detailed Analysis of the Phosphorylation of the Human La (SS-B) Autoantigen. (De)phosphorylation Does Not Affect Its Subcellular Distribution. *Biochemistry* **39**:3023-3033.

17. **Carter, M. S., and P. Sarnow.** 2000. Distinct mRNAs that encode La autoantigen are differentially expressed and contain internal ribosome entry sites. *J Biol Chem* **275**:28301-7.
18. **Castro, A., M. Faura, N. Agell, J. Renau-Piqueras, and O. Bachs.** 1996. The autoantigen La/SSB is a calmodulin-binding protein. *Cell Calcium* **20**:493-500.
19. **Chakshumathi, G., S. D. Kim, D. A. Rubinson, and S. L. Wolin.** 2003. A La protein requirement for efficient pre-tRNA folding. *Embo J* **22**:6562-72.
20. **Chambers, J. C., D. Kenan, B. J. Martin, and J. D. Keene.** 1988. Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen. *Journal of Biological Chemistry* **263**:18043-51.
21. **Chang, Y. N., D. J. Kenan, J. D. Keene, A. Gatignol, and K. T. Jeang.** 1995. Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. *Journal of Virology* **69**:618-9.
22. **Chisari, F. V., P. Filippi, A. McLachlan, D. R. Milich, M. Riggs, S. Lee, R. D. Palmiter, C. A. Pinkert, and R. L. Brinster.** 1986. Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. *Journal of Virology* **60**:880-887.
23. **Chisari, F. V., C. A. Pinkert, D. R. Milich, P. Filippi, A. McLachlan, R. D. Palmiter, and R. L. Brinster.** 1985. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science* **230**:1157-1160.
24. **Conte, M. R., T. Grune, J. Ghuman, G. Kelly, A. Ladas, S. Matthews, and S. Curry.** 2000. Structure of tandem RNA recognition motifs from polypyrimidine tract binding protein reveals novel features of the RRM fold. *Embo J* **19**:3132-41.
25. **Craig, A. W., Y. V. Svitkin, H. S. Lee, G. J. Belsham, and N. Sonenberg.** 1997. The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation. *Molecular & Cellular Biology* **17**:163-9.
26. **Crosio, C., P. P. Boyl, F. Loreni, P. Pierandrei-Amaldi, and F. Amaldi.** 2000. La protein has a positive effect on the translation of TOP mRNAs in vivo. *Nucleic Acids Res* **28**:2927-34.
27. **De Nova-Ocampo, M., N. Villegas-Sepulveda, and R. M. del Angel.** 2002. Translation elongation factor-1alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology* **295**:337-47.
28. **Deng, J. S., and E. M. Tan.** 1985. Effect of actinomycin D on the expression of nuclear antigen SS-B/La. *Journal of Investigative Dermatology* **84**:225-8.
29. **Donello, J. E., A. A. Beeche, G. J. Smith, G. R. Lucero, and T. J. Hope.** 1996. The hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element is composed of two subelements. *Journal of Virology* **70**:4345-4351.
30. **Dong, G., G. Chakshumathi, S. L. Wolin, and K. M. Reinisch.** 2004. Structure of the La motif: a winged helix domain mediates RNA binding via a conserved aromatic patch. *Embo J* **19**:19.
31. **Dye, B. T., and J. G. Patton.** 2001. An RNA recognition motif (RRM) is required for the localization of PTB-associated splicing factor (PSF) to subnuclear speckles. *Exp Cell Res* **263**:131-44.
32. **Ehlers, I.** 2001. Studien zur Funktion des La-Autoantigens bei der Hepatitis B Virusexpression. Diplomarbeit im FB Biologie, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.
33. **Elenitsas, R., L. W. Bair, Jr., T. A. Medsger, Jr., and J. S. Deng.** 1986. Discordance of SSA/Ro and SSB/La cellular antigens in synchronized cells. *J Invest Dermatol* **87**:504-9.

34. **Fan, H., J. L. Goodier, J. R. Chamberlain, D. R. Engelke, and R. J. Maraia.** 1998. 5' processing of tRNA precursors can be modulated by the human La antigen phosphoprotein. *Mol Cell Biol* **18**:3201-11.
35. **Fan, H., A. L. Sakulich, J. L. Goodier, X. Zhang, J. Qin, and R. J. Maraia.** 1997. Phosphorylation of the human La antigen on serine 366 can regulate recycling of RNA polymerase III transcription complexes. *Cell* **88**:707-15.
36. **Ford, L. P., J. W. Shay, and W. E. Wright.** 2001. The La antigen associates with the human telomerase ribonucleoprotein and influences telomere length in vivo. *Rna* **7**:1068-75.
37. **Fouraux, M. A., P. Bouvet, S. Verkaart, W. J. van Venrooij, and G. J. Pruijn.** 2002. Nucleolin associates with a subset of the human Ro ribonucleoprotein complexes. *J Mol Biol* **320**:475-88.
38. **Fouraux, M. A., M. J. Kolkman, A. Van der Heijden, A. S. De Jong, W. J. Van Venrooij, and G. J. Pruijn.** 2002. The human La (SS-B) autoantigen interacts with DDX15/hPrp43, a putative DEAH-box RNA helicase. *Rna* **8**:1428-43.
39. **Galibert, F., E. Mandart, F. Fitoussi, P. Tiollais, and P. Charnay.** 1979. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* **281**:646-650.
40. **Ganem, D., J. R. Pollack, and J. Tavis.** 1994. Hepatitis B virus reverse transcriptase and its many roles in hepadnaviral genomic replication. *Infect Agents Dis* **3**:85-93.
41. **Ganem, D. P. A. M.** 2004. Hepatitis B Virus Infection - Natural History and Clinical Consequences. *New England Journal of Medicine* **350**:1118-29.
42. **Gerbi, S. A., and T. S. Lange.** 2002. All Small Nuclear RNAs (snRNAs) of the [U4/U6.U5] Tri-snRNP Localize to Nucleoli; Identification of the Nucleolar Localization Element of U6 snRNA. *Mol Biol Cell* **13**:3123-37.
43. **Gold, L., B. Singer, Y. Y. He, and E. Brody.** 1997. SELEX and the evolution of genomes. *Curr Opin Genet Dev* **7**:848-51.
44. **Goodier, J. L., H. Fan, and R. J. Maraia.** 1997. A carboxy-terminal basic region controls RNA polymerase III transcription factor activity of human La protein. *Mol Cell Biol* **17**:5823-32.
45. **Gorlach, M., C. G. Burd, and G. Dreyfuss.** 1994. The determinants of RNA-binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C proteins. *Journal of Biological Chemistry*. **269**:23074-23078.
46. **Gottlieb, E., and J. A. Steitz.** 1989. Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *Embo J* **8**:851-61.
47. **Gottlieb, E., and J. A. Steitz.** 1989. The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro. *EMBO Journal* **8**:841-50.
48. **Gozani, O., J. G. Patton, and R. Reed.** 1994. A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor PSF bind stably to pre-mRNA prior to catalytic step II of the splicing reaction. *Embo J* **13**:3356-67.
49. **Guidotti, L. G., K. Ando, M. V. Hobbs, T. Ishikawa, L. Runkel, R. D. Schreiber, and F. V. Chisari.** 1994. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:3764-8.
50. **Guidotti, L. G., T. Ishikawa, M. V. Hobbs, B. Matzke, R. Schreiber, and F. V. Chisari.** 1996. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* **4**:25-36.
51. **Guidotti, L. G., B. Matzke, H. Schaller, and F. V. Chisari.** 1995. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *Journal of Virology* **69**:6158-6169.

52. **Guidotti, L. G., R. Rochford, J. Chung, M. Shapiro, R. Purcell, and F. V. Chisari.** 1999. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* **284**:825-9.
53. **Gutierrez-Escolano, A. L., M. Vazquez-Ochoa, J. Escobar-Herrera, and J. Hernandez-Acosta.** 2003. La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem Biophys Res Commun* **311**:759-66.
54. **Gutierrez-Escolano, L., and R. M. del Angel.** 1996. Nuclear proteins bind to poliovirus 5' untranslated region [published erratum appears in *Arch Med Res* 1996 Winter;27(4):589]. *Archives of Medical Research* **27**:413-9.
55. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with Plasmid. *J Mol Biol* **166**:557.
56. **Heise, T., L. G. Guidotti, V. J. Cavanaugh, and F. V. Chisari.** 1999. Hepatitis B virus RNA-binding proteins associated with cytokine-induced clearance of viral RNA from the liver of transgenic mice. *J Virol* **73**:474-81.
57. **Heise, T., L. G. Guidotti, and F. V. Chisari.** 2001. Characterization of nuclear RNases that cleave hepatitis B virus RNA near the La protein binding site. *J Virol* **75**:6874-83.
58. **Heise, T., L. G. Guidotti, and F. V. Chisari.** 1999. La autoantigen specifically recognizes a predicted stem-loop in hepatitis B virus RNA. *J Virol* **73**:5767-76.
59. **Henikoff, S., and J. G. Henikoff.** 1991. Automated assembly of protein blocks for database searching. *Nucleic Acids Res* **19**:6565-72.
60. **Holcik, M., and R. G. Korneluk.** 2000. Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: role of La autoantigen in XIAP translation. *Mol Cell Biol* **20**:4648-57.
61. **Horke, S.** 2003. Identifikation und Charakterisierung funktioneller Domänen des humanen La Proteins. Dissertation **Fachbereich Biologie der Universität Hamburg**.
62. **Horke, S., K. Reumann, A. Rang, and T. Heise.** 2002. Molecular characterization of the human La protein.hepatitis B virus RNA.B interaction in vitro. *J Biol Chem* **277**:34949-58.
63. **Horke, S., K. Reumann, M. Schweizer, H. Will, and T. Heise.** 2004. Nuclear trafficking of La protein depends on a newly identified NoLS and the ability to bind RNA. *J Biol Chem* **1**:1.
64. **Huang, H. L. J., K.S.;Hu, C.P.;Tsai, C.H.;Lo, S.J.; Chang,C.** 2000. Identification and characterization of a structural protein of hepatitis B virus: a polymerase and surface fusion protein encoded by a spliced RNA. *Virology* **275**:389-410.
65. **Huang, Z. M., and T. S. Yen.** 1994. Hepatitis B virus RNA element that facilitates accumulation of surface gene transcripts in the cytoplasm. *Journal of Virology* **68**:3193-9.
66. **Huang, Z. M., and T. S. Yen.** 1995. Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Molecular.&Cellular.Biology.* **15**:3864-3869.
67. **Intine, R. V., M. Dundr, T. Misteli, and R. J. Maraia.** 2002. Aberrant nuclear trafficking of La protein leads to disordered processing of associated precursor tRNAs. *Mol Cell* **9**:1113-23.
68. **Intine, R. V., A. L. Sakulich, S. B. Koduru, Y. Huang, E. Pierstorff, J. L. Goodier, L. Phan, and R. J. Maraia.** 2000. Control of transfer RNA maturation by phosphorylation of the human La antigen on serine 366. *Mol Cell* **6**:339-48.
69. **Intine, R. V., S. A. Tenenbaum, A. L. Sakulich, J. D. Keene, and R. J. Maraia.** 2003. Differential phosphorylation and subcellular localization of La RNPs associated with precursor tRNAs and translation-related mRNAs. *Mol Cell* **12**:1301-7.
70. **Jacks, A., J. Babon, G. Kelly, I. Manolaridis, P. D. Cary, S. Curry, and M. R. Conte.** 2003. Structure of the C-terminal domain of human La protein reveals a novel RNA

- recognition motif coupled to a helical nuclear retention element. *Structure (Camb)* **11**:833-43.
71. **Jacks, A., G. Kelly, S. Curry, and M. R. Conte.** 2002. Resonance assignment and secondary structure determination of a C-terminal fragment of the lupus autoantigen (La) protein containing a putative RNA recognition motif (RRM). *J Biomol NMR* **22**:387-8.
  72. **Kameoka, S. D., P.; Konarska, M.M.** 2004. p54<sup>nrb</sup> associates with the 5' splice site within large transcription/splicing complexes. *Embo J*:1-10.
  73. **Keene, J. D.** 1996. RNA recognition by autoantigens and autoantibodies. *Mol Biol Rep* **23**:173-81.
  74. **Kickhoefer, V. A. P., M.J.; Chan, E. K.; Rome, L.H.** 2002. The La RNA binding protein interacts with the vault RNA and is vault-associated protein. *J Biol Chem*.
  75. **Kim, Y. K., S. H. Back, J. Rho, S. H. Lee, and S. K. Jang.** 2001. La autoantigen enhances translation of BiP mRNA. *Nucleic Acids Res* **29**:5009-16.
  76. **Kufel, J., C. Allmang, G. Chanfreau, E. Petfalski, D. L. Lafontaine, and D. Tollervey.** 2000. Precursors to the U3 small nucleolar RNA lack small nucleolar RNP proteins but are stabilized by La binding. *Mol Cell Biol* **20**:5415-24.
  77. **Kufel, J., C. Allmang, L. Verdone, J. D. Beggs, and D. Tollervey.** 2002. Lsm proteins are required for normal processing of pre-tRNAs and their efficient association with La-homologous protein Lhp1p. *Mol Cell Biol* **22**:5248-56.
  78. **La Branch, H. F., D.; Chabot, B.** 1991. Proteolysis of splicing factors during rat and monkey cell fractionation. *Nucleic Acids Res* **19**:4509.
  79. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
  80. **Lee, B.-C. S.-T., Y.; Peled, A.; Gothelf, Y.; Jiang, W.; Toledo, J.; Ploemacher, R. E.; Haran-Ghera, N.; Zipori, D.** 1996. A Hematopoietic Organ-Specific 49-kD Nuclear Antigen: Predominance in Immature Normal and Tumor Granulocytes and Detection in Hematopoietic Precursor Cells. *Blood* **87**:2283-2291.
  81. **Li, B., and T. S. Yen.** 2002. Characterization of the nuclear export signal of polypyrimidine tract-binding protein. *J Biol Chem* **277**:10306-14. Epub 2002 Jan 7.
  82. **Lin-Marq, N., and S. G. Clarkson.** 1998. Efficient synthesis, termination and release of RNA polymerase III transcripts in *Xenopus* extracts depleted of La protein. *EMBO Journal* **17**:2033-41.
  83. **Lombard, D. B., and L. Guarente.** 2000. Nijmegen breakage syndrome disease protein and MRE11 at PML nuclear bodies and meiotic telomeres. *Cancer Res* **60**:2331-4.
  84. **Lutz, C. S., C. Cooke, J. P. O'Connor, R. Kobayashi, and J. C. Alwine.** 1998. The snRNP-free U1A (SF-A) complex(es): identification of the largest subunit as PSF, the polypyrimidine-tract binding protein-associated splicing factor. *Rna* **4**:1493-9.
  85. **Maraia, R. J.** 2001. La protein and the trafficking of nascent RNA polymerase iii transcripts. *J Cell Biol* **153**:F13-8.
  86. **Maraia, R. J., and R. V. Intine.** 2002. La protein and its associated small nuclear and nucleolar precursor RNAs. *Gene Expr* **10**:41-57.
  87. **Maraia, R. J., and R. V. Intine.** 2001. Recognition of nascent RNA by the human La antigen: conserved and divergent features of structure and function. *Mol Cell Biol* **21**:367-79.
  88. **Maraia, R. J., D. J. Kenan, and J. D. Keene.** 1994. Eukaryotic transcription termination factor La mediates transcript release and facilitates reinitiation by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* **14**:2147-58.
  89. **Martinez-Salas, E. R., R.; Lafuente, E.; López de Quinto, S.** 2001. Functional interaction in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J Gen Virol* **82**:973-984.

90. **Mathur, M., P. W. Tucker, and H. H. Samuels.** 2001. PSF is a novel corepressor that mediates its effect through Sin3A and the DNA binding domain of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* **21**:2298-311.
91. **Mattioli, M., and M. Reichlin.** 1974. Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis & Rheumatism* **17**:421-9.
92. **McLaren, R. S., N. Caruccio, and J. Ross.** 1997. Human La protein: a stabilizer of histone mRNA. *Mol Cell Biol* **17**:3028-36.
93. **Meerovitch, K., Y. V. Svitkin, H. S. Lee, F. Lejbkowitz, D. J. Kenan, E. K. Chan, V. I. Agol, J. D. Keene, and N. Sonenberg.** 1993. La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *Journal of Virology* **67**:3798-807.
94. **Meissner, M., T. Dechat, C. Gerner, R. Grimm, R. Foisner, and G. Saueremann.** 2000. Differential nuclear localization and nuclear matrix association of the splicing factors PSF and PTB. *J Cell Biochem* **76**:559-66.
95. **Modrow S, F. D.** 1997. *Molekulare Virologie*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin; Oxford.
96. **Nagai, K., C. Oubridge, T. H. Jessen, J. Li, and P. R. Evans.** 1990. Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature* **348**:515-20.
97. **Otto, H. D., M.; Bengtsson,L.; Hucho, F.** 2001. Identification of tyrosine-phosphorylated proteins associated with the nuclear envelope. *Eur J Biochem* **268**:420-428.
98. **Pannone, B. K., D. Xue, and S. L. Wolin.** 1998. A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts. *Embo J* **17**:7442-53.
99. **Parkin, N. T. C., E.;Darveau,A;Rosen, C.;Haseltine,W.;Sonenberg, N.** 1988. Mutational analysis of the 5' non-coding region of human immunodeficiency virus type 1: effects of secondary structure on translation. *Embo J* **7**:2831-2837.
100. **Patton, J. G., E. B. Porro, J. Galceran, P. Tempst, and B. Nadal-Ginard.** 1993. Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev* **7**:393-406.
101. **Peek, R., G. J. Pruijn, A. J. van der Kemp, and W. J. van Venrooij.** 1993. Subcellular distribution of Ro ribonucleoprotein complexes and their constituents. *J Cell Sci* **106**:929-35.
102. **Peng, R., B. T. Dye, I. Perez, D. C. Barnard, A. B. Thompson, and J. G. Patton.** 2002. PSF and p54nrb bind a conserved stem in U5 snRNA. *Rna* **8**:1334-47.
103. **Proudfoot, N.** 2000. Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem Sci* **25**:290-3.
104. **Proudfoot, N. J. F., A.; Dye, M.J.** 2002. Integrating mRNA Processing with Transcription. *Cell* **108**:501-512.
105. **Raats, J. M., W. F. Roeffen, S. Litjens, I. Bulduk, G. Mans, W. J. van Venrooij, and G. J. Pruijn.** 2003. Human recombinant anti-La (SS-B) autoantibodies demonstrate the accumulation of phosphoserine-366-containing la isoforms in nucleoplasmic speckles. *Eur J Cell Biol* **82**:131-41.
106. **Rinke, J., and J. A. Steitz.** 1985. Association of the lupus antigen La with a subset of U6 snRNA molecules. *Nucleic Acids Res* **13**:2617-29.
107. **Rinke, J., and J. A. Steitz.** 1982. Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell* **29**:149-59.

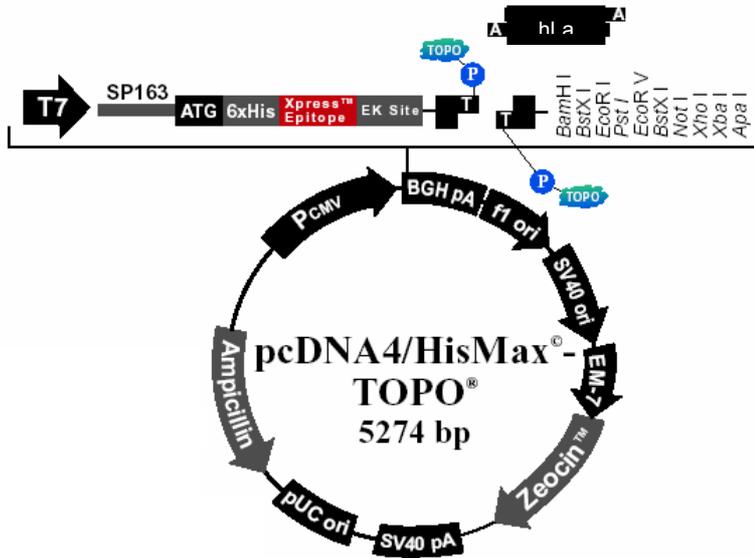
108. **Rosenberger, U., I. Lehmann, C. Weise, P. Franke, F. Hucho, and K. Buchner.** 2002. Identification of PSF as a protein kinase Calpha-binding protein in the cell nucleus. *J Cell Biochem* **86**:394-402.
109. **Rosenblum, J. S., L. F. Pemberton, N. Bonifaci, and G. Blobel.** 1998. Nuclear import and the evolution of a multifunctional RNA-binding protein. *J Cell Biol* **143**:887-99.
110. **Sambrook, J. F., E.F.; Maniatis, T.** 1989. *Molecular Cloning - A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edition.
111. **Sanger, F. N., S.; Coulsen, A.R.** 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-5467.
112. **Scherl, A. C., Y.; Déon, C.; Callé, A.; Kindbeiter, K.; Sanchez, J.-C.; Greco, A.; Hochstrasser, D.; Diaz, J.-J.** 2002. Functional Proteomic Analysis of Human Nucleolus. *Mol Biol Cell* **13**:4100-4109.
113. **Scherly, D., F. Stutz, N. Lin-Marq, and S. G. Clarkson.** 1993. La proteins from *Xenopus laevis*. cDNA cloning and developmental expression. *J Mol Biol* **231**:196-204.
114. **Seeger, C., and W. S. Mason.** 2000. Hepatitis B virus biology [In Process Citation]. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:51-68.
115. **Sharp, P. A.** 2001. RNA interference--2001. *Genes Dev* **15**:485-90.
116. **Shav-Tal, Y., B. Lee, S. Bar-Haim, J. Vandekerckhove, and D. Zipori.** 2000. Enhanced proteolysis of pre-mRNA splicing factors in myeloid cells. *Exp Hematol* **28**:1029-38.
117. **Shav-Tal, Y., and D. Zipori.** 2002. PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* **531**:109-14.
118. **Shi, H., C. A. O'Brien, D. J. Van Horn, and S. L. Wolin.** 1996. A misfolded form of 5S rRNA is complexed with the Ro and La autoantigens. *Rna* **2**:769-84.
119. **Simons, F. H., F. J. Broers, W. J. Van Venrooij, and G. J. Pruijn.** 1996. Characterization of cis-acting signals for nuclear import and retention of the La (SS-B) autoantigen. *Experimental Cell Research* **224**:224-36.
120. **Smith, G. J., 3rd, J. E. Donello, R. Luck, G. Steger, and T. J. Hope.** 1998. The hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element contains two conserved RNA stem-loops which are required for function. *Nucleic Acids Res* **26**:4818-27.
121. **Soussan, P., F. Garreau, H. Zylberberg, C. Ferray, C. Brechot, and D. Kremsdorf.** 2000. In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. *J Clin Invest* **105**:55-60.
122. **Spangberg, K., L. Goobar-Larsson, M. Wahren-Herlenius, and S. Schwartz.** 1999. The La protein from human liver cells interacts specifically with the U-rich region in the hepatitis C virus 3' untranslated region. *J Hum Virol* **2**:296-307.
123. **Svitkin, Y. V., K. Meerovitch, H. S. Lee, J. N. Dholakia, D. J. Kenan, V. I. Agol, and N. Sonenberg.** 1994. Internal translation initiation on poliovirus RNA: further characterization of La function in poliovirus translation in vitro. *J Virol* **68**:1544-50.
124. **Svitkin, Y. V., A. Pause, and N. Sonenberg.** 1994. La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *Journal of Virology* **68**:7001-7.
125. **Topfer, F., T. Gordon, and J. McCluskey.** 1993. Characterization of the mouse autoantigen La (SS-B). Identification of conserved RNA-binding motifs, a putative ATP binding site and reactivity of recombinant protein with poly(U) and human autoantibodies. *Journal of Immunology* **150**:3091-100.
126. **Trotta, R., T. Vignudelli, O. Candini, R. V. Intine, L. Pecorari, C. Guerzoni, G. Santilli, M. W. Byrom, S. Goldoni, L. P. Ford, M. A. Caligiuri, R. J. Maraia, D. Perrotti, and B. Calabretta.** 2003. BCR/ABL activates mdm2 mRNA translation via the La antigen. *Cancer Cell* **3**:145-60.

127. **Tsui, L. V., L. G. Guidotti, T. Ishikawa, and F. V. Chisari.** 1995. Posttranscriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:12398-12402.
128. **Urban, R. J. B., Y.;Kurosky,A.;Wood,T.G.;Gasic,S.** 2000. PTB-associated splicing factor is a negative regulator of transcriptional activity of the porcine p450scc insulin-like growth factor response element. *Mol Endocrinol* **14**:774-782.
129. **Urban, R. J. B., Y.;Wood,T.G.** 2002. NH2 terminus of PTB-associated splicing factor binds to the porcine P450 scc IGF-I response element. *Am J Physiol Endocrinol* **283**:E423-E427.
130. **Van Horn, D. J., C. J. Yoo, D. Xue, H. Shi, and S. L. Wolin.** 1997. The La protein in *Schizosaccharomyces pombe*: a conserved yet dispensable phosphoprotein that functions in tRNA maturation. *Rna* **3**:1434-43.
131. **Westermann, S., and K. Weber.** 2000. Cloning and recombinant expression of the La RNA-binding protein from *Trypanosoma brucei*. *Biochim Biophys Acta* **1492**:483-7.
132. **Wolin, S. L., and T. Cedervall.** 2002. The la protein. *Annu Rev Biochem* **71**:375-403.
133. **Xue, D., D. A. Rubinson, B. K. Pannone, C. J. Yoo, and S. L. Wolin.** 2000. U snRNP assembly in yeast involves the La protein [published erratum appears in *EMBO J* 2000 Jun 1;19(11):2763]. *Embo J* **19**:1650-60.
134. **Yoo, C. J., and S. L. Wolin.** 1994. La proteins from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast homolog of the La autoantigen is dispensable for growth. *Molecular & Cellular Biology* **14**:5412-24.
135. **Yoo, C. J., and S. L. Wolin.** 1997. The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell* **89**:393-402.
136. **Zang, W. Q., B. Li, P. Y. Huang, M. M. Lai, and T. S. Yen.** 2001. Role of polypyrimidine tract binding protein in the function of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element. *J Virol* **75**:10779-86.
137. **Zhu, J., A. Hayakawa, T. Kakegawa, and R. L. Kaspar.** 2001. Binding of the La autoantigen to the 5' untranslated region of a chimeric human translation elongation factor 1A reporter mRNA inhibits translation in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1521**:19-29.
138. **Zolotukhin, A. S., D. Michalowski, J. Bear, S. V. Smulevitch, A. M. Traish, R. Peng, J. Patton, I. N. Shatsky, and B. K. Felber.** 2003. PSF acts through the human immunodeficiency virus type 1 mRNA instability elements to regulate virus expression. *Mol Cell Biol* **23**:6618-30.

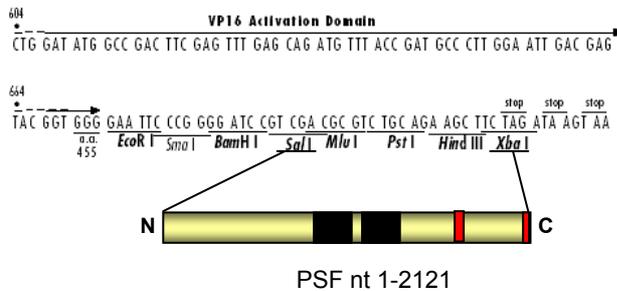
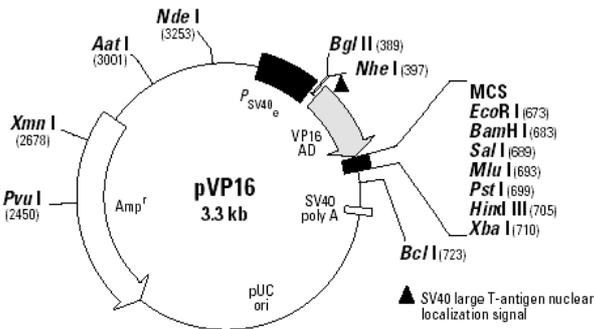
# Anhang

## Verwendete Plasmide

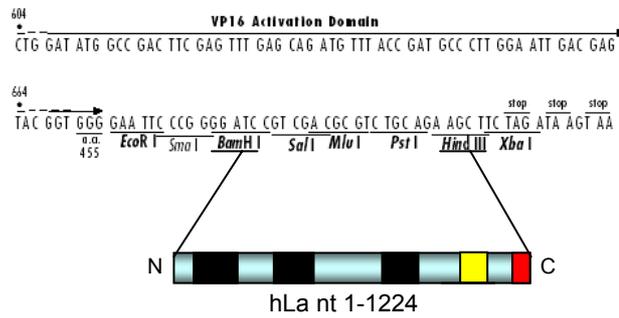
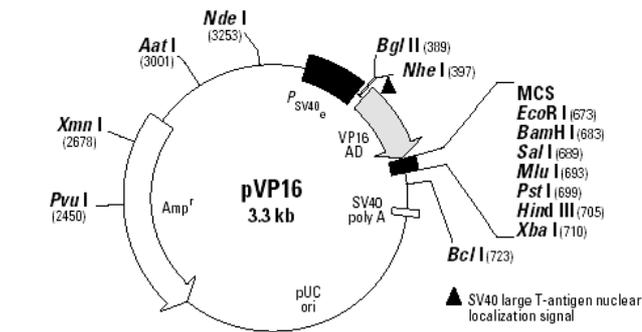
pcDNA4/HisMax-TOPO-La wt ("La 15/14")



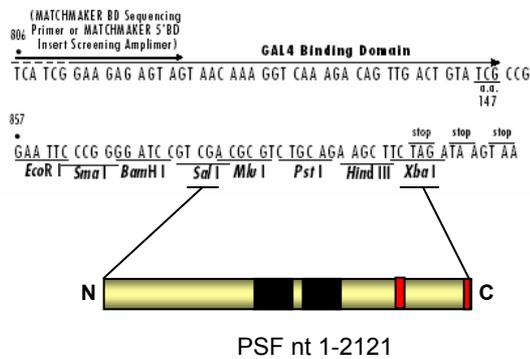
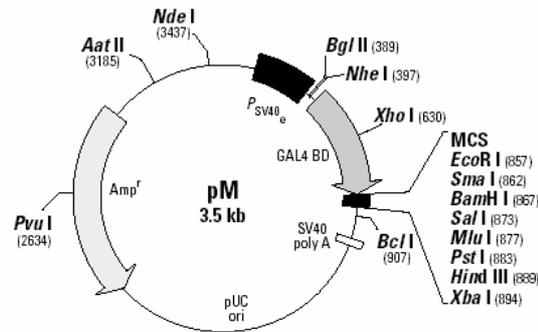
pVP16-PSF



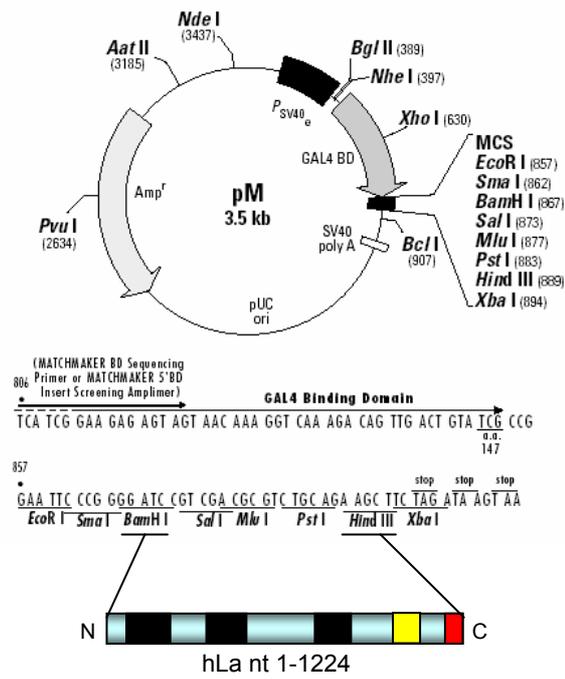
pVP16-hLa



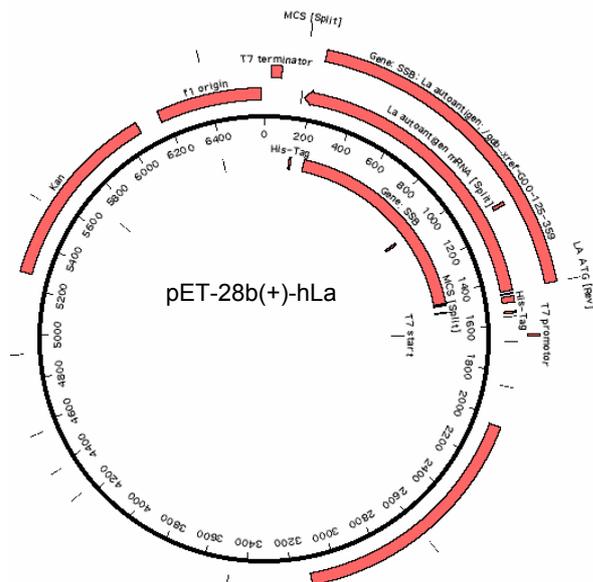
pM-PSF



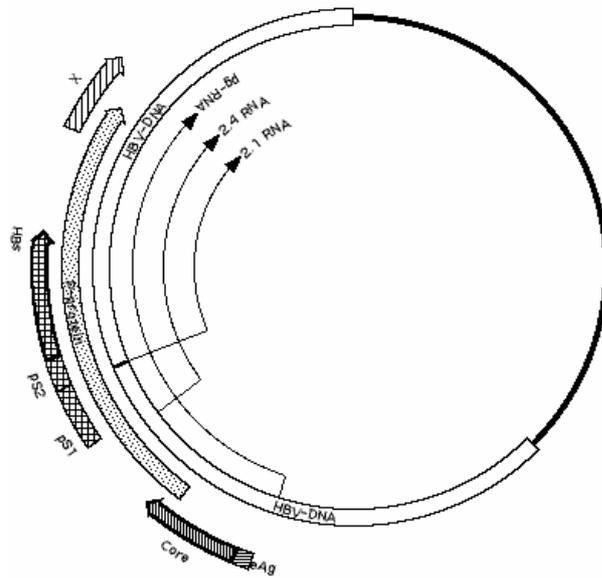
pM-hLa



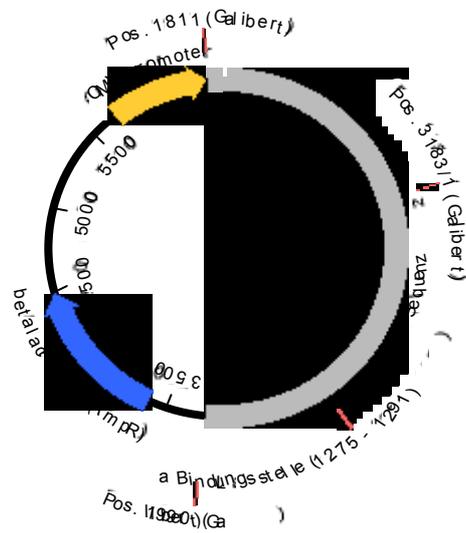
pET-28b(+)-hLa

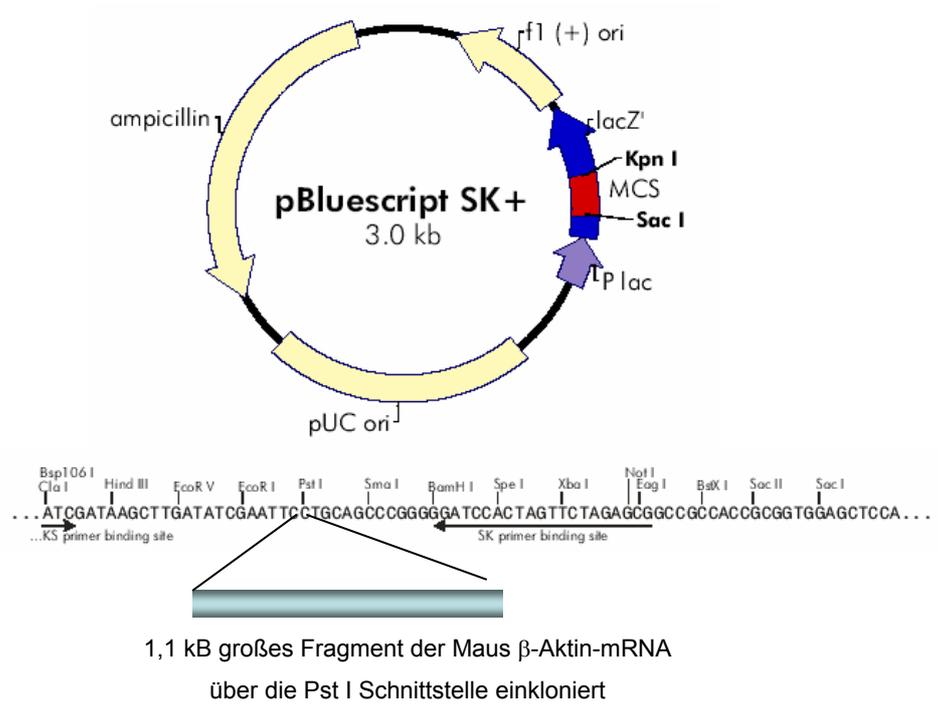


pHBV-Dimer (pSM2)



pCHT (HBV Expressionsvektor)



pBlueskript SK- $\beta$ -Aktin

**Charakteristika der Bakterienstämme (aus (110)):**

Stamm	Genotyp	Merkmale
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Dieser rekombinations-defizienter Stamm ist geeignet zur Vermehrung von Plasmiden und Cosmiden. Das $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 erlaubt eine $\alpha$ -Komplementierung mit dem amino-Terminus von $\beta$ -Galaktosidase, codiert in pUC Vektoren
BL21(DE3)	<i>hdsS gal</i> ( $\lambda$ <i>cIts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene 1</i> )	Dieser Stamm ist geeignet für hochgradige Expression von Genen, die in Expressionsvektoren kloniert sind, die einen T7 Promoter tragen. Die T7 RNA Polymerase liegt auf dem Bakteriophagen $\lambda$ DE3, der stabil im Chromosom von BL21 integriert ist.

**Quantifizierung eines radioaktiv-markierten in vitro Transkriptes am Beispiel der HBV-RNA.B**

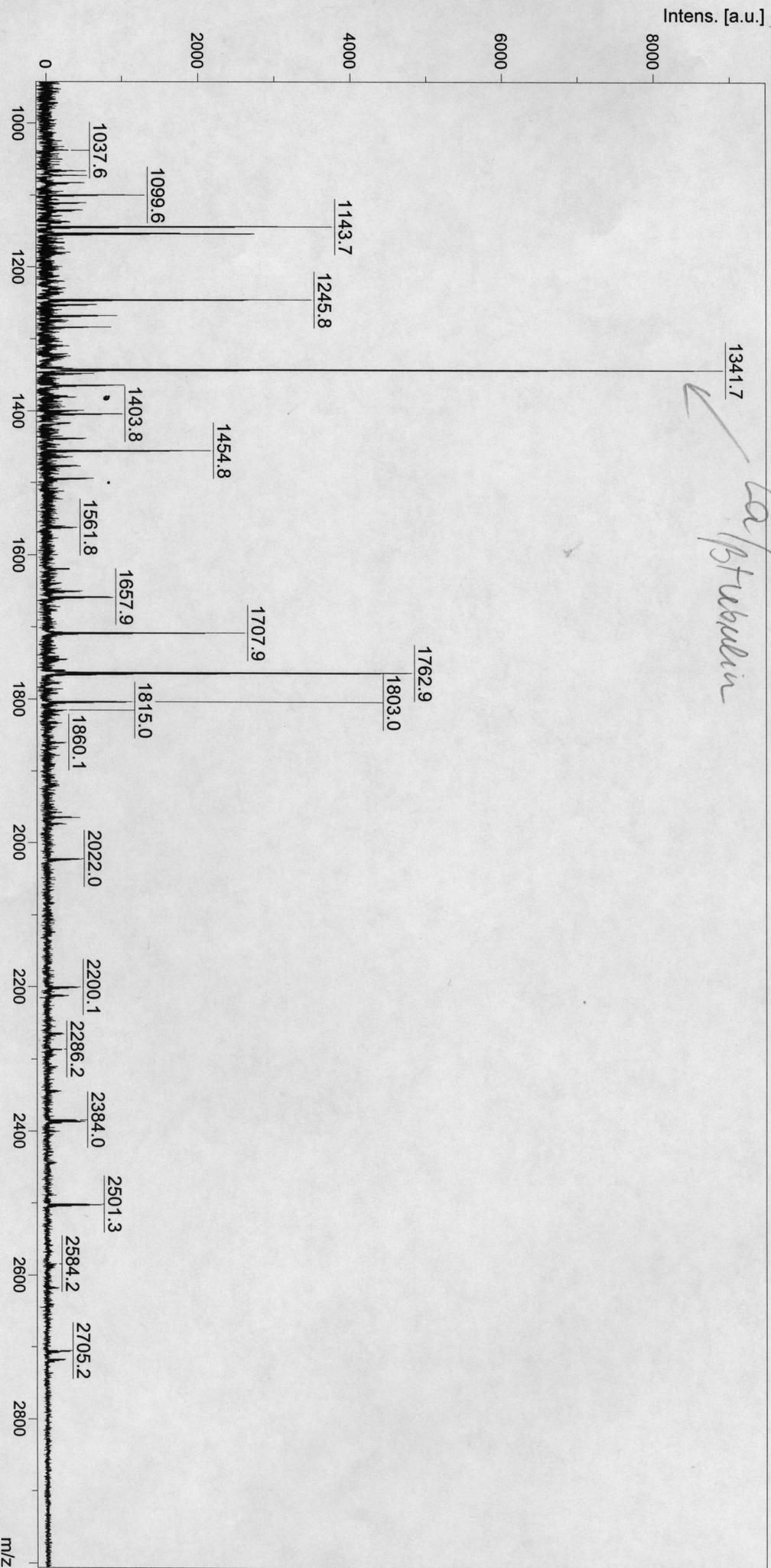
1. CPM der Probe  $1 \times 500 =$  Gesamtmenge der CPM in der Reaktion "x 500", da 10% von 50  $\mu$ l gezählt werden  $\rightarrow$  Faktor 500
2. Das Ergebnis aus 1. wird durch 116 dividiert und stellt die CPM pro ng RNA dar, wenn jedes Nukleotid inkorporiert wäre.  
" dividiert durch 116" da 92,5 pM  $^{32}$ P-UTP in der Standardreaktion eingesetzt werden. Diese 92,5 werden mit dem Molekulargewicht eines Nukleotides (355) multipliziert und drücken einen theoretischen Wert von 116 ng RNA pro Reaktion aus, wenn jedes 3,53 nt ein U ist
3. CPM der Probe  $2 \times 10 =$  Gesamtmenge der CPM pro  $\mu$ l des Eluates "x 10", da 10% von 1  $\mu$ l der eingesetzten Lösung gezählt werden
4.  $3./2. =$  Menge der RNA [ng] in 1  $\mu$ l Eluat
5. MW der RNA; für HBV-RNA.B = 106 nt  $\rightarrow 0,037$  ng = 1 fmol
6.  $4./5. =$  fmol RNA pro  $\mu$ l Eluat

Beispielrechnung für HBV-RNA.B: Probe 1 = 264879 CPM; Probe 2 = 19825 CPM  $\rightarrow 4,7$  fmol/  $\mu$ l. Im Durchschnitt wurden zwischen 5-15 fmol/  $\mu$ l erreicht.

## Beispiel der Quantifizierung der CAT Expression

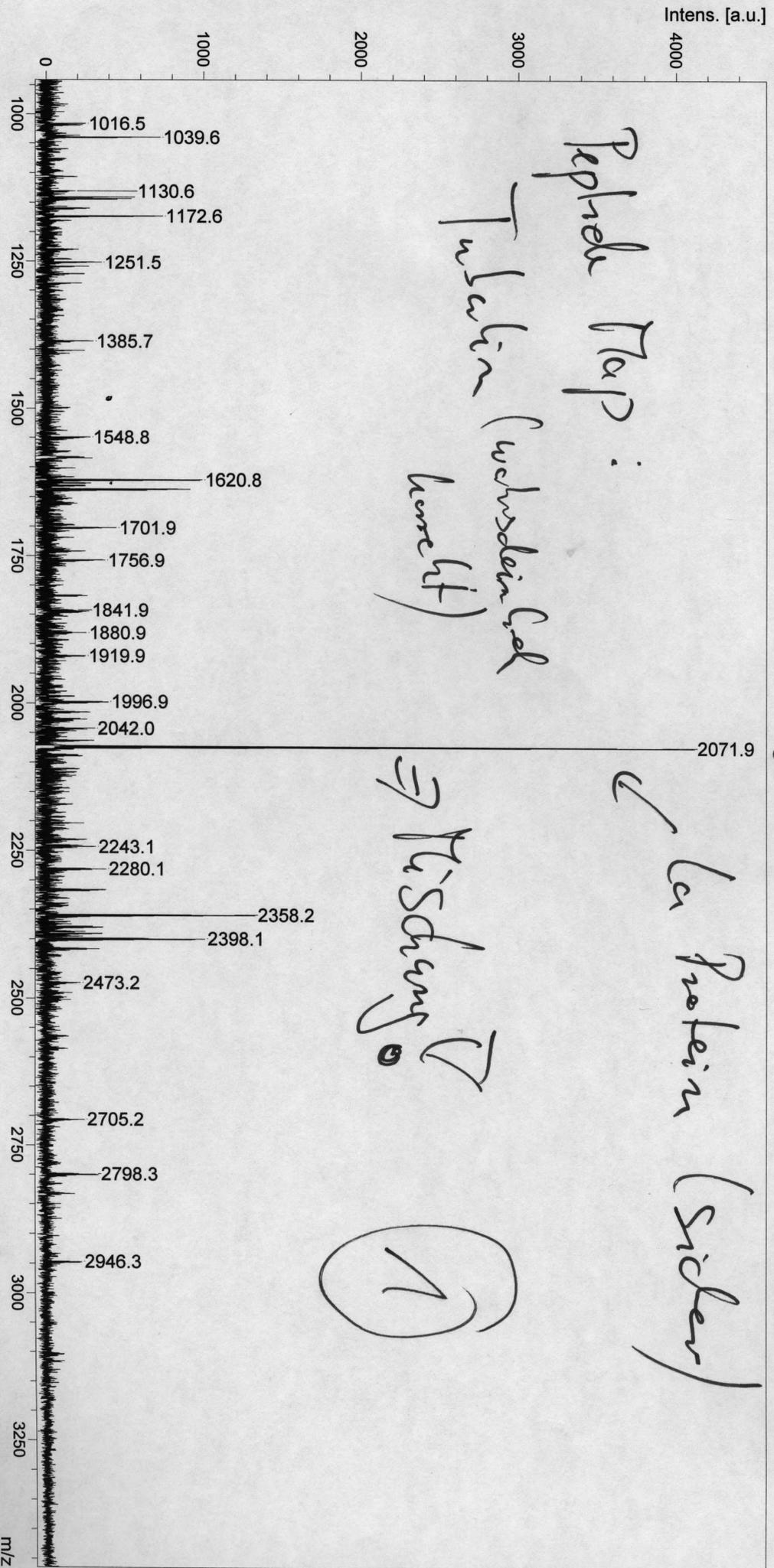
Probe	Gesamtprotein [nach Bradford]	x-fache Erhöhung gegenüber dem geringsten Proteingehalt	Transfektions- effizienz [nach GFP- Signal in WB]	x-fache Erhöhung gegenüber der geringsten Effizienz	OD <sub>405-492nm</sub> [CAT]	OD nach Abgleich [x x-fache Erhöhung des Gesamtproteins und Transfektions- effizienz]	OD/ Ing CAT [aus Eich- kurve]	-fache Erhöhung
pM-hLa + pVP16-PSF	1,389	1,766	2,96	2,91	0,15	0,77	1,093	6,28
nicht-transfiziert	2,045	1,199	1,09	7,9	0,012	0,123	0,174	1

Comment 1 E2  
Comment 2 alpha CN

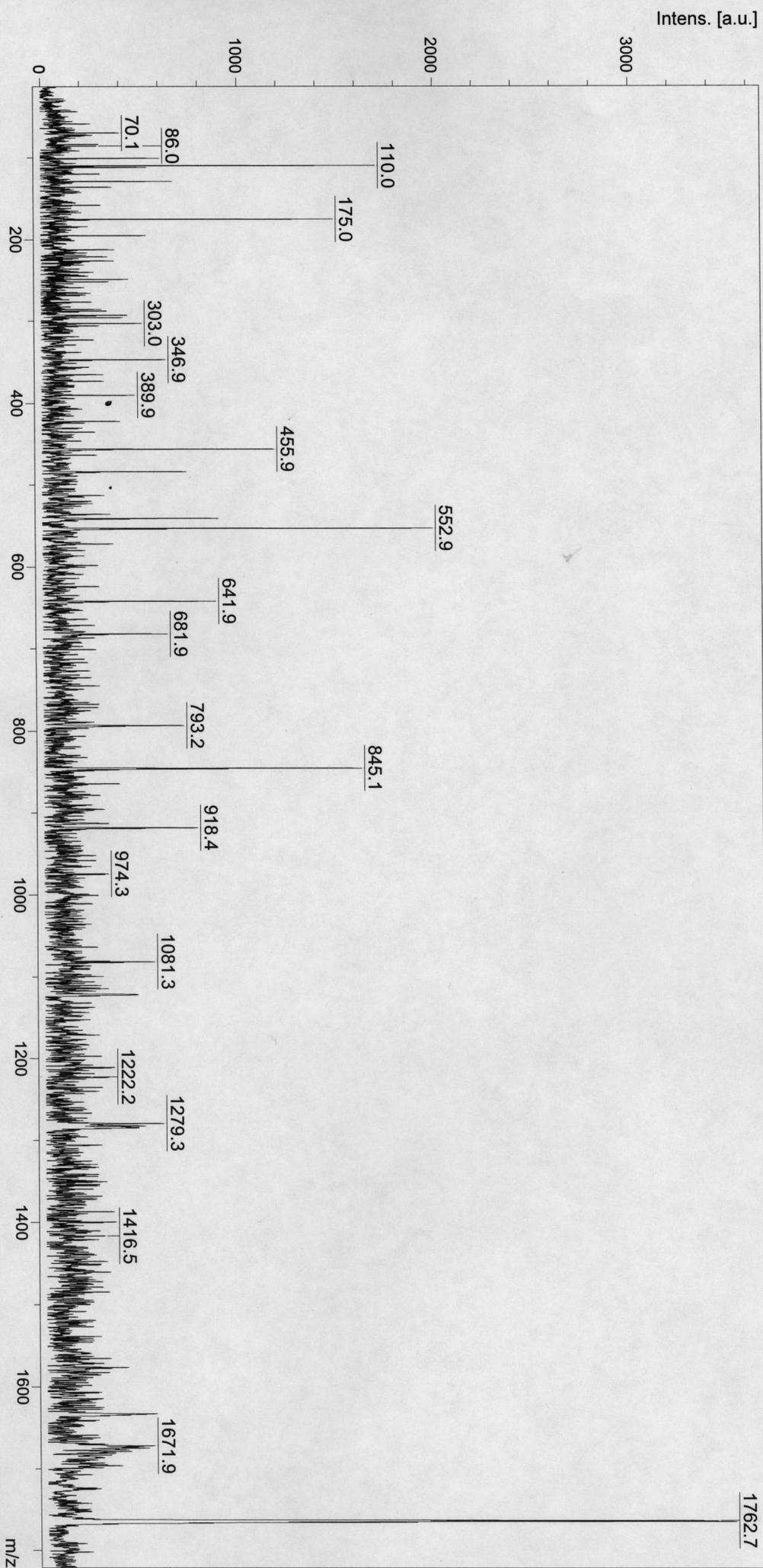


Comment 1 B2  
Comment 2 alpha CN

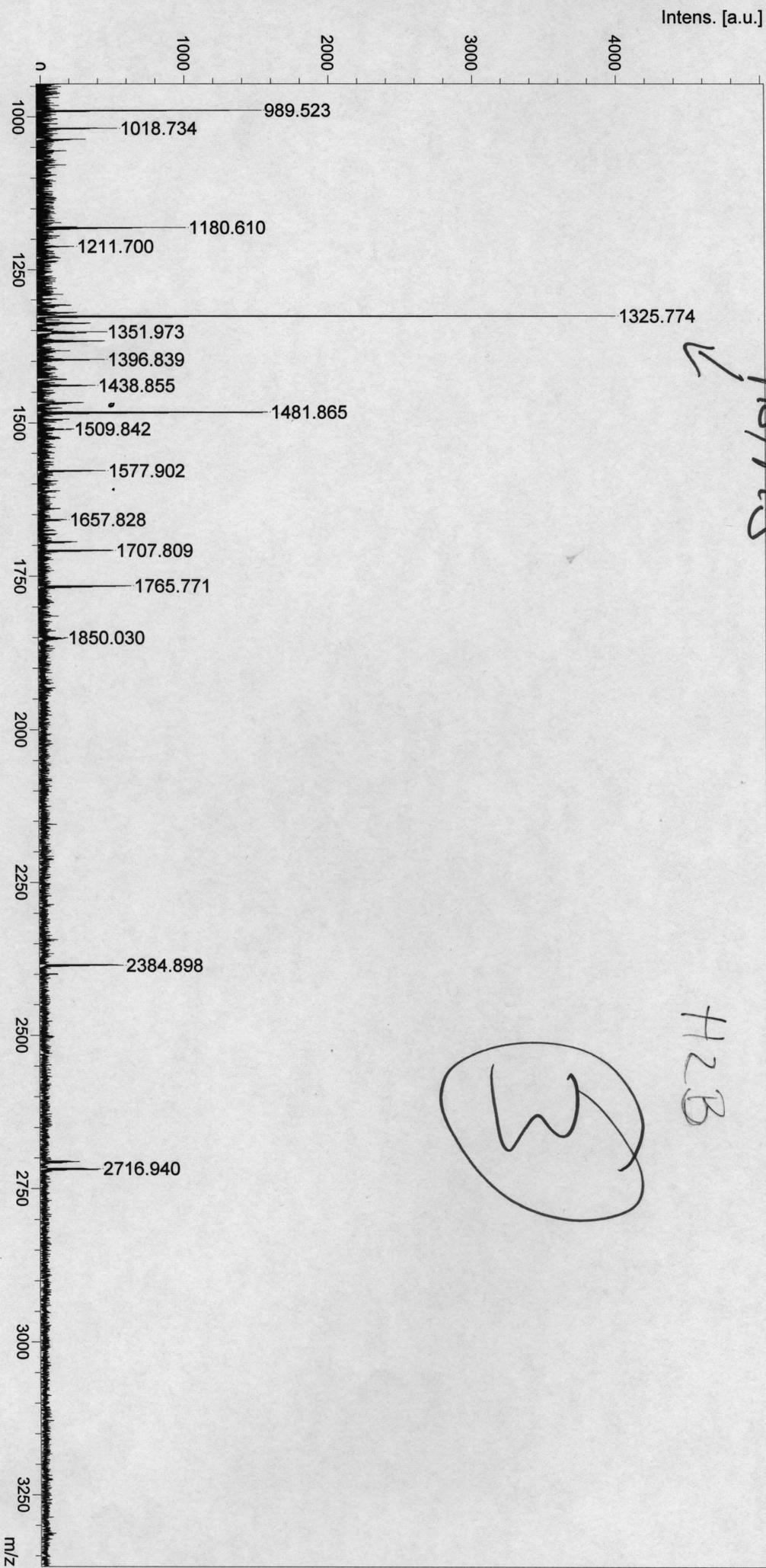
MSMS



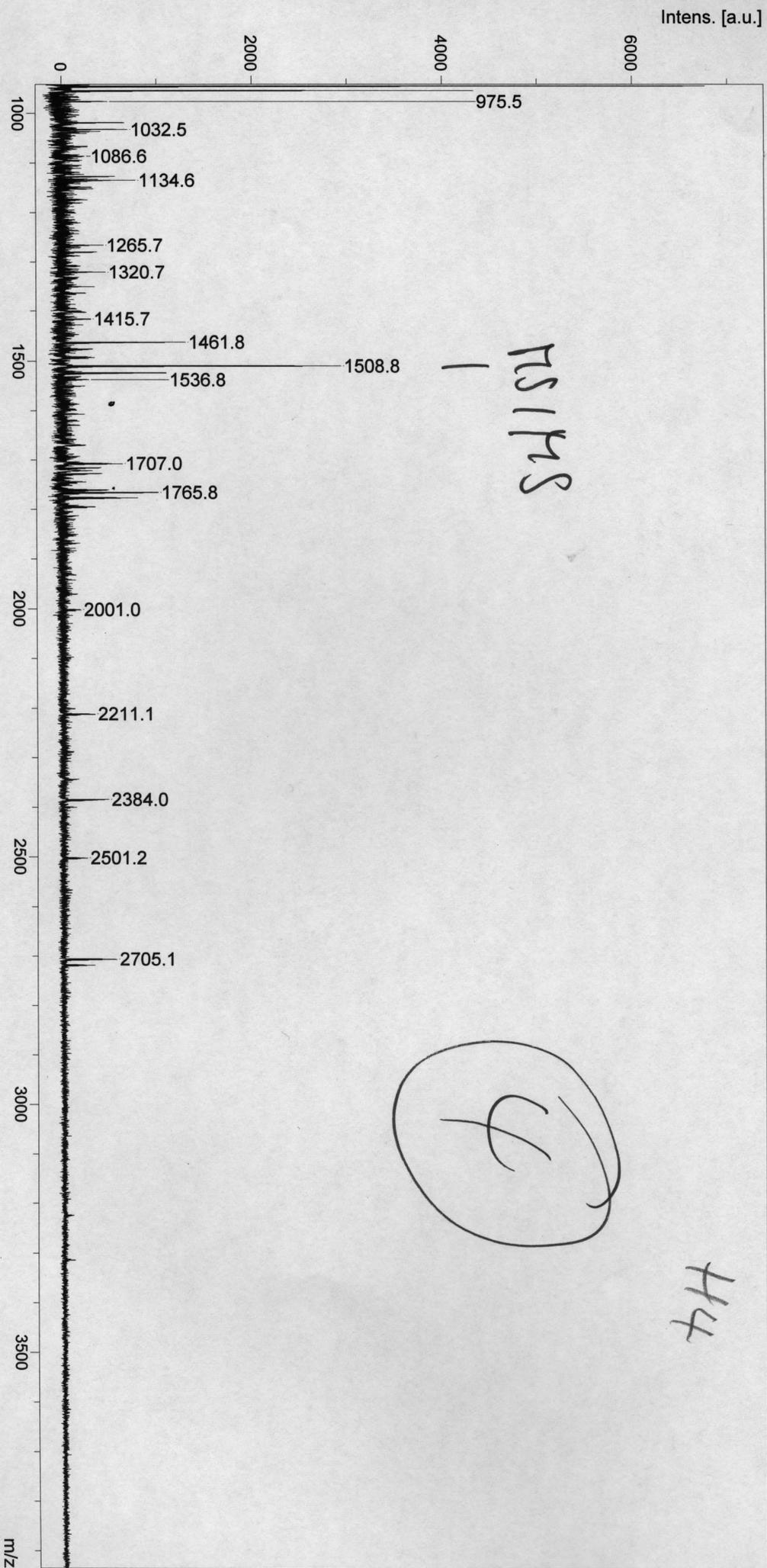
Comment 1 no  
Comment 2 no



Comment 1 C3  
Comment 2 alpha CN

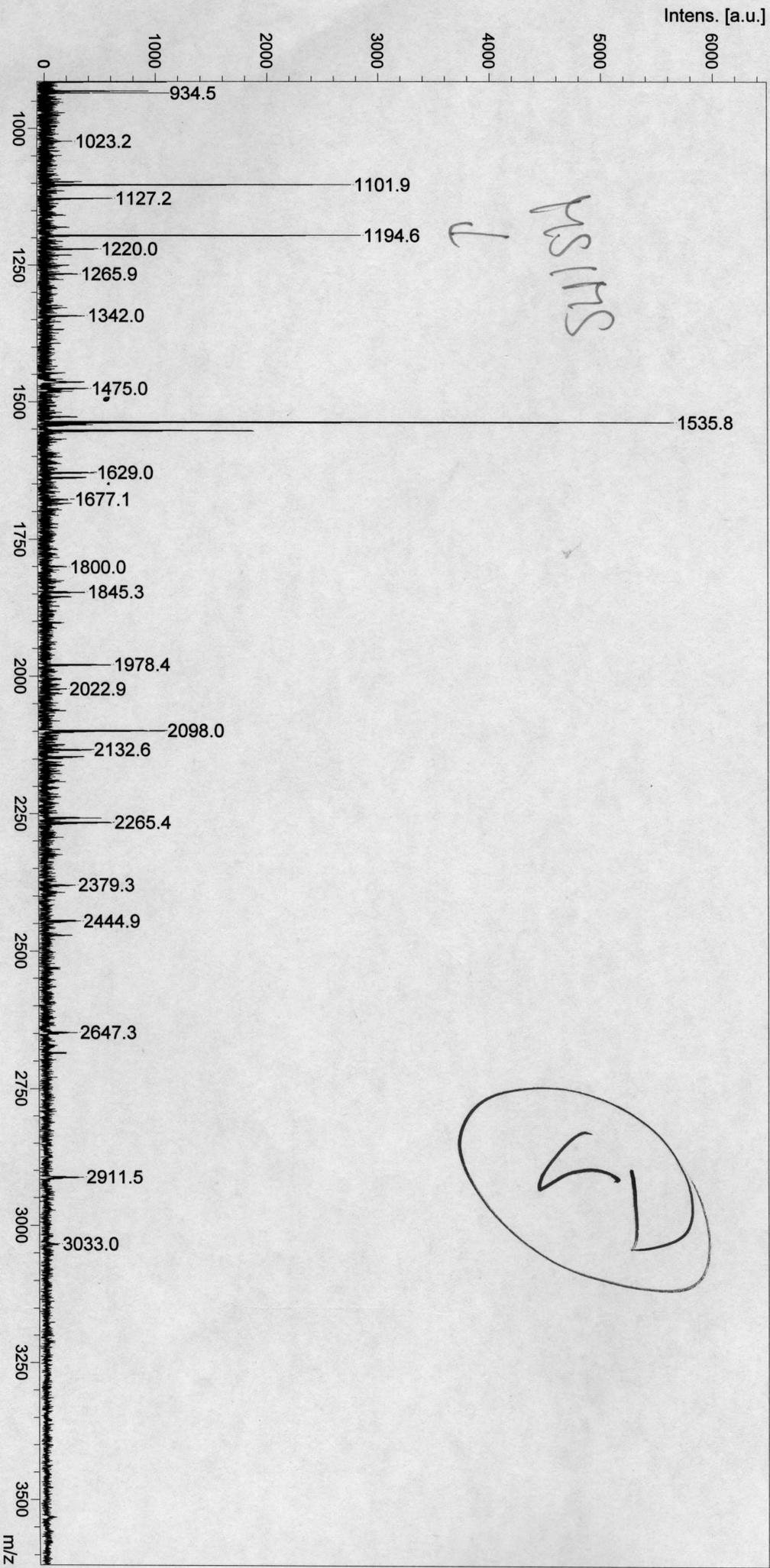


Comment 1 B3  
Comment 2 alpha CN



Comment 1 c6  
Comment 2 alpha CB

in RMPK



Comment 1 no  
Comment 2 no

PSF

