

# **Charakterisierung von AUF1-homologen Mosquito-Proteinen und deren Einfluss auf die RNA-Replikation des West-Nil-Virus**

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Alexandra Meyer

geboren am 15. Oktober 1990 in Chemnitz

öffentlich verteidigt am 06.11.2020

Gutacher:

Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

Prof. Dr. Gary Sawers

Prof. Dr. Norbert Tautz

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>I. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Das West-Nil-Virus .....	1
1.2. Die Virus-Familie <i>Flaviviridae</i> .....	3
1.3. Aufbau des WNV-Genoms .....	4
1.4. Der Lebenszyklus des WNV .....	5
1.5. Die Replikation des WNV .....	5
1.5.1. Essentielle Zyklisierungselemente .....	6
1.5.2. Der essentielle 3'SL und weitere <i>stem loop</i> -Strukturen der 3'UTR .....	7
1.5.3. Essentielle <i>stem loop</i> -Strukturen der 5'UTR .....	8
1.6. Am Lebenszyklus von Flaviviren beteiligte Wirtsfaktoren .....	8
1.7. AUF1 - eine multifunktionale Proteinfamilie .....	10
1.8. AUF1p45 als flaviviraler Wirtsfaktor .....	11
1.9. AUF1-homologe Mosquito-Proteine.....	13
1.10. Zielstellung .....	15
<b>II. Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1. Chemikalien, Puffer und Verbrauchsmaterialien .....	16
2.2. Bakterienstämme und Plasmide .....	16
2.3. Kultivierungsbedingungen für prokaryotische Zellen .....	18
2.3.1. Nährmedium und Zusätze .....	18
2.3.2. Anzucht und Zellernte .....	18
2.4. Kultivierung und Transfektion von Mosquitozellen .....	19
2.4.1. Kultivierung von C6/36-Zellen.....	19
2.4.2. Kultivierung von U4.4-Zellen.....	19
2.4.3. Kryokonservierung von Zellen.....	20
2.4.4. Revitalisierung von Zellen .....	20
2.4.5. Quantifizierung der Squid-p30 und Squid-p32 Molekülzahl pro Zelle.....	20
2.4.6. Transfektion von viraler RNA und siRNA mittels Elektroporation .....	21
2.4.7. Transfektion von Plasmid-DNA mit Lipofectamine 2000 .....	22
2.4.8. Isolierung von Einzelzellklonen .....	22
2.4.8.1. Isolierung von Einzelzellklonen mittels FACS.....	22
2.4.8.2. Isolierung von Einzelzellklonen mittels <i>limiting dilution</i> .....	23
2.4.9. Screening der potentiellen Squid-p30 und Squid-p32 <i>knockout</i> -Klone .....	23
2.5. Molekulargenetische Arbeiten mit RNA.....	24
2.5.1. <i>in vitro</i> Transkription von RNA .....	24
2.5.2. Konzentrationsbestimmung von RNA.....	25
2.5.3. Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese.....	25
2.5.4. Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	25
2.5.5. RNA-Größenstandard.....	26
2.6. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA .....	26
2.6.1. DNA-Isolation .....	26
2.6.1.1. Genomische DNA-Isolation aus Mosquitozellen.....	26
2.6.1.2. Miniplasmidisolation.....	26
2.6.1.3. Plasmidisolation mit kommerziellen Kits.....	27
2.6.2. Agarose-Gelelektrophorese .....	27
2.6.3. DNA-Größenstandard.....	28

2.6.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	28
2.6.5. DNA-Reinigung .....	28
2.6.6. DNA-Konzentrationsbestimmung .....	28
2.6.7. Ligation von DNA-Fragmenten .....	29
2.6.8. Phosphorylierung/Dephosphorylierung von DNA .....	29
2.6.9. <i>Annealing</i> von DNA-Oligonukleotiden .....	29
2.6.10. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	29
2.6.10.1. Auswahl der Primer .....	29
2.6.10.2. Standard-PCR .....	31
2.6.10.3. <i>site directed mutagenesis</i> -PCR .....	32
2.6.11. Transformation nach der Rubidiumchlorid-Methode .....	33
2.6.12. CRISPR/Cas9 .....	33
2.6.13. DNA-Sequenzierung .....	35
2.7. Proteinbiochemische Methoden .....	35
2.7.1. Rekombinante Expression und Reinigung von SUMO-Fusionsproteinen .....	35
2.7.1.1. Rekombinante Herstellung von Squid-p30/p32 und Squid-p32-Alanin-Varianten .....	35
2.7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	37
2.7.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	37
2.7.4. Coomassie-Färbung .....	38
2.7.5. FLAG-Immunpräzipitation .....	38
2.7.6. Western Blot .....	39
2.7.7. Analytische Ultrazentrifugation .....	40
2.7.8. Präparation von Zellextrakt .....	41
2.7.8.1. Präparation von Gesamtzellextrakt .....	41
2.7.8.2. Präparation von zytoplasmatischem Zellextrakt .....	41
2.8. Enzymologische Methoden .....	41
2.8.1. radioaktiver <i>in vitro</i> Methylierungs-Assay .....	41
2.8.2. <i>in vitro</i> RNA-abhängiger RNA-Polymerase-Assay .....	42
2.8.3. Messung der Renilla-Luziferase-Aktivität .....	43
2.8.4. Bestimmung der RNA-Bindeaffinität .....	44
2.8.5. Fluorimetrische RNA-RNA-Interaktions-Assays .....	44
2.8.5.1. Fluorimetrischer RNA-Destabilisierungs-Assay .....	44
2.8.5.2. Fluorimetrischer RNA- <i>annealing</i> -Assay .....	46
2.8.6. Circular dichroismus .....	47
<b>III. Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
3.1. Charakterisierung der Mosquito-Proteine Squid-p30 und Squid-p32 .....	48
3.1.1. Squid-p30 und Squid-p32 liegen als Monomer vor .....	48
3.1.2. Immunpräzipitiertes FLAG-Squid-p30 und FLAG-Squid-p32 aus Mosquitozellen ist nicht methyliert .....	49
3.1.3. Squid-p30 zeigt eine zehnfach höhere RNA-Bindeaffinität zu AU/GU-reicher RNA als Squid-p32 .....	51
3.1.4. Die Squid-Proteine besitzen eine RNA-Chaperon-Aktivität .....	53
3.1.5. Die Squid-Proteine besitzen nur eine schwache RNA- <i>annealing</i> -Aktivität .....	56
3.1.6. Die Umstrukturierungsaktivitäten der Squid-Proteine sind nicht temperaturabhängig ..	59
3.1.7. Die Squid-Proteine stimulieren die (-)-Strang-RNA-Synthese des WNV stärker als AUF1p45 .....	61
3.2. Charakterisierung der Proteinvarianten des Mosquito-Proteins Squid-p32 .....	63
3.2.1. Rekombinante Reinigung der Squid-p32-Varianten .....	64
3.2.2. Der Sekundärstrukturgehalt der Squid-p32-Varianten ist fast identisch mit dem des Wildtyps .....	65

3.2.3. Die Substitution der Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs von Squid-p32 führt zu einer zehnfach höheren RNA-Bindeaffinität zu AU/GU-reicher RNA.....	67
3.2.4. Die Substitution der Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs von Squid-p32 beeinträchtigt dessen RNA-Chaperon-Aktivität .....	68
3.2.5. Die Substitution der Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs von Squid-p32 beeinträchtigt dessen RNA- <i>annealing</i> -Aktivität .....	70
3.3. Analyse der Squid-Proteine in Mosquitozellen .....	72
3.3.1. Detektion der Squid-Proteine in verschiedenen Mosquitozellen.....	72
3.3.2. RNAi-vermittelte Depletion von Squid-p30 und Squid-p32 in C6/36-Zellen .....	75
3.3.3. RNAi-vermittelte Depletion von Squid-p30 und Squid-p32 in U4.4-Zellen .....	76
3.3.4. Das WNV-Replikon repliziert in U4.4-Zellen ineffizient .....	77
3.3.5. Die Depletion der Squid-Proteine hat keinen negativen Effekt auf die WNV-Replikation in Mosquitozellen .....	79
3.3.6. Die Depletion der Squid-Proteine hat auch bei höheren Temperaturen keinen negativen Einfluss auf die WNV-Replikation .....	81
3.4. CRISPR/Cas9-vermittelter Gen- <i>knockout</i> von Squid-p30 und Squid-p32 .....	84
3.4.1. Erzeugung und Screening der mittels CRISPR/Cas9 generierten Gen- <i>knockout</i> -Klone ....	84
3.4.2. Der CRISPR/Cas9-vermittelte Gen- <i>knockout</i> der Squid-Proteine induziert in C6/36-Zellen eine Gegenregulation .....	87
3.4.3. In C6/36-Zellen kodieren zwei Gene für sowohl Squid-p30, als auch Squid-p32 .....	89
<b>IV. Diskussion .....</b>	<b>92</b>
4.1. Evolutionäre Entwicklung der Wirtsfaktorfunktion von AUF1p45 .....	92
4.1.1. Unterschiedliche Aktivitäten von Squid-p30/-p32 und AUF1p45.....	93
4.1.2. Mögliche Ursachen für die nicht-konservierte virale Wirtsfaktorfunktion von AUF1p45	94
4.2. Der Einfluss von Proteinmotiven auf die Funktion der Squid-Proteine .....	97
4.2.1. Unterschiede der Aktivitäten von Squid-p30 und -p32 .....	99
4.2.2. Der Einfluss der aromatischen Aminosäuren des YGG-Motivs auf die RNA-Bindung und RNA-RNA-Interaktion.....	100
4.2.3. Möglicher Einfluss der Sekundärstruktur auf Aktivitätsunterschiede zwischen den Squid-Proteinen .....	103
4.3. Mögliche Genduplikation des Squid-Gens in <i>A. albopictus</i> .....	105
4.3.1. Möglicherweise existiert ein größeres Inventar von Squid-Isoformen.....	107
4.4. AUF1-homologe Proteine in Vögeln .....	108
4.5. Ausblick .....	111
<b>V. Zusammenfassung .....</b>	<b>112</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>115</b>
<b>VII. Anhang.....</b>	<b>124</b>

## Abkürzungsverzeichnis:

A	Adenin
Aag2	<i>Aedes aegypti</i> Zelllinie
<i>A. albopictus</i>	lat. <i>Aedes albopictus</i>
<i>ad</i>	lat. „zu“
<i>A. aegypti</i>	lat. <i>Aedes aegypti</i>
<i>A. gambiae</i>	lat. <i>Anopheles gambiae</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AUF1	engl. <i>AU-rich element binding protein 1</i>
AUG	Translationsstartcodon
BHQ	engl. <i>black-hole-Quencher</i>
bp	Basenpaar
BSA	Serumalbumin
C6/36	<i>Aedes albopictus</i> Zelllinie
C	engl. <i>core protein</i>
C	Cytosin
CD	Circulardichroismus
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
CHIKV	Chikungunya-Virus
CRISPR/Cas9	engl. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats 9</i>
CS	engl. <i>conserved sequence</i>
CTP	Cytidintriphosphat
C-terminal	Carboxy-terminal
<i>D. melanogaster</i>	lat. <i>Drosophila melanogaster</i>
DAR	engl. <i>downstream of AUG region</i>
DENV	Dengue-Virus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	engl. <i>envelope protein</i>
<i>E. coli</i>	lat. <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDV	Hepatitis-D-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hnRNP	engl. <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
HP-3'SL	engl. <i>hairpin 3'SL</i>
Huh7	engl. <i>human hepatoma</i>
IgG	Immunglobulin G
IP	Immupäzitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IRES	engl. <i>internal ribosome entry site</i>
JEV	Japanisches Enzephalitis-Virus
Kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KO	engl. <i>knockout</i>
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>

mRNA	engl. <i>messenger</i> RNA
miRNA	engl. <i>micro</i> RNA
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NS	Nichtstruktur
NP-40	Polyethylenglycol(40)-nonylphenoether
Nt	Nukleotid
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optische Dichte
ORF	engl. <i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRMT	engl. <i>protein arginine methyltransferase</i>
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptions-PCR
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
Rluc	Renilla Luziferase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
RNP	engl. <i>ribonucleoprotein motif</i>
rpm	engl. <i>rotations per minute</i>
RRM	engl. <i>RNA recognition motif</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
sfRNA	engl. <i>small flaviviral</i> RNA
sgRNA	subgenomische RNA
sgRNA	engl. <i>single guide</i> RNA
siRNA	engl. <i>short interfering</i> RNA
SL	engl. <i>stem-loop</i>
SLA	engl. <i>stem-loop</i> A
SLB	engl. <i>stem-loop</i> B
ss	einzelsträngig
SUMO	engl. <i>small ubiquitin-like modifier</i>
SV40	engl. <i>Simian-Virus 40</i>
T	Thymin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	Uracil
U	engl. <i>unit</i>
UAR	engl. <i>upstream of AUG region</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
WNV	West-Nil-Virus
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen
ZIKV	Zika-Virus

## Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

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

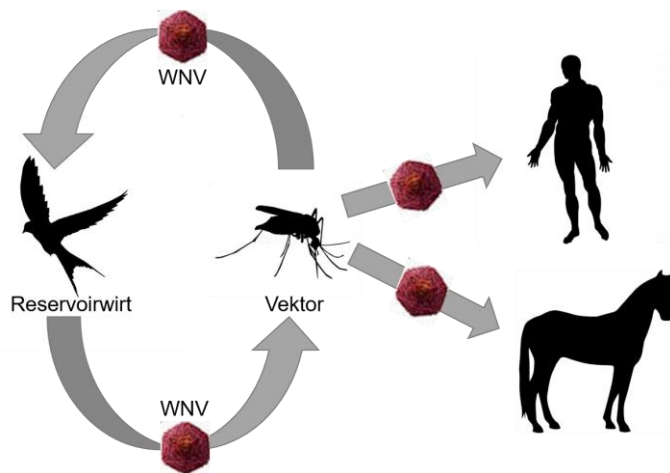
## I. Einleitung

### 1.1. Das West-Nil-Virus

Im September 2019 wurde zum ersten Mal eine in Deutschland durch Stechmücken übertragene West-Nil-Virus-Infektion eines Menschen nachgewiesen. Bereits 2018 und 2019 konnten insbesondere im Osten Deutschlands infizierte Vögel und Pferde identifiziert werden (Epidemiologisches Bulletin 40/2019, Robert-Koch-Institut). Die Verbreitung des West-Nil-Virus (WNV), welches seinen Ursprung in Uganda hat, nahm in Folge von Globalisierung, Klimaerwärmung und verstärktem Tourismus über Jahrzehnte immer weiter zu (Kilpatrick 2011). Die Übertragung des West-Nil-Virus erfolgt zwischen Stechmückenarten der Gattung *Culex*, welche als Vektoren fungieren, und verschiedenen Vogelarten, welche die höchsten Virustiter erreichen, und somit der Vermehrung des Virus dienen. Menschen und andere Säugetiere wie Pferde oder Hunde sind nur Fehlwirte und können das Virus aufgrund der geringen Virustiter nicht weiterverbreiten (Abb. 1, Brinton 2002, Kramer *et al.* 2008). Da die Verbreitung dieser Arboviren stark von der Ökologie des jeweiligen Vektors beeinflusst ist, ist das ubiquitäre Vorkommen von *Culex*-Arten problematisch (Farajollahi *et al.* 2011). Verschiedene dieser Stechmückenarten sind ebenso in Deutschland heimisch und potentiell übertragungsfähig. Insbesondere die Arten *Culex pipiens* (Biotyp *Culex pipiens pipiens*) und *Culex torrentium* konnten in Versuchen von Leggewie *et al.* (2016) effizient mit West-Nil-Virus infiziert werden, zeigten hohe Verbreitungsraten und stellen somit potentielle West-Nil-Virus-Vektoren dar. In einem Review von Vogels *et al.* (2017) wird ebenfalls die gemeine Stechmücke (*Culex pipiens*) als Hauptvektor für WNV in Europa angesehen. Eine weitere Stechmückenart, welche eine starke und zunehmende weltweite Verbreitung aufweist, ist die Asiatische Tigermücke (*Aedes albopictus*) (Kilpatrick 2011). *A. albopictus* ist die erfolgreichste invasive Stechmückenart in Europa und überträgt das Dengue-Virus (DENV), Zika-Virus (ZIKV), und Chikungunya-Virus (CHIKV), kann aber auch mit WNV infiziert werden (Kraemer *et al.* 2019, Akiner *et al.* 2019). Es wird zwar vermutet, dass aufgrund der bevorzugten Ernährung von menschlichen Blutmahlzeiten eine Verbreitung des WNV durch die Asiatische Tigermücke begrenzt ist (Vogels *et al.* 2017, Ponlawat und Harrington 2005, Munoz *et al.* 2011), jedoch wurde ebenfalls beschrieben, dass die Vektorkompetenz von *A. albopictus* sehr dynamisch ist (Chen *et al.* 2015). So war die Asiatische Tigermücke beispielsweise ursprünglich auch kein Hauptvektor des CHIKV.

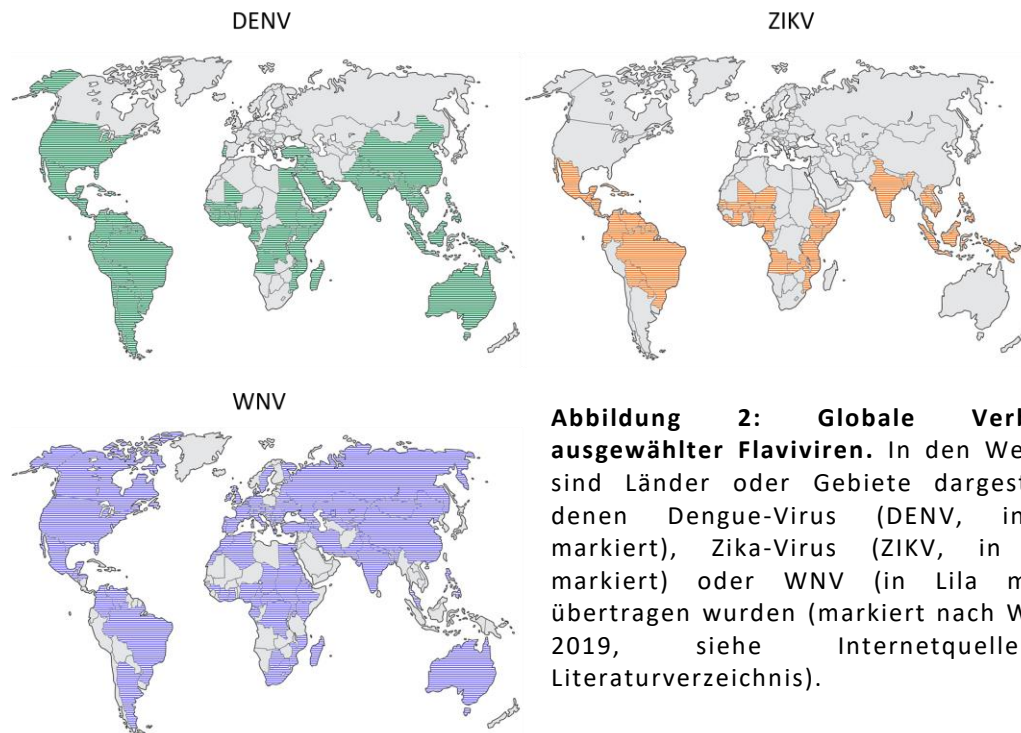


Eine Mutation des CHIKV verbesserte die Transmissioneffizienz der Asiatischen Tigermücke deutlich und führte so zu CHIKV-Ausbrüchen auf allen Inseln im indischen Ozean und den umgebenden Ländern (2005–2007), Zentral-Afrika (2006–2007) und Italien (2007) (Paupy *et al.* 2009).



**Abbildung 1: Übertragungszyklus des West-Nil-Virus.** Das Virus zirkuliert in einem Hauptkreislauf zwischen verschiedenen Stechmücken- und Vogelarten. Dabei fungieren die Mosquitos als Vektoren in der Verbreitung des Virus und Vögel aufgrund der hohen Virustiter als Virus-Reservoir. Menschen und Pferde sind nur Fehlwirte und können das Virus nicht weiterverbreiten (Abb. aus Meyer 2016).

Das West-Nil-Virus ist weitverbreitet in Afrika, Europa, Australien und Asien (Kramer *et al.* 2007). Seit 1999 hat sich das Virus auch in der westlichen Hemisphäre stark ausgebreitet, unter anderem in den USA, Mexiko, Kanada, der Karibik und Teilen von Zentral- und Südamerika (Abb. 2, Kramer *et al.* 2007). In den USA wurde 1999 in New York eine Epidemie ausgelöst, welche durch schwere neurologische Krankheitsverläufe, insbesondere bei älteren Menschen, gekennzeichnet war (Nash *et al.* 2001). In Gebieten wo das Virus endemisch ist, treten aufgrund der höheren Immunität der Bevölkerung eher mildere Fiebererkrankungen auf. Symptome einer West-Nil-Virus-Infektion reichen von einem asymptomatischen Verlauf über unspezifische Beschwerden wie Kopfschmerzen, Fieber und Muskelschwäche bis hin zu schweren neuroinvasiven Krankheiten wie Enzephalitis oder Meningoenzephalitis. Schwere neurologische Erkrankungen sind sehr selten, häufiger treten keine Symptome oder Fieber auf (Brinton 2002).



**Abbildung 2: Globale Verbreitung ausgewählter Flaviviren.** In den Weltkarten sind Länder oder Gebiete dargestellt, in denen Dengue-Virus (DENV, in Grün markiert), Zika-Virus (ZIKV, in Orange markiert) oder WNV (in Lila markiert) übertragen wurden (markiert nach Wu *et al.* 2019, siehe Internetquelle im Literaturverzeichnis).

## 1.2. Die Virus-Familie *Flaviviridae*

Das West-Nil-Virus ist der weltweit am stärksten verbreitete Vertreter der Gattung *Flavivirus* innerhalb der Familie der *Flaviviridae* (Abb. 2). Diese Familie umfasst behüllte (+)-Strang-RNA-Viren und wird momentan in vier Gattungen unterteilt, welche mehr als 60 Spezies beinhalten. Zu diesen Gattungen zählen: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* und *Pegivirus* (Simmonds *et al.* 2017). Die Flaviviren beinhalten einige humanpathologisch relevante Vertreter wie das Dengue-Virus (DENV), Zika-Virus (ZIKV), Gelbfieberevirus (YFV) und das Japanische Enzephalitis-Virus (JEV). Die Gattung wird des Weiteren nach Art des Vektors in durch Stechmücken übertragene Viren, durch Zecken übertragene Viren, Übertragung von Viren durch einen unbekanntem Vektor und nicht-klassifizierte Flaviviren unterteilt. Der Großteil der Flaviviren wird durch Stechmücken übertragen (Lindenbach *et al.* 2007). Ein bekannter Vertreter einer durch Zecken hervorgerufenen Infektion ist das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME-Virus).

Auf Basis von Unterschieden in der Aminosäure-Sequenz der *envelope*-Proteine lässt sich das West-Nil-Virus zusätzlich in Abstammungslinie I und II unterteilen (Berthet *et al.* 1997). Dabei können WNV-Isolate, welche schwere humane Krankheiten verursachen, der Abstammungslinie I zugeordnet werden (Lanciotti *et al.* 2002). Pestiviren dagegen sind tierpathogen und infizieren Schweine und Wiederkäuer wie Schafe, Rinder oder Ziegen und haben daher eine eher ökonomische Bedeutung.

Wichtige Vertreter sind das Bovine Virusdiarrhoe-Virus (BVDV) und das Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) (Tautz *et al.* 2015). Zur Gattung der Hepaciviren zählt als bekanntester Vertreter das humanpathogene Hepatitis-C-Virus (HCV), welches Hepatitis C, eine häufig chronisch verlaufende Lebererkrankung, verursachen kann. Es kann zu schweren Leberschädigungen wie Leberzirrhose oder Leberzellkarzinomen führen (Modi und Liang 2008). Weitere Viren dieser Gattung sind weniger gut charakterisiert und infizieren Pferde, Nagetiere, Fledermäuse, Kühe und Primaten. Pegiviren sind mit einer Klassifizierung von 2011 die jüngste Gattung der *Flaviviridae* (Stapleton *et al.* 2011) und verursachen persistente Infektionen in einer großen Bandbreite von Säugetieren, welche bisher allerdings nicht klar mit Krankheiten assoziiert sind.

### 1.3. Aufbau des WNV-Genoms

Das West-Nil-Virus-Genom besteht aus einer ca. 11000 Nukleotide (Nt) langen einzelsträngigen RNA mit positiver Polarität. Die RNA besitzt also die gleiche Polarität wie eine mRNA und kann so direkt translatiert werden. Der offene Leserahmen (ORF) wird von einer 5' nicht-translatierten Region (UTR), welche eine Typ I cap-Struktur ( $m^7GpppAmp$ ) besitzt, und einer 3' nicht-translatierten Region (UTR) ohne Poly(A)-Schwanz flankiert (Wengler und Wengler 1981). Die 5'UTR umfasst eine Länge von ca. 100 Nt und ist deutlich kürzer als die 3'UTR, welche ca. 650 Nt lang ist. Der offene Leserahmen kodiert für ein Polyprotein, welches co- und posttranslational von der viralen Serinprotease (NS2B-NS3) und verschiedenen zellulären Proteasen in drei Strukturproteine und sieben Nichtstrukturproteine prozessiert wird (Abb. 3). Die Strukturproteine *core* (C), *premembrane* (prM) und *envelope* (E) sind an der Bildung von neuen Viruspartikeln beteiligt. So ist die Hülle des Virions aus den Transmembranproteinen *premembrane* und *envelope*, eingebettet in einer Lipid-Doppelschicht, geformt. Das Nukleokapsid wird von mehreren Kopien des *core*-Proteins und der genomischen RNA gebildet (Mukhopadhyay *et al.* 2003). Die Nichtstrukturproteine NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B und NS5 sind wichtig für die virale Replikation, den Zusammenbau von Virionen und die Unterdrückung der Immunantwort des Wirts (Lindenbach *et al.* 2007, Kramer *et al.* 2007). Insbesondere die Funktion von NS5, welche als RNA-abhängige RNA-Polymerase die (-)-Strang-RNA-Synthese ausgehend von der genomischen RNA initiiert, ist hier hervorzuheben (Lindenbach *et al.* 2007).

## 1.4. Der Lebenszyklus des WNV

Die Virionen heften sich an eine Wirtszelle an und dringen über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle ein. Der niedrige pH-Wert der endosomalen Vesikel verursacht eine Konformationsänderung des Virions, welche eine Fusion der viralen Membran mit der Wirtszellmembran und schlussendlich die Partikelfreisetzung induziert. Daraufhin wird das einzelsträngige RNA-Genom im Zytoplasma von der zellulären Translationsmaschinerie zu einem Polyprotein translatiert (Lindenbach *et al.* 2007). Die Replikation findet nachfolgend in sogenannten Replikationskomplexen statt, welche aus viraler RNA, viralen Proteinen und zellulären Wirtsfaktoren bestehen. Diese Replikationskomplexe werden in virus-induzierten, zytoplasmatischen Membranstrukturen ausgebildet (Mackenzie *et al.* 1999, Mackenzie 2005). Im Zusammenspiel mit weiteren viralen und zellulären Proteinen initiiert die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5 die (-)-Strang-RNA-Synthese. Im nächsten Schritt wiederum dient die (-)-Strang-RNA als *template* für die Generierung weiterer genomischer (+)-Strang-RNA (Brinton 2002). Das Virus wird im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums assembliert. Die nicht-infektiösen, unreifen Viruspartikel werden durch das Trans-Golgi-Netzwerk transportiert. Die Erzeugung reifer Viruspartikel wird mit Spaltung des Vorläufer-Proteins *premembrane* zu *membrane* durch die Wirtsprotease Furin bewirkt (Stadler *et al.* 1997, Elshuber *et al.* 2003). Die infektiösen Viruspartikel werden über Exozytose aus der Zelle freigesetzt (Mukhopadhyay *et al.* 2005).

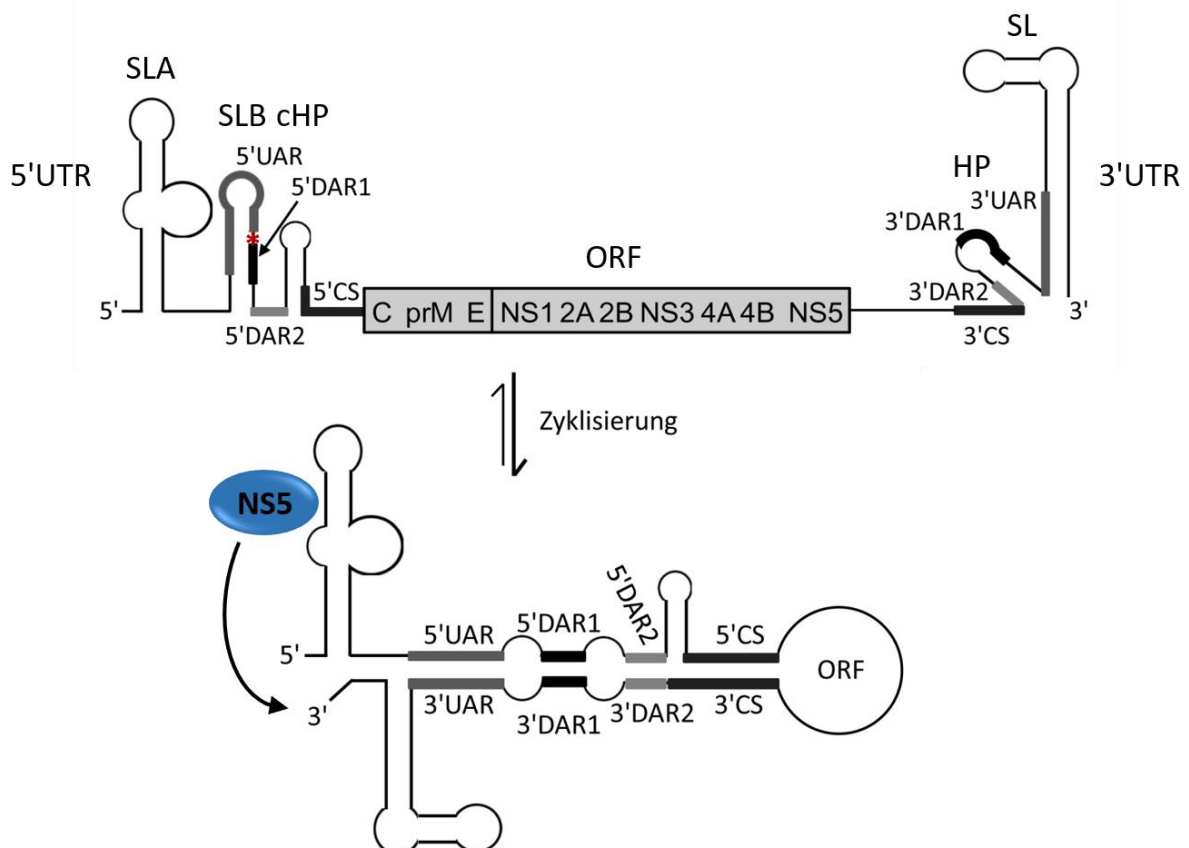
## 1.5. Die Replikation des WNV

Das flavivirale Genom muss innerhalb eines Lebenszyklus verschiedene Konformationen annehmen. Ein Gleichgewicht zwischen einer linearen und einer zirkulären Form ist dabei erforderlich, um verschiedene Prozesse wie die (-)- und (+)-Strang-RNA-Synthese, die Enkapsidierung, sowie den Wechsel von Translation zu Replikation zu regulieren (Lindenbach *et al.* 2007, Villordo *et al.* 2010, Fernandez-Sanles *et al.* 2017). Die terminalen Bereiche der 5'- und 3'UTR der flaviviralen RNA bilden hoch konservierte Sekundärstrukturelemente, welche eine essentielle Funktion in der Translation und Replikation der viralen RNA haben (Lindenbach *et al.* 2007, Mazeaud *et al.* 2018). Diese Sekundärstrukturen wurden zumeist mit thermodynamischen Modellen vorhergesagt (Rice *et al.* 1985, Brinton *et al.* 1986, Brinton und Dispoto 1988), konnten aber unter anderem von Dong *et al.* (2008) mittels Experimenten mit RNase-Spaltung ebenso experimentell nachgewiesen werden.

Innerhalb dieser *stem loop*-Strukturen befinden sich Sequenzelemente, deren Interaktion für die Umstrukturierung des flaviviralen Genoms notwendig sind. Diese sogenannten Zyklisierungselemente sind komplementär zueinander und können oftmals nur miteinander hybridisieren, wenn die Sekundärstrukturen zuvor destabilisiert wurden.

### 1.5.1. Essentielle Zyklisierungselemente

In beiden UTRs befinden sich mehrere wichtige Zyklisierungselemente. Darunter die einzelsträngigen 5'- und 3'CS (*conserved sequence*), deren Komplementarität für die flavivirale Replikation essentiell ist (Hahn *et al.* 1987; Zhang *et al.* 2008). Ein weiteres wichtiges komplementäres Sequenzpaar ist die 5'- und 3'UAR (*upstream AUG region*), welche sich innerhalb des 5' *stem loop* B (SLB) bzw. des hoch konservierten 3' *stem loops* (SL) befinden (Abb. 3, Alvarez *et al.* 2005b). Erst die Umstrukturierung dieser Sekundärstrukturen ermöglicht die essentielle Interaktion der komplementären RNA-Sequenzen. Dabei wird nur der untere Teil des 3'SL umstrukturiert, der obere Teil verbleibt in seiner Konformation (Dong *et al.* 2008, Filomatori *et al.* 2011, Davis *et al.* 2013). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei der Basenpaarung beider Zyklisierungselementpaare die Komplementarität wichtiger ist als die RNA-Nukleotid-Sequenz *per se* (Khromykh *et al.* 2001, Alvarez *et al.* 2008).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Genomorganisation und Zyklisierungsreaktion der WNV-RNA.** Im oberen Teil der Grafik ist die lineare Konformation des WNV-Genoms abgebildet. Der offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) kodiert für 3 Strukturproteine, welche hier abgekürzt sind als C= *core*, prM= *premembrane*, E= *envelope* und 7 Nichtstrukturproteine, welche nummeriert sind als NS1-NS5. In den nicht-translatierten Regionen (UTR) sind die konservierten Sekundärstrukturen schematisch dargestellt. In der 5'UTR befindet sich der SLA (*stem loop A*) sowie die beiden kleineren Strukturen SLB (*stem loop B*) und cHP (*coding region hairpin element*). In der 3'UTR ist der stark konservierte 3'SL (3' *stem loop*) zusammen mit dem HP-3'SL (*hairpin-3'SL*) lokalisiert. Die für die Replikation essentiellen Zyklisierungselemente sind in verschiedenen Graustufen innerhalb des Genoms markiert. Dies beinhaltet UAR (*upstream AUG region*), DAR1 und DAR2 (*downstream AUG region*) und CS (*conserved sequence*). Das Startcodon AUG ist mit einem roten Stern innerhalb des 5'SLB markiert. Die Zyklisierung des viralen Genoms wird durch die Interaktion der komplementären Zyklisierungselemente vermittelt. Diese können zum Teil erst miteinander hybridisieren, wenn zuvor die *stem loop*-Strukturen umstrukturiert werden. Im unteren Teil der Grafik ist die zirkuläre Form des WNV-Genoms dargestellt. Laut einem Modell von Filomatori *et al.* (2006) bindet die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5 den 5'SLA und wird infolge der Genomzyklisierung in räumliche Nähe des 3'-Endes gebracht und kann dort die (-)-Strang-RNA-Synthese initiieren (modifiziert nach Friedrich *et al.* 2014).

### 1.5.2. Der essentielle 3'SL und weitere *stem loop*-Strukturen der 3'UTR

Die größte strukturelle Gemeinsamkeit innerhalb des Genoms verschiedener Flaviviren bildet der zuvor erwähnte 3'SL (Lindenbach *et al.* 2007). Insbesondere die Größe und die Form dieser *stem loop*-Struktur ist zwischen verschiedenen Vertretern der Flaviviren wie WNV, YFV und JEV stark konserviert und implizierte schon früh eine wichtige Rolle in der viralen Replikation (Brinton *et al.* 1986). Innerhalb des 3'SL konnten mit Hilfe von Mutationsanalysen wichtige virus- und wirtsspezifische funktionelle Regionen identifiziert werden. So kann der 3'SL mit verschiedenen Proteinen mit funktioneller Bedeutung interagieren, unter anderem mit den viralen Proteinen NS3 und NS5 (Chen *et al.* 1997, Cui *et al.* 1998). Mehrere Struktur-Funktionsanalysen des 3'SL verschiedener Flaviviren konnten die essentielle Bedeutung dieser Sekundärstruktur für die virale Replikation nachweisen (Men *et al.* 1996, Zeng *et al.* 1998, Yu und Markoff 2005, Tilgner *et al.* 2005). Davis *et al.* (2013) vermuteten, dass ein metastabiles Element innerhalb des unteren Teils des 3'SL am Strukturwechsel beteiligt ist. Dieses metastabile Element besteht aus zwei konservierten Basenpaaren, flankiert von zwei Basenfehlpaarungen, welche zwei *bulges* formen und ist vermutlich wichtig für die benötigte Flexibilität des 3'SL, um das 3'-Ende infolge der Zyklisierungsreaktion umzugestalten (Davis *et al.* 2013). Der RNA-Zyklisierungsprozess ist eine Voraussetzung für die Initiation der viralen Replikation (Alvarez *et al.* 2005a) und reguliert vermutlich ebenso die virale Translation (Sanford *et al.* 2019).

So konnten diese Autoren zeigen, dass die zirkuläre RNA-Form des ZIKV und DENV die *de novo* Initiation der viralen Translation inhibiert.

### 1.5.3. Essentielle *stem loop*-Strukturen der 5'UTR

Auch in der 5'UTR befinden sich wichtige, konservierte *stem loop*-Strukturen, unter anderem der sogenannte 5'SLA. Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Deletionen innerhalb des 5'SLA letal für die flavivirale Replikation sind (Cahour *et al.* 1995). Diese Sekundärstruktur wird spezifisch von der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5 gebunden (Dong *et al.* 2008) und fungiert laut einem Replikationsmodell von Filomatori *et al.* (2006) vermutlich als Promoter in der Initiation der (-)-Strang-RNA-Synthese. In diesem Modell erkennt NS5 spezifisch den 5'SLA der viralen RNA, woraufhin über die bereits erläuterten komplementären RNA-RNA-Interaktionen der gebildete 5'SLA-NS5-Komplex und das 3'-Ende in räumliche Nähe gebracht werden, um die RNA-Synthese zu ermöglichen (Abb. 3, Filomatori *et al.* 2006).

Eine weitere wichtige kleinere Sekundärstruktur in der 5'UTR ist der *stem loop* SLB. Innerhalb des SLB befindet sich das Startcodon (AUG) für die Initiation der Translation des Polyproteins, die bereits erwähnte essentielle Sequenz 5'UAR und eine weitere Zyklisierungssequenz 5'DAR1. Die komplementären DAR-Sequenzen (*downstream AUG region*) sind ebenfalls wichtige Zyklisierungssequenzpaare. Im WNV-Genom existieren jeweils zwei dieser Sequenzpaarungen in der 5'- und 3'UTR. Das zu 5'DAR1 komplementäre Basenpaar 3'DAR1 befindet sich innerhalb des HP-3'SL. 3'DAR2 ist im unteren Teil des HP-3'SL angeordnet, die einzelsträngige 5'DAR2-Sequenz ist zwischen dem 5'SLB und dem cHP *stem loop* (*capsid-coding region hairpin element*) lokalisiert (Abb. 3, Friebe und Harris 2010, Friebe *et al.* 2011, Mazeaud *et al.* 2018).

## 1.6. Am Lebenszyklus von Flaviviren beteiligte Wirtsfaktoren

Angesichts der geringen Genomgröße und der damit einhergehenden geringen Anzahl Gene, die Viren tragen können, sind diese in verschiedenen Phasen ihres viralen Lebenszyklus abhängig von einer Vielzahl von Wirtsfaktoren. Diese Prozesse umfassen unter anderen die Anheftung des Virions an die Wirtszelle, den Eintritt des Virus in die Zelle, die virale Translation, die virale Replikation und den Zusammenbau sowie die Freisetzung der Viruspartikel (Ahlquist *et al.* 2003). Insbesondere Wirtsfaktoren, welche im Verlauf der flaviviralen Replikation beteiligt sind, sollen im Folgenden näher betrachtet werden. Zu den bisher identifizierten Wirtsfaktoren des WNV gehört unter anderem der Translationselongationsfaktor eEF1A (Blackwell und Brinton 1997).

Dieser bindet an drei verschiedenen Bindestellen innerhalb des 3'SL, welche alle funktionell relevant sind. Es wird vermutet, dass eEF1A an der Initiation der (-)-Strang-RNA-Synthese über Interaktion mit der viralen RNA sowie Interaktion mit Proteinen des Replikationskomplexes, darunter NS3 und NS5, beteiligt ist (Davis *et al.* 2007, Li *et al.* 2013). Weitere Wirtsfaktoren des WNV sind die *stress granules*-assoziierten Proteine TIA-1 (*T-cell restricted intracellular antigen-1*) und TIAR (*TIA-1 related*), welche spezifisch an den 3'SL der (-)-Strang-RNA binden (Li *et al.* 2002). Es wird vermutet, dass durch Interaktion der Proteine mit viraler Doppelstrang-RNA und Proteinen des Replikationskomplexes die genomische RNA-Synthese erleichtert wird. Zusätzlich soll TIAR die Generierung von *stress granules* herunterregulieren, um so das Abschalten der zellulären Translation zu verhindern (Emara und Brinton 2007). Die Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase Cyclophilin A konnte von Qing *et al.* (2009) als Wirtsfaktor des WNV identifiziert werden. Das Protein unterstützt die virale Replikation und könnte Teil des Replikationskomplexes sein. Dabei ist die Isomerase-Aktivität des Proteins essentiell für die Wirtsfaktorfunktion (Qing *et al.* 2009). Weitere flavivirale Wirtsfaktoren sind das La Protein, welches innerhalb der 3'- und 5'UTR des JEV bindet und so die Zyklisierungsreaktion der viralen RNA unterstützen könnte (Vashist *et al.* 2009, Vashist *et al.* 2011), sowie das *poly(A) binding protein* (PABP), welches die 3'UTR des DENV bindet und trotz Fehlens eines Poly(A)-Schwanzes der RNA an der viralen Translation beteiligt ist (Polacek *et al.* 2009). Das *cold shock domain-containing protein E1* (CSDE1) ist vermutlich an der viralen Replikation oder Translation von DENV beteiligt (Sessions *et al.* 2009, Phillips *et al.* 2016). Interessanterweise wirken PABP C und CSDE1 zusammen an der Regulation der Translation oder Stabilität von zellulären mRNAs (Chang *et al.* 2004). So ist vorstellbar, dass diese beiden Proteine auch gemeinsam an der viralen Replikation oder Translation von DENV beteiligt sind (Phillips *et al.* 2016). Für das *polypyrimidine tract-binding protein* (PTB) konnte die Translokation vom Nukleus zum Zytoplasma während einer DENV-Infektion nachgewiesen werden. Des Weiteren bindet das Protein in der 3'SL Region des DENV und die Deletion von *ptb* führte zu einer verminderten DENV-Replikation (Agis-Juarez *et al.* 2009, Anwar *et al.* 2009). Bhullar *et al.* (2014) konnten für PTB aber ebenso eine antivirale Funktion während der JEV-Infektion identifizieren. Dabei bindet das Protein das virale (-)-Strang-RNA-Intermediat am 3'-Ende, konkurriert mit der Bindung von NS5 und hemmt so die RNA-Synthese (Bhullar *et al.* 2014). Das neurale RNA-Bindeprotein Musashi-1 konnte von Chavali *et al.* (2017) als Wirtsfaktor des ZIKV identifiziert werden. Das Protein interagiert mit der 3'UTR des ZIKV-Genoms und ermöglicht dessen virale Replikation. Des Weiteren wird vermutet, dass eine erhöhte Musashi-1-Synthese in neuronalen Vorläuferzellen ZIKV-induzierte Schäden in fötalen Gehirnen begünstigt.



Ein weiterer flaviviraler Wirtsfaktor ist das *heterogeneous ribonucleoprotein C1/C2* (hnRNP C1/C2), dessen Depletion die virale Replikation des DENV sowie die virale Protein-Synthese und darauffolgend auch die Produktion von infektiösem DENV in humanen Zellen beeinträchtigt (Dechtawewat *et al.* 2015, Phillips *et al.* 2016).

Bei den meisten der hier aufgezählten Wirtsfaktoren ist der molekulare Mechanismus, über welchen die virale Replikation oder Translation unterstützt wird, noch nicht bekannt. Im Gegensatz dazu wurde die Wirtsfaktorfunktion des humanen RNA-Bindeproteins *AU-rich element RNA-binding protein 1* (AUF1), auch *heterogeneous ribonucleoprotein D* (hnRNPD) genannt, in den letzten Jahren intensiv charakterisiert und analysiert. Die Isoform AUF1p45 konnte von Friedrich *et al.* (2014) und (2018) als wichtiger Wirtsfaktor des WNV, DENV und ZIKV identifiziert werden.

## 1.7. AUF1 - eine multifunktionale Proteinfamilie

Die AUF1-Proteine binden *AU-rich elements* (AREs) in der 3'UTR verschiedener mRNAs mit hoher Affinität. Dabei sind die Proteine generell mit dem Abbau von Ziel-mRNAs verbunden, können aber auch einen stabilisierenden Effekt auf bestimmte RNAs haben sowie die Translation von anderen mRNAs regulieren (Gratacos und Brewer 2010, Yoon *et al.* 2014). In PAR-CLIP-Analysen (*photoactivatable ribonucleoside-enhanced-cross-linking and immunoprecipitation*) konnte ebenso eine starke Präferenz der AUF1-Proteine für die Bindung von U-/GU-reichen Sequenzen in mRNAs und nicht kodierenden RNAs identifiziert werden (Yoon *et al.* 2014). Die zellulären Funktionen der AUF1-Proteine sind sehr vielfältig und beinhalten unter anderem eine Beteiligung im Zellwachstum, in der Zellseneszenz, in der Immun- und Stressantwort und beim Spleißen (Gratacos und Brewer 2010, Pont *et al.* 2012, White *et al.* 2013, Gueroussov *et al.* 2017). Kürzlich konnten weitere Funktionen für die Proteine identifiziert werden. So soll AUF1 zusammen mit dem Argonautenprotein 2 (AGO2) den Abbau von bestimmten mRNAs koregulieren (Wu *et al.* 2013). AGO2 ist eine katalytische Untereinheit des sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC) und bindet unter anderem microRNAs (miRNA). Dieser Komplex aus miRNA und AGO2 leitet den RISC zu einer Ziel mRNA, welche daraufhin abgebaut wird (Bartel 2004). Yoon *et al.* (2015) konnten spezifisch für die let-7b miRNA zeigen, dass AUF1 den Einbau dieser miRNA in den AGO2-Komplex verstärkt und so den AGO2-let-7b-vermittelten mRNA-Abbau unterstützt.

Von AUF1 existieren insgesamt 4 Isoformen – p37, p40, p42 und p45 –, welche durch alternatives Spleißen der Exons 2 und 7 des prä-mRNA-Transkripts generiert werden (Wagner *et al.* 1998). So besitzt die größte Isoform AUF1p45 beide Exon-kodierte Regionen, AUF1p37 als kleinste Isoform fehlen diese.

AUF1p40 weist die Exon 2-kodierte Region und AUFp42 die Exon 7-kodierte Region auf. Alle Isoformen besitzen zwei nicht identische *RNA recognition motifs* (RRM), welche nebeneinander angeordnet sind und eine Arginin-Glycin-reiche Region (RGG/RG-Motiv) innerhalb der C-terminalen Region (Abb. 4). Die Isoformen AUF1p42 und AUF1p45 haben zusätzlich eine Tyrosin-Glycin-reiche Region (YGG-Motiv), kodiert von Exon 7. Die AUF1-Proteine können im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert sein, wobei AUF1p45 und AUF1p42 eher im Zellkern angereichert sind und AUF1p37 und AUF1p40 gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt sind (Arao *et al.* 2000, Wilson *et al.* 2003b, White *et al.* 2017). Die Isoformen zeigen außerdem Unterschiede in den RNA-Bindungsaffinitäten, bei der Ziel-RNA-Präferenz, bei der Oligomerisierung, bei posttranslationalen Modifikationen und im Einfluss auf lokale RNA-Strukturen (White *et al.* 2017).

So konnte nur für die Isoform AUF1p45 ein stimulatorischer Effekt auf die WNV (-)-Strang-RNA-Synthese in einem *in vitro* RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Assay (RdRp) nachgewiesen werden (Friedrich *et al.* 2014).

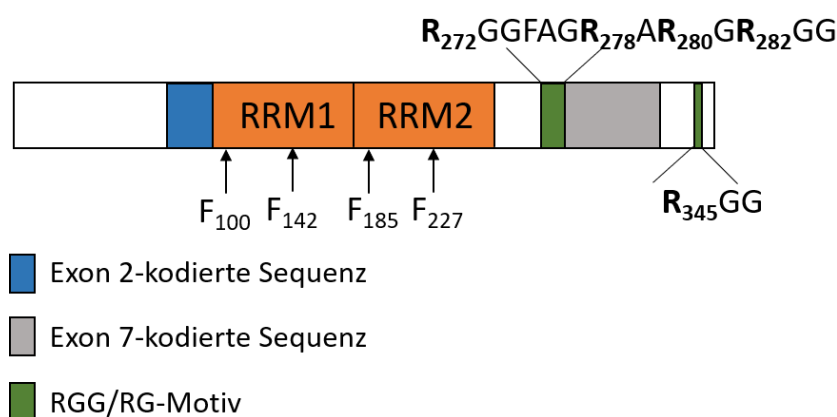
## 1.8. AUF1p45 als flaviviraler Wirtsfaktor

AUF1p45 besitzt zwei RNA-Umstrukturierungsaktivitäten, welche die flavivirale Genomzyklisierung und somit die Replikation unterstützen. Im ersten Schritt wird mit einer RNA-Chaperon-Aktivität der 3'SL sowie der 5'SLB destabilisiert und so die Interaktion der nun einzelsträngigen komplementären UAR-Sequenzen ermöglicht (Friedrich *et al.* 2014, Friedrich *et al.* 2018). Im Gegensatz dazu destabilisiert AUF1p45 nicht die Struktur des 5'SLA (Friedrich *et al.* 2018), welcher vermutlich als Promoter der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5 fungiert (Filomatori *et al.* 2006). Dies führt zu der Vermutung, dass AUF1p45 gezielt flavivirale Motive, welche im Zyklisierungsprozess involviert sind, umstrukturiert. Im Allgemeinen sind RNA-Chaperone Proteine, welche die Fehlfaltung von RNAs verhindern oder die Sekundärstrukturen von RNAs, welche sich in einer nicht-funktionalen Konformation befinden, wieder auflösen. Der Prozess findet dabei ohne ATP-Verbrauch statt und ist nur transient (Rajkowitsch *et al.* 2007).

Der zweite Schritt beinhaltet eine *RNA-annealing*-Aktivität, welche die Hybridisierung der komplementären Zyklisierungssequenzen beschleunigt (Friedrich *et al.* 2016). Proteine mit einer *RNA-annealing*-Aktivität beschleunigen die Hybridisierung von komplementären RNA-Sequenzen unter anderem mittels eines Prozesses namens *molecular crowding*. Dabei wird die lokale RNA-Konzentration erhöht und somit auch die Wahrscheinlichkeit des *RNA-annealing* (Rajkowitsch *et al.* 2007). Basierend auf den zuvor genannten Ergebnissen stellten Friedrich *et al.* (2018) ein Modell für die Wirtsfaktorfunktion von AUF1p45 auf.

So soll ein Zusammenspiel aus AUF1p45 und der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5 die Umstrukturierung des flaviviralen Genoms induzieren. Diese Umstrukturierung unterstützt wiederum die Zyklisierung und ermöglicht anschließend die Initiierung der (-)-Strang-RNA-Synthese. Dabei soll AUF1p45 den RNA-Strukturwechsel auslösen, welcher NS5 vom 5'SLA an das 3'-Ende der RNA dirigiert (Friedrich *et al.* 2018).

Die Funktionen der AUF1-Proteine können durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung oder Methylierung reguliert werden. So konnten Friedrich *et al.* (2016) mittels massenspektrometrischer Analyse zeigen, dass 5 Arginine im RGG/RG-Motiv von AUF1p45 in humanen Zellen dimethyliert vorliegen (Abb. 4). Die Methylierung führte zu einer starken Erhöhung der Affinität des Proteins zur WNV-RNA sowie zu einer Verstärkung der RNA-Chaperon-Aktivität. Die RNA-*annealing*-Aktivität war von der Modifikation nicht beeinflusst. Die Bedeutung des RGG/RG-Motivs und der RRM-Domänen wurde von Meyer *et al.* (2019) mit Hilfe einer umfangreichen Mutagenese-Studie analysiert. Dabei wurden die Arginine innerhalb des RGG/RG-Motivs und konservierte Phenylalanine innerhalb der RRM-Domänen, welche wichtig für die RNA-Bindung sein sollen (Katahira *et al.* 2001, Enokizono *et al.* 2005), zumeist gegen Alanine substituiert (Abb. 4). Die Studie konnte die essentielle Bedeutung der exponierten Phenylalanine der RRM-Domänen für die RNA-Bindung des Proteins bestätigen, da die Substitution der Phenylalanine zu einem dramatischen Verlust der RNA-Bindung führte. So tragen die RRM-Domänen hauptsächlich über die RNA-Bindung zu den RNA-Umstrukturierungsaktivitäten des Proteins bei. Das RGG/RG-Motiv wiederum ist ausschlaggebend an der RNA-Chaperon-Aktivität und RNA-*annealing*-Aktivität beteiligt (Meyer *et al.* 2019).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von AUF1p45.** Die RRM-Domänen und die Isoform-spezifischen Sequenzen, welche von Exon 2 und Exon 7 kodiert werden, sind hervorgehoben. Das RGG-Motiv in der C-terminalen Region ist markiert. Die hervorgehobenen Arginine der Positionen 272, 278, 280, 282 und 345 wurden mittels massenspektrometrischer Analyse als dimethyliert identifiziert (Friedrich *et al.* 2016). Die konservierten und exponierten Phenylalanine der RRM-Domänen sind ebenfalls dargestellt (modifiziert nach Friedrich *et al.* 2016).

## 1.9. AUF1-homologe Mosquito-Proteine

Da Flaviviren zwischen Vertebraten und Insekten zirkulieren, ist es naheliegend, dass Wirtsfaktoren zwischen den Spezies konserviert sind. Die bisher erwähnten Wirtsfaktoren wurden jedoch größtenteils im Säugetiersystem identifiziert und bislang ist wenig über Wirtsfaktoren im Vektor Stechmücke bekannt. Dabei könnte die Identifizierung von Wirtsfaktoren in dem viralen Vektor neue Einblicke in viruseigene Vermehrungs- und Anpassungsstrategien liefern.

So wurde eine BLAST-Suche für Sequenz-Übereinstimmungen von AUF1p45 zu *A. albopictus*-Aminosäuresequenzen durchgeführt, um Proteine zu identifizieren, welche möglicherweise eine ähnliche Funktion aufweisen. Hierbei konnten zwei Proteine mit homologen Sequenzen identifiziert werden, welche nach ihrem errechneten Molekulargewicht Squid-p32 und Squid-p30 genannt wurden. Diese zeigen eine hohe Homologie zu den RRM-Domänen (Abb. 5). Des Weiteren besitzen die Proteine ebenfalls ein RGG/RG-Motiv und ein YGG-Motiv. Abgesehen von einem Exon 5-kodierten-Bereich, welcher bei Squid-p30 aufgrund einer alternativen Selektion der 3'-Spleißstelle um 20 Aminosäuren kürzer ist als bei Squid-p32, sind die Mosquito-Proteine nahezu identisch. Diese zusätzlichen 20 Aminosäuren verlängern das YGG-Motiv (Abb. 5).

AUF1p45	MSEEQFGGDGAAAAATAAVGGSAGEQEGAMVAATQGAAAAAGSGAGTGGGTASGGTEGGS	60
Squid-p32	-----M	1
Squid-p30	-----M	1
	<b>RNP-2</b>	
AUF1p45	AESEGAKIDASKNEEDEGHSNSSPRHSEAATAQREEWK <b>MFVIGGL</b> SWDITTKDLKDYFSKF	120
Squid-p32	A-DQDQEMNGN-GQESQDQNGGDQNGAEGSNVRDDDRK <b>LFVGGGL</b> SWETS <span style="color: red;">DKELKEHFGQY</span>	59
Squid-p30	A-DQDQEMNGN-GQESQDQNGGDQNGAEGSNVRDDDRK <b>LFVGGGL</b> SWETS <span style="color: red;">DKELKEHFGQY</span>	59
	<b>RNP-1</b>	
AUF1p45	<u>GEVVDCTLKLDPITGRS<b>RGFGFVLF</b>KESESVDKVMQKEHKLNGKVIDPKRAKAMKTKEP</u>	180
Squid-p32	<u>GEIESINVKTDPNTRGS<b>RGFAFIVY</b>KSADSIDKVVAAGDHVINNKVDPKKAKA-----R</u>	114
Squid-p30	<u>GEIESINVKTDPNTRGS<b>RGFAFIVY</b>KSADSIDKVVAAGDHVINNKVDPKKAKA-----R</u>	114
	<b>RNP-2</b>	<b>RNP-1</b>
AUF1p45	<u>VKK<b>IFVGGGL</b>SPDTPEEKIREYFGGFGEVESIELPMDNKTNKR<b>RGFCFITF</b>KEEPPVKKIM</u>	240
Squid-p32	<u>HGK<b>IFVGGGL</b>TTEISDEEIKTFFGQFGNIVEVEMPFDKQKNQR<b>KGFCFITF</b>DSEQVVELL</u>	174
Squid-p30	<u>HGK<b>IFVGGGL</b>TTEISDEEIKTFFGQFGNIVEVEMPFDKQKNQR<b>KGFCFITF</b>DSEQVVELL</u>	174
	<b>RNP-2</b>	<b>RNP-1</b>
AUF1p45	<u>EKKYHNVGLSKCEIKVAMSKE-QYQQQQQWGS<b>RGGFAGRARG</b>----<b>RGGGPSQ</b>NWNQGY</u>	295
Squid-p32	<u>KTPKQTISGKEVDVKKATPKPDNMHMGGMGG<b>RGGM</b>RGPP<b>RGGM</b><b>RGGRGG</b>PG--GPKGYG</u>	232
Squid-p30	<u>KTPKQTISGKEVDVKKATPKPDNMHMGGMGG<b>RGGM</b>RGPP<b>RGGM</b><b>RGGRGG</b>PG--GPKGYG</u>	232
	<b>RNP-2</b>	<b>RNP-1</b>
AUF1p45	<u>NYWNQ<b>GGYGN</b>YGYNSQ<b>GGYGGY</b>GGYDYTGYN---Y-----<b>YGYGD</b>YSNQSGYGKVS<b>RRGG</b></u>	347
Squid-p32	<u>QGWGNQ---<b>GGYGGGGYGN</b>Q<b>GGYGY</b>GDY<b>YGDWAGWYNGYDYSHY</b>GAGGGGYQGGK<b>Q</b><b>RG</b></u>	289
Squid-p30	<u>QGWGNQ---<b>GGYGGGGYGN</b>Q<b>GGYGY</b>-----GAGGGGYQGGK<b>Q</b><b>RG</b></u>	269
	<b>RNP-2</b>	<b>RNP-1</b>
AUF1p45	H---QNSYKPY	355
Squid-p32	GGGNRQPRHTPY	301
Squid-p30	GGGNRQPRHTPY	281
	* : . **	

**Abbildung 5: AUF1-homologe Mosquito-Proteine Squid-p32 und Squid-p30 besitzen ebenso ein RGG/RG- und YGG-Motiv und zeigen Sequenz-Übereinstimmungen besonders in den RRM-Domänen.** Dargestellt ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von AUF1p45, Squid-p32 und Squid-p30. Die zwei *ribonucleoprotein motifs* RNP-1 und RNP-2 sind in Grün und in Orange hervorgehoben und die RRM-Domänen sind unterstrichen. Das RGG/RG-Motiv ist in Blau und das YGG-Motiv in Beige markiert. Die 20 Aminosäuren, die bei Squid-p30 aufgrund der alternativen Selektion der 3'Spleißstelle in Exon 5 fehlen, sind in Rot hervorgehoben. Das *alignment* wurde mit dem Programm Clustal Omega erstellt. Der Stern steht für identische Aminosäuren, der Doppelpunkt bedeutet hohe Ähnlichkeit der chemischen Eigenschaften der Aminosäuren und ein einzelner Punkt steht für geringe Ähnlichkeit der chemischen Eigenschaften der Aminosäuren.

Weitere Recherchen zeigten, dass es sich bei diesen Proteinen um Homologe der gut charakterisierten Squid-Proteine aus *Drosophila melanogaster* handelt. Squid-S, Squid-A und Squid-B werden durch alternatives Spleißen generiert und besitzen unterschiedliche Funktionen. Squid-S ist primär an der Lokalisierung von *gurken* (*grk*) mRNA beteiligt und Squid-A fungiert in der Akkumulation von Gurken-Protein. Im Zusammenspiel sind Squid-S und Squid-A essentiell für die Ausbildung der dorsoventralen Achse während der Oogenese, indem sie die Lokalisierung und Translation von *grk*-mRNA regulieren. Squid-B hingegen hat eine somatische Bedeutung (Norvell *et al.* 1999).

## 1.10. Zielstellung

Als Grundlage für diese Arbeit diente das Protein AUF1p45, welches von Friedrich *et al.* (2014) und (2018) als flaviviraler Wirtsfaktor im humanen System identifiziert werden konnte. Da aufgrund des Transmissionszyklus des WNV naheliegend ist, dass Wirtsfaktoren zwischen den involvierten Spezies konserviert sind, war es von Interesse auch mögliche Wirtsfaktoren in der Stechmücke nachzuweisen. So konnten mit Hilfe einer BLAST-Suche mit Sequenz-Übereinstimmungen zu AUF1p45 in *A. albopictus* zwei homologe Mosquito-Proteine Squid-p30 und Squid-p32 identifiziert werden. Ziel der Arbeit war es, den Einfluss dieser AUF1-homologen Mosquito-Proteine auf die WNV-Replikation zu untersuchen. Dafür sollte ein *knockdown* der Squid-RNA bzw. ein *knockout* des Squid-Gens in Mosquitozellen etabliert werden, um den Einfluss der Proteine auf die WNV-Replikation zu untersuchen. Des Weiteren sollten die Squid-Proteine in bereits etablierten *in vitro* Analysen auf ihre RNA-Bindung, RNA-Chaperon-Aktivität und RNA-*annealing*-Aktivität getestet werden und mit AUF1p45 verglichen werden. Ebenso sollten molekulare Determinanten für die RNA-Umstrukturierungsaktivitäten der Proteine identifiziert werden. Dabei stand das YGG-Motiv im Fokus. Dies sollte neue Erkenntnisse zu molekularen Mechanismen liefern wie RNA-Bindeproteine RNA-Strukturen umgestalten.

## II. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien, Puffer und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien, soweit nicht anders angegeben, wurden von den Firmen Carl Roth, Becton Dickinson, AppliChem, Merck, Thermo Fisher Scientific, Sigma-Aldrich, Serva, Th. Geyer und Diagonal genutzt. Die Herkunft kommerziell erhältlicher Enzyme ist an den jeweiligen Textstellen angegeben. Es wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet. Für alle Zentrifugationsschritte, soweit nicht anders angegeben, wurde die Tischzentrifuge von Hettich Mikro 200 (Winkelrotor für 24 x 1.5 / 2 ml) verwendet.

### 2.2. Bakterienstämme und Plasmide

Bakterienstämme und Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Bakterienstämme und Plasmide

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/Herkunft
<b><i>Escherichia coli</i></b>			
BL21-CodonPlus® (DE3)-RP		<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>dcm</i> <sup>+</sup> , Tet <sup>r</sup> , <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> , Hte [ <i>argU proL Cam</i> <sup>r</sup> ]	Thermo Fisher Scientific
DH5α		F <sup>-</sup> φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ( <i>lacZYA-argF</i> ), U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> λ <sup>-</sup>	Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen
One Shot®TOP10		F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ( <i>araleu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Thermo Fisher Scientific
	pGEM®T Easy	amp <sup>r</sup> , Klonierung von PCR-Produkten	Promega
	pETSUMOadapt	kan <sup>r</sup> , Expressionsvektor, Derivat	Dr. Eva Bosse-Doenecke

pETSUMO_p30	kan <sup>r</sup> , cDNA kodierend für Squid-p30 in pETSUMOadapt, Expressionsvektor	Dr. Susann Friedrich
pETSUMO_p32	kan <sup>r</sup> , cDNA kodierend für Squid-p32 in pETSUMOadapt, Expressionsvektor	Dr. Susann Friedrich
pETSUMO_p32 <sub>W261A</sub>	kan <sup>r</sup> , cDNA kodierend für Squid-p32 <sub>W261A</sub> in pETSUMOadapt, Expressionsvektor, Derivat	diese Arbeit
pETSUMO_p32 <sub>W264A</sub>	kan <sup>r</sup> , cDNA kodierend für Squid-p32 <sub>W264A</sub> in pETSUMOadapt, Expressionsvektor, Derivat	diese Arbeit
pETSUMO_p32 <sub>W261,264A</sub>	kan <sup>r</sup> , cDNA kodierend für Squid-p32 <sub>W261,264A</sub> in pETSUMOadapt, Expressionsvektor, Derivat	diese Arbeit
pAC-sgRNA-Cas9	amp <sup>r</sup> , Expression von sgRNA und Cas9 in Mosquitozellen, CRISPR/Cas9	Ji-Long Liu, Addgene plasmid # 49330
pAC-sgRNA2-Cas9	amp <sup>r</sup> , sgRNA2 in Expressionsvektor	diese Arbeit
pAC-sgRNA3-Cas9	amp <sup>r</sup> , sgRNA3 in Expressionsvektor	diese Arbeit
pAC-sgRNA4-Cas9	amp <sup>r</sup> , sgRNA4 in Expressionsvektor	diese Arbeit
pAC-sgRNA5-Cas9	amp <sup>r</sup> , sgRNA5 in Expressionsvektor	diese Arbeit
pAC-sgRNA6-Cas9	amp <sup>r</sup> , sgRNA6 in Expressionsvektor	diese Arbeit
pAC-sgRNA7-Cas9	amp <sup>r</sup> , sgRNA7 in Expressionsvektor	diese Arbeit
pSinRep5_p30	amp <sup>r</sup> , cDNA kodierend für Squid-p30 in pSinRep5; FLAG- <i>tag</i> Sequenz <i>upstream</i> , Expressionsvektor	Dr. Susann Friedrich
pSinRep5_p32	amp <sup>r</sup> , cDNA kodierend für Squid-p32 in pSinRep5; FLAG- <i>tag</i> Sequenz <i>upstream</i> , Expressionsvektor	Dr. Susann Friedrich



---

pWNVRIucHDVr	WNV Replikon (Stamm NY 2000 crow3356) Derivat, mit Hepatitis-Delta-Ribozym und Renilla-Luziferase-Sequenz	Dr. Susann Friedrich
--------------	---	----------------------

---

## 2.3. Kultivierungsbedingungen für prokaryotische Zellen

### 2.3.1. Nährmedium und Zusätze

Das Komplexmedium nach Sambrook *et al.* (1989) diente der Zellanzucht von *E. coli*-Stämmen. Zusammensetzung wie folgt:

**LB-Medium:**    10 g Bacto-Trypton  
                       5 g Hefeextrakt  
                       10 g Natriumchlorid  
                           *ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>*

Zur Herstellung von LB-Platten wurden dem Medium 15 g/l Agar zugesetzt.

#### Antibiotika:

Die Herstellung der Antibiotika-Stammlösungen erfolgte nach Ausubel *et al.* (1993). Die Stammlösungen wurden bei -20°C aufbewahrt und den sterilen Medien in einer 1:1000 Verdünnung zugesetzt.

Tabelle 2: Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentration im Medium

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration in Medium
Ampicillin	100 g/l in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	100 mg/l
Kanamycin	50 g/l in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	50 mg/l
Chloramphenicol	20 g/l in 100 % Ethanol	20 mg/l

### 2.3.2. Anzucht und Zellernte

Die Anzucht der verwendeten *E. coli*-Stämme erfolgte in sterilem LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (Tabelle 2). Für die Flüssigkulturen wurden sterile Reagenzgläser und Erlenmeyerkolben verwendet, welche bei 37°C (Brutschrank) auf einem Rotationsschüttler (GFL-3005, Hilab) oder auf einem Universalschüttler (SM30, Edmund Bühler GmbH) bei 150 rpm angezogen wurden. Dabei wurde ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 eingehalten.

Das Wachstum der Zellen wurde über Messung der optischen Dichte bei 600 nm Wellenlänge ( $OD_{600}$ ) an einem Spektrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt. Als Kontrolle diente dabei unbeimpftes Medium. Die Zellen wurden in einer Hettich-Zentrifuge Mikro 200 (Winkelrotor für 24 x 1.5 / 2 ml, Hettich) oder in der Hettich-Zentrifuge Rotina 380R (Winkelrotor für 6 x 50 ml, Hettich) geerntet. Beimpfte Agar-Platten wurden aerob bei 37°C über Nacht inkubiert.

## 2.4. Kultivierung und Transfektion von Mosquitozellen

### 2.4.1. Kultivierung von C6/36-Zellen

Die erste kontinuierliche Mosquitozelllinie ATC15 wurde 1967 von Singh aus ganzen *Aedes albopictus* Larven generiert. Aus dieser Zelllinie isolierte Igarashi (1978) mehrere Einzelzellklone. Ziel war es eine möglichst virusanfällige Zelllinie zu generieren, die der Virusvermehrung dienen konnte. Klon 6 zeigte bei Infektion mit DENV und CHIKV den höchsten Virustiter. Daraufhin wurde Klon 6 der Zelllinie ATC15 subkloniert, der Klon C6/36 wurde näher charakterisiert und wird bis heute als Mosquitozelllinie genutzt.

Die Mosquitozellen wurden zweimal wöchentlich auf 10 cm Zellkulturschalen passagiert. Als Anzuchtmedium diente MEM (1 x) (*Minimum Essential Medium*, Thermo Fisher Scientific) mit 100 U/ml Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin, 1 x NEAA (*Non-Essential Amino Acid*, Thermo Fisher Scientific), 1 mM Natriumpyruvat (Thermo Fisher Scientific), 10 mM HEPES pH 7.4 und 10 % fötalem Kälberserum (FCS, PAN-Biotech). Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und mit frischem Medium durch kräftiges Auf- und Abpipettieren von der Oberfläche der Zellkulturschale gelöst und in eine neue Zellkulturschale überführt. Die Zelllinie wurde bei 28°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

### 2.4.2. Kultivierung von U4.4-Zellen

Diese Zelllinie wurde ebenfalls aus der Ursprungszelllinie ATC15 mittels Einzelzell-Isolierung generiert und stammt somit vom gleichen Organismus wie die C6/36-Zellen. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich auf 10 cm Zellkulturschalen passagiert. Als Anzuchtmedium diente Leibovitz's L-15 (Thermo Fisher Scientific) mit 100 U/ml Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin, 1 x NEAA (*Non-Essential Amino Acid*, Thermo Fisher Scientific), 2 % Tryptose-Phosphat und 10 % fötalem Kälberserum (FCS, PAN-Biotech). Die Zelllinie wurde bei 28°C und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert; die weiteren Bedingungen entsprechen denen der C6/36-Zellen.

### 2.4.3. Kryokonservierung von Zellen

Um die Zellen über längere Zeit aufzubewahren, wurden sie in einem Einfriermedium, welches ein Gefrierschutzmittel beinhaltet, in flüssigen Stickstoff eingefroren. Dieses Medium besteht aus 50 % des entsprechenden Anzuchtmediums mit allen verwendeten Zusätzen, 40 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO). Es wurden ca. 13 x 10 cm Zellkulturschalen mit 1 x PBS gewaschen und die Zellen anschließend in 2 x 10 ml Medium gelöst. Die Zellen wurden für 5 min bei 366 g in einer Zentrifuge (Hettich Rotina 380R, Ausschwingrotor 1754, 4-Fach) sedimentiert. Das alte Medium wurde entfernt und die Zellen in 10 ml Einfrier-Medium gelöst. Jeweils 1 ml dieser Zelllösung wurde in Kryo-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden über Nacht in einem mit Isopropanol befülltem Einfrierbehälter (Nalgene, *Mr. Frosty Cryo Freezing Container*) bei -80°C langsam eingefroren, am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt und zur Langzeitlagerung in einem Schubladengefrierbehälter (MVE Cryosystem 2000) in der flüssigen Stickstoff-Phase aufbewahrt.

### 2.4.4. Revitalisierung von Zellen

Zum Auftauen der Mosquitozellen wurden diese dem Schubladengefrierbehälter entnommen und langsam in einem Wasserbad bei 28°C erwärmt. Die aufgetauten Zellen wurden anschließend in 10 ml Medium gelöst und bei 528 g für 5 min in einer Zentrifuge (Hettich Rotina 380R, Ausschwingrotor 1754, 4-Fach) sedimentiert. Das alte Medium wurde verworfen und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und auf eine Zellkulturschale übertragen. Die U4.4-Zellen konnten direkt in 10 ml Medium auf eine 10 cm-Zellkulturschale übertragen werden, die C6/36-Zellen zunächst nur in 2 ml Medium auf eine 6-well Zellkulturplatte. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.4.1. und 2.4.2. beschrieben kultiviert.

### 2.4.5. Quantifizierung der Squid-p30 und Squid-p32 Molekülzahl pro Zelle

Zunächst wurden die zu analysierenden Zellen von einer 10 cm-Zellkulturschale gelöst und 10 µl davon mit einer Neubauer Zählkammer (0.1 mm Tiefe, 1 mm<sup>2</sup> pro Eckquadrat, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) gezählt. Es wurden je 4 Eckquadrate in einer Dreifachbestimmung ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Der berechnete Mittelwert wird mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor und mit 10<sup>4</sup> (da das Volumen eines Eckquadrates 0.0001 ml entspricht) multipliziert. Daraus ergibt sich dann die Zellzahl pro ml. Dann wurde das Volumen berechnet in welchem sich 1 x 10<sup>6</sup> Zellen befinden sollten, auf Eppendorf *tubes* verteilt und im flüssigen Stickstoff weggefroren.

Die Zellen wurden zur Auswertung in 20 µl Zelllyse-Puffer gelöst. Dabei wurden die Zellen zur Auswertung des Gesamtzellextraktes in RIPA-Puffer und zur Auswertung des zytoplasmatischen Extraktes in Lyse-Puffer von Promega gelöst. Anschließend wurden 5 µl des Zelllysates, welches 250000 Zellen entsprechen sollte, in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Quantifizierung der Molekülanzahl pro Zelle wurde eine Verdünnungsreihe der rekombinant gereinigten Squid-Proteine mit bekannter Konzentration mitgeführt. Die Intensität der visualisierten Banden wurde linear zur Proteinkonzentration aufgetragen und mit der resultierenden Formel die Proteinkonzentrationen von Squid-p30 und Squid-p32 berechnet. Die berechnete Masse wurde mit 250 000 (Anzahl der Zellen) dividiert und in Gramm umgerechnet. Um die Anzahl der Moleküle pro Zelle zu erhalten wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Molekülanzahl pro Zelle} = m / (M_w \cdot N_A)$$

$m$  = Masse (g)

$M_w$  = Molekulargewicht (g/mol)

$N_A$  = Avogadro-Konstante ( $6.02214 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )

#### 2.4.6. Transfektion von viraler RNA und siRNA mittels Elektroporation

Die siRNAs wurden von einem kommerziellen Anbieter (Eurofins Genomics) bezogen. Sie wurden in 6 mM HEPES, 20 mM KCl, 0.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.3 gelöst (Stammlösung: 100 pmol/µl) und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten siRNAs

Name	5'→3'-Sequenz	Beschreibung
sip32/p30	GCAUAAACGUCAAGACAGA	bindet im <i>open reading frame</i> der mRNA von Squid-p30 und Squid-p32
siGFP	GGCUACGUCCAGGAGCGCACC	Kontroll-siRNA, bindet im <i>open reading frame</i> der mRNA von <i>green fluorescent protein</i> (GFP)

Die Mosquitozellen wurden am Vortag der Transfektion in der Regel 1:2 gesplittet, so dass sie am Tag der Transfektion eine 80% - 90%ige Konfluenz aufwiesen. Die Zellen wurden mit frischem Medium von der Zellkulturschale gespült und zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Die Zellen von 1.5 x 10 cm-Zellkulturschalen wurden in 400 µl PBS gelöst. Für die Transfektion von siRNA wurden die Zellen mit 1200 pmol (C6/36-Zellen) oder 600 pmol (U4.4-Zellen) siRNA versetzt und in eine Elektroporationsküvette (Gene Pulser, *Cuvettes*, 0.4 cm *gap*, Bio-Rad Laboratories) übertragen.

Für die Transfektion von Replikon-RNA wurden die Zellen mit 1 µg Replikon-RNA versetzt und in eine Elektroporationsküvette übertragen. Die Elektroporation erfolgte an einem Elektroporator (Gene Pulser Xcell™, Bio-Rad Laboratories) unter folgenden Bedingungen:

Spannung U = 300 V

Kapazität C = 300 µF

Widerstand R = ∞

1 Puls

Die transfizierten Zellen wurden mit zweimal 800 µl Medium aus der Küvette gespült und in frisches Medium einer entsprechenden Zellkulturschale überführt. Die Analyse der viralen Translation und Replikation erfolgte nach verschiedenen Zeitpunkten durch Messung der Renilla-Luziferase-Aktivität an einem Luminometer (GloMax® 20/20, Promega). Die siRNA-vermittelte Depletion der Squid-Proteine wurde mit Hilfe eines Western Blots analysiert.

#### 2.4.7. Transfektion von Plasmid-DNA mit Lipofectamine 2000

Die Mosquitozellen wurden am Vortag der Transfektion so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu 80% - 90% klonfluent waren. Zur Transfektion von Zellen in einem *well* einer 6-*well* Zellkulturschale wurden 5 µl Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) mit 125 µl serum- und antibiotikafreiem Medium verdünnt. 2.5 µg der Plasmid-DNA (pAC-sgRNA1-7-Cas9) wurden ebenfalls mit 125 µl Medium verdünnt. Die jeweiligen Verdünnungen wurden vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der DNA-Lipidkomplex wurde anschließend auf die Zellen getropft. Da das transfizierte Plasmid pAC-sgRNA2-7-Cas9 für die Puromycin N-Acetyltransferase kodiert, wurde 3 Tage später die Selektion mit Puromycin begonnen. Das Puromycin (Stammlösung 10 g/l in 20 mM HEPES Puffer (pH 6.2–6.8)) wurde in einer Endkonzentration von 5-8 mg/l dem Medium hinzugegeben. Nach 5 weiteren Tagen wurde die Antibiotika-Selektion beendet, um die Integration des Vektors in das Genom zu verhindern.

#### 2.4.8. Isolierung von Einzelzellklonen

##### 2.4.8.1. Isolierung von Einzelzellklonen mittels FACS

Zur Generierung einer monoklonalen Squid-p30 und Squid-p32 *knockout*-Zelllinie war es notwendig den transfizierten und bereits selektierten polyklonalen Zellpool zu vereinzeln. Die Vereinzelung der Zellen wurde mit einem BD FACSMelody™ (*fluorescence-activated cell sorting*, BD Bioscience) von Dr. Nadine Bley in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier (Institut für molekulare Medizin, Sektion Molekulare Zellbiologie, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

Die Einzelzellen wurden in 100 µl Medium einer 96-*well* Zellkulturplatte überführt und für mehrere Tage expandiert. Das Screening auf erfolgreich mutierte Squid-p30 und Squid-p32 Klone wurde nach ca. 4 Wochen begonnen, wenn die Zellen auf einer 12-*well* Zellkulturplatte zu ca. 100 % konfluent gewachsen waren.

#### 2.4.8.2. Isolierung von Einzelzellklonen mittels *limiting dilution*

Eine weitere Möglichkeit Zellen zu vereinzeln ist die Methode der Grenzverdünnung. Dabei werden die Zellen in mehreren Schritten so verdünnt, dass final nur noch eine oder keine Zelle in einer Verdünnungsstufe vorhanden ist. Das Vorgehen in dieser Arbeit basiert auf einem Protokoll von Addgene. Die zu vereinzeln Zellen wurden mit 1 x PBS gewaschen und mit 1 ml Medium von der Platte gespült. Die Zellen wurden gründlich resuspendiert, um Zellklumpen zu vermeiden. Anschließend wurde die Zelllösung mit 1 ml frischem Medium auf 2 ml aufgefüllt und 10 µl dieser Lösung mit einer Neubauer Zählkammer (0.1 mm Tiefe, 0.0025 mm<sup>2</sup> pro Quadrat, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) gezählt. Es wurden 4 Großquadrate in einer Doppelbestimmung ausgezählt. Die Zellsuspension wurde dann auf eine Konzentration von 5 Zellen/ml verdünnt und 100 µl von dieser Zellsuspension in eine 96-*well* Zellkulturplatte verteilt. So wurden im Durchschnitt 0.5 Zellen pro 96-*well* ausgesät, um zu verhindern, dass ein *well* mehr als eine Zelle erhält. Die Zellen wurden für ca. 4 Wochen expandiert und mittels Western Blot analysiert.

#### 2.4.9. Screening der potentiellen Squid-p30 und Squid-p32 *knockout*-Klone

Die Analyse der potentiellen Squid-p30 und Squid-p32 *knockout*-Klone wurde mittels Western Blot auf Proteinebene realisiert. Von Klonen, welche ein vermindertes Squid-p30- und Squid-p32-Proteinlevel zeigten, wurde genomische DNA isoliert und der potentielle Mutationsbereich in einer PCR amplifiziert. Dabei wurden Primer verwendet, welche *up-* bzw. *downstream* der jeweiligen sgRNA-Zielsequenz (*single guide* RNA) binden. Das resultierende PCR-Produkt wurde gereinigt und mittels Sequenzierung analysiert. Bei einer erfolgreichen Mutation zeigt die Sequenz Veränderungen in Form von Deletionen oder Insertionen von Nukleotiden. Weist das Chromatogramm der Sequenzierung an der Stelle der Mutation überlagernde Peaks auf, handelt es sich um einen heterozygoten *knockout*, d. h. einem *knockout* auf nur einem Allel, da die Wildtyp-Sequenz immer noch vorhanden ist. Bei einem homozygoten *knockout* müssen alle Allele mutiert sein. Zur Verifizierung der Mutanten wurde das jeweilige PCR-Fragment in den pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor subkloniert und einzelne Klone erneut anhand der Sequenzierung analysiert.

## 2.5. Molekulargenetische Arbeiten mit RNA

### 2.5.1. *in vitro* Transkription von RNA

Die zur Transfektion der Mosquitozellen verwendete Replikon-RNA wurde von einem linearisierten Plasmid als *template* synthetisiert. Für die Synthese von viraler sgRNA als *template* für den *in vitro* RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Assay (RdRp) wurde ein PCR-Produkt als *template* genutzt. Die verwendeten Ribonukleosidtriphosphate wurden von Jena Bioscience bezogen. Der RNase Inhibitor RiboLock wurde von Thermo Fisher Scientific und die T7 RNA Polymerase von Agilent Technologies erworben.

Zusammensetzung eines *in vitro* Transkriptionsansatzes:

1 µg Plasmid <sub>linearisiert</sub> bzw. 200 ng PCR-Produkt	x µl
5 x Transkriptionspuffer	8 µl
10 mM rNTPs	4 µl
100 mM DTT	4 µl
RiboLock (40 U/µl)	0.5 µl
T7 RNA Polymerase (50 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Sigma</sub>	ad 40 µl

Bei *in vitro* Transkriptionen von WNV-Replikon-RNA oder Sindbis-Replikon-RNA wurde zusätzlich ein cap-Analog m<sup>7</sup>GpppG zum Ansatz in einer Endkonzentration von 0.8 mM hinzugegeben. Dementsprechend wurde die Menge an rGTP auf 5 mM verringert.

Der Ansatz wurde für 2 - 3 h bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 10 U DNase I (Roche) für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Volumen mit H<sub>2</sub>O<sub>Sigma</sub> auf 200 µl erhöht. Es wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Der dabei anfallende wässrige Überstand wurde erneut mit 1 Volumen Chloroform extrahiert und anschließend mit 2.36 Volumen 100%igem Ethanol und 0.18 Volumen 6 M Ammoniumacetat für 10 min auf Eis gefällt. Danach wurde der Ansatz 30 min bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>Sigma</sub> gelöst. Die Qualität der RNA wurde auf einem 1%igem Formaldehyd-Agarose-Gel analysiert und die Konzentration wurde an einem Mikrovolumen-UV/VIS-Spektralphotometer (Nanodrop™One, Thermo Fisher Scientific) bei 260 nm bestimmt. Abschließend wurde die RNA bei -80°C gelagert.

### 2.5.2. Konzentrationsbestimmung von RNA

Zur Bestimmung der Konzentration von RNA wurde die Extinktion bei 260 nm an einem Nanodrop™ gemessen. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm gibt Aufschluss über eventuelle Verunreinigungen der RNA. Bei einem Wert von 2 wird die RNA-Präparation als kontaminationsfrei von Proteinen gesehen.

### 2.5.3. Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

Um die Qualität und korrekte Größe der RNA zu überprüfen, wurde die RNA in einer horizontalen Flachbett-Elektrophoresekammer aufgetrennt. Die Agarosekonzentration der verwendeten Gele betrug dabei 1 % (w/v). Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 x MOPS [0.02 M MOPS, 0.005 M Natriumacetat, 0.001 M EDTA in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, pH 7.0] verwendet. In diesem Puffer wurde die Agarose durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst. Zu der abgekühlten, flüssigen Agaroselösung wurde 1 % Formaldehyd hinzugegeben und in eine Gelkammer gegossen. Die RNA wurde mit 2 µl 5 x Ladepuffer (4 mM EDTA, 0.88 M Formaldehyd, 20 % Glycerin, 32 % Formamid, 0.1 mg/ml Ethidiumbromid, 4 x MOPS) versetzt und auf 10 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>Sigma</sub> aufgefüllt. Die Denaturierung der Proben fand für 10 min bei 70°C statt. Anschließend wurde die RNA kurz auf Eis gestellt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die RNA wurde bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt und die RNA-Banden wurden mittels UV-Licht an einer Geldokumentationsanlage UVP UVsolo *touch* (Analytik Jena) detektiert.

### 2.5.4. Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der radioaktiv-markierten RNA-Produkte des RNA-abhängigen-RNA-Polymerase-Assays wurden 5%ige, denaturierende Harnstoff-Polyacrylamidgele verwendet. Als Laufpuffer diente 0.5 x TBE [44.5 mM Tris, 44.5 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8.0]. Das Harnstoffgel wurde zwischen Glasplatten mit den Abmessungen 20 x 10 x 0.1 cm und mit 24 ml Gellösung hergestellt Die verwendeten Gellösungen sind wie folgt:

- Lösung 1:     8 M Harnstoff  
              1 x TBE-Puffer
- Lösung 2:     4 M Harnstoff  
              20 % Acrylamid : Bisacrylamid (19 : 1)  
              0.5 x TBE-Puffer

Beide Lösungen wurden im Verhältnis 3 Volumen Lösung 1 und 1 Volumen Lösung 2 zu einer finalen Gellösung gemischt.



Mit 0.08 % (w/v) APS und 0.17 % (v/v) TEMED wurde die Polymerisations-Reaktion ausgelöst und die flüssige Gellösung wurde zwischen stabilisierte und formgebende Glasplatten gegossen. Ein Probenkamm zur Ausbildung der Probenaschen wurde ebenfalls fixiert. Dieser kann nach der Polymerisation des Harnstoffgels entfernt werden und dient zur Aufnahme der Proben. Die RNA-Produkte wurden in 20 µl Formamid-Ladepuffer [10 mM EDTA (pH 8.0), 0.1 % (w/v) Xylencyanol, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau, 97.5 % (v/v) Formamid] gelöst und für 3 min bei 95°C erhitzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 15 W (Consort EV233 *Electrophoresis Power Supply*, Sigma-Aldrich). Anschließend wurde das Harnstoffgel 20 min in 5%iger Essigsäure fixiert und auf Whatman<sup>®</sup>Papier vakuumgetrocknet (Unigeldryer 3545 D, UniEquip).

### 2.5.5. RNA-Größenstandard

Zur Bestimmung der Größe elektrophoretisch aufgetrennter RNA-Fragmente wurde der RiboRuler™ *High Range RNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, 8 Fragmentgrößen: 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500 und 200 bp) genutzt.

## 2.6. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA

### 2.6.1. DNA-Isolation

#### 2.6.1.1. Genomische DNA-Isolation aus Mosquitozellen

Genomische DNA wurde aus Mosquitozellen mit Hilfe des *Genomic Purification Kit* von Thermo Fisher Scientific isoliert. Es wurden die Zellen eines *wells* (100 % konfluent) einer 6-*well* Zellkulturschale oder einer 10 cm-Zellkulturschale genutzt. Die Zellen wurden für 2 min bei 3420 g sedimentiert und anschließend in flüssigem Stickstoff weggefroren oder frisch aufgearbeitet. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

#### 2.6.1.2. Miniplasmidisolierung (verändert nach Sambrook *et al.* (1989))

Diese Methode wurde zur Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli*-Bakterien, deren Reinheit ausreichend für PCR, Sequenzierung und Restriktionsanalysen war, genutzt. Dafür wurden 3 ml LB-Medium steril in Kulturröhrchen angeimpft und mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht schüttelnd bei 37°C angezogen. Die Zellen wurden bei 16000 g in einer Tischzentrifuge sedimentiert und das resultierende Zellpellet in 150 µl Resuspensionspuffer gelöst.

Die Zellen wurden durch Zugabe von 150 µl Lysepuffer, 4-6-maliges Invertieren und anschließender 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Um den pH-Wert wieder zu neutralisieren wurden 150 µl Neutralisierungspuffer hinzugegeben, wieder 4-6 mal invertiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Der nächste Zentrifugationsschritt fand bei 16000 g und 4°C für 10 min statt. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit 2.5 Volumen 100%igen Ethanol für 5 min auf Eis gefällt. Es erfolgte ein weiterer 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 16000 g und 4°C. Das resultierende DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und bei -20°C gelagert.

Es wurden folgende Puffer verwendet:

Resuspensionspuffer:	50 mM Tris-HCl
	10 mM EDTA
	100 µg/µl RNase A
	pH 8
Lysepuffer:	200 mM NaOH
	1 % SDS
Neutralisierungspuffer:	3 M Kaliumacetat
	pH 5.5

### 2.6.1.3. Plasmidisolation mit kommerziellen Kits

Da bei einer Plasmidisolation mit kommerziellen Kits DNA mit deutlich höherem Reinheitsgrad generiert wird, wurde das *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific) für die Isolation von finalen Plasmid-Konstrukten verwendet.

Für Präparationen im größeren Maßstab wurde das Präparationskit *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega) verwendet. Die Arbeitsschritte zur Isolation der Plasmid-DNA richteten sich bei beiden Kits nach den Angaben des Herstellers.

### 2.6.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA wurde elektrophoretisch in einer horizontalen Flachbett-Elektrophoresekammer (Peqlab Biotechnologie) aufgetrennt. Die dabei verwendeten Gele betrug eine Agarose-Konzentration von 1 % (w/v) bis 2 % (w/v), abhängig von der aufzutrennenden Fragmentgröße. Die Agarose wurde durch Erhitzen in einer Mikrowelle in 0.5 x TAE-Puffer [20 mM Tris-Acetat, 0.5 mM EDTA, 10 mM Eisessig (pH 8.5)] gelöst und nach Abkühlung mit 0.25 mg/l Ethidiumbromid versetzt. Das noch flüssige Agarose-Gel wurde in den Träger der Elektrophoresekammer gegossen. Als Laufpuffer diente ebenfalls der 0.5 x TAE-Puffer.

Die Proben wurden im Verhältnis 3:1 mit DNA-Ladepuffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 60 % (v/v) Glycerin, 0.03 % (w/v) Xylen Cyanol FF, 60 mM EDTA, 0.03 % (w/v) Bromphenolblau] versetzt und aufgetragen. Abhängig von der DNA-Größe und Konzentration wurden bei analytischen Gelen 1-10 µl und bei präparativen Gelen 20 µl–100 µl aufgetragen. Die Proben wurden bei einer Spannung von 100 V elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Banden wurden mittels UV-Licht an einer Geldokumentationsanlage UVP UVsolo *touch* (Analytik Jena) detektiert.

### 2.6.3. DNA-Größenstandard

Um die Größe elektrophoretisch aufgetrennter linearer DNA-Fragmente zu bestimmen wurde der *Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific) (14 Fragmentgrößen: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 und 250 bp) genutzt.

### 2.6.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die DNA wurde in Reaktionsansätzen in einem Volumen von 20 µl (meist analytisch) bis zu 100 µl (präparativ) mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die dabei verwendeten Enzyme und zugehörigen Puffer wurden von NEB oder Thermo Fisher Scientific bezogen. Es wurden 1-10 µg Plasmid mit 10 U Restriktionsendonuklease bei der für das Enzym spezifischen Temperatur über Nacht inkubiert. 1 U eines Enzyms ist als die Menge definiert, die benötigt wird um 1 µg DNA in 1 h bei der für das Enzym spezifischen Temperatur in einem Gesamtvolumen von 50 µl zu schneiden.

### 2.6.5. DNA-Reinigung

DNA in Form von PCR-Produkten oder aus präparativen Restriktionsansätzen wurde über das kommerzielle *PCR Purification Kit* von Thermo Fisher Scientific nach Angaben des Herstellers gereinigt. Um DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen zu reinigen, wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung die Fragmente unter langwelligem UV-Licht detektiert und mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Die weitere Reinigung erfolgte mit dem *Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

### 2.6.6. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA-Präparation wurde mit Messung der optischen Dichte bei 260 nm an einem Mikrovolumen-UV/VIS-Spektralphotometer (Nanodrop™One, Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA. Bei einem Wert von 1.8-2 wird die DNA-Präparation als kontaminationsfrei von Proteinen gesehen.

### 2.6.7. Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl in den entsprechenden Vektor ligiert. Das Verhältnis der molaren Menge von Vektor- zu Fragment-DNA betrug ca. 1:5. Die Ligation fand für die pAC-sgRNA-Cas9-Konstrukte mit 1 U T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific) bei 18°C für 2 h statt. Für PCR-Produkte, welche in den pGEM<sup>®</sup>-T Easy ligiert wurden, wurde 50 ng Vektor und Ligationspuffer, sowie T4-DNA-Ligase des pGEM<sup>®</sup>-T Easy *Vector System Kits* (Promega) verwendet.

### 2.6.8. Phosphorylierung/Dephosphorylierung von DNA

PCR-Produkte oder *annealing*-Produkte wurden vor der Ligationsreaktion mit 10 U T4 Polynukleotidkinase (Thermo Fisher Scientific) phosphoryliert. Vektoren wurden mit 1 U Alkalischer Phosphatase (Fast AP, Thermo Fisher Scientific) desphosphoryliert. Die Arbeitsschritte richteten sich nach Angaben des Herstellers.

### 2.6.9. *Annealing* von DNA-Oligonukleotiden

Die zu hybridisierenden DNA-Oligonukleotide wurden in 1 x STE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) auf 98°C erhitzt und in 10°C-Schritten innerhalb von 2 h langsam auf 30°C abgekühlt.

### 2.6.10. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

#### 2.6.10.1. Auswahl der Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer sind unter Tabelle 4 aufgeführt und wurden vom kommerziellen Anbieter Eurofins Genomics bezogen. Die Oligos wurden in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst (Stammlösung: 100 pmol/µl) und bei -20°C gelagert.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-Primer

Name	5'→3'-Sequenz	Beschreibung
<b>Primer für Mutagenese von Squid-p32</b>		
p32_W261A-for	CTATTATGGCGAT <u>GCG</u> GCGGGATGGGGC	<i>forward</i> Primer zur Mutagenese von W an Position 261 zu A in Squid-p32
p32_W261A-rev	GCCCCATCCCGCC <u>G</u> CATCGCCATAATAG	<i>reverse</i> Primer zur Mutagenese von W an Position 261 zu A in Squid-p32
p32_W264A-for	GATTGGGCGGGAG <u>G</u> GCTACAACGG	<i>forward</i> Primer zur Mutagenese von W an Position 264 zu A in Squid-p32
p32_W261A-rev	CCGTTGTAGCC <u>G</u> CTCCCGCCCAATC	<i>reverse</i> Primer zur Mutagenese von W an Position 261 zu A in Squid-p32
<b>Primer für Screening der potentiellen Squid-p30 und Squid-p32 <i>knockout</i>-Klone</b>		
sgRNA4-for	TTCGCCCAACACGGGCGCTCGCG	<i>forward</i> Primer zur Amplifikation der Zielsequenz der sgRNA5 in Squid-p32/p30
sgRNA6-rev	AACGAGATGGTCTGCTTTGGCGTC	<i>reverse</i> Primer zur Amplifikation der Zielsequenz der sgRNA5 in Squid-p32/p30
sgRNA5-for	TTCGAAGAAGCCAAGGCCCGCCA	<i>forward</i> Primer zur Amplifikation der Zielsequenz der sgRNA7 in Squid-p32/p30
sgRNA7-PCR-rev	ACTCACCTTTGGGTCCTCCAGG	<i>reverse</i> Primer zur Amplifikation der Zielsequenz der sgRNA7 in Squid-p32/p30
<b>Primer für Sequenzierung</b>		
Ac5 Promoter-for	ACTTGAGAGCGGAGAGCATTGC	<i>forward</i> Primer zur Sequenzierung des Ac5 Promoter von Cas9 im pAC-sgRNA-Cas9 Plasmid

<b>sgRNA5-Seq-for</b>	CAAGAGCGCCGATTCGATCG	<i>forward</i>	Primer	zur Sequenzierung der Zielsequenz der sgRNA5
<b>sgRNA6-for</b>	TTCGACGCCAAAGCAGACCATCTC	<i>forward</i>	Primer	zur Sequenzierung der Zielsequenz der sgRNA7
<b>sgRNA7-rev</b>	AACCGTGGCGGGCCTCGCATGCC	<i>reverse</i>	Primer	zur Sequenzierung der Zielsequenz der sgRNA6
<b>m13-for</b>	TGTAACGACGGCCAG	<i>forward</i>	Primer	zur Sequenzierung einer Zielsequenz subkloniert in pGEM <sup>®</sup> T Easy, Standard Primer Microsynth Seqlab
<b>pETSUMO-for</b>	TCAGGATCCAAGCTTGCGG	<i>forward</i>	Primer	zur Überprüfung der korrekten Sequenz der Squid-p32-Varianten
<b>pETSUMO-rev</b>	ACCACCAATCTGTTCTCTGTGAG	<i>reverse</i>	Primer	zur Überprüfung der korrekten Sequenz der Squid-p32-Varianten
<b>Primer für Identifikation der Anzahl der Squid-Gene</b>				
<b>C6/36 Exon4-for</b>	AAGGAGGTGGACGTCAAGAAGG	<i>forward</i>	Primer	bindet in Exon 4 des Squid-p32/p30 Genes (138 bp)
<b>C6/36 Intron4-rev</b>	GCTTCAGTTTTCAAGCACTGAAGG	<i>reverse</i>	Primer	bindet in Intron 4 des Squid-p32/p30 Genes (743 bp bzw. 837 bp)

Die auszutauschenden Nukleotide sind in der Sequenz unterstrichen.

#### 2.6.10.2. Standard-PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion diente der präparativen oder analytischen Vervielfältigung von DNA. Dabei wurde für analytische Zwecke oder für Klonierung in den pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor die *DreamTaq*-Polymerase (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Da die *Phusion*-Polymerase (Thermo Fisher Scientific) eine 5'-3'-*proof-reading*-Aktivität aufweist, wurde diese für präparative Zwecke eingesetzt. Als *template* diente gereinigte DNA oder Koloniematerial.

Die Zellen der Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher von der Agar-Oberfläche in den Reaktionsansatz überführt. Die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) wurden von Jena Bioscience erworben. Ein Standard-PCR Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

<i>template</i>	x µl
5x <i>Phusion</i> HF-Puffer	10 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	1 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
<i>Phusion</i> -Polymerase (2 U/µl)	0.5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Sigma</sub>	ad 50 µl

Bei Reaktionsansätzen mit *DreamTaq*-Polymerase wurde 10 x PCR-Puffer sowie 0.2 µl Enzym (5 U/µl) verwendet.

Die Reaktion wurde mit folgendem Thermocycler-Programm durchgeführt:

1)	98°C	2 min	Initiale Denaturierung
2)	98°C	20 s	Denaturierung
3)	x°C	20 s	Hybridisierung der Primer
4)	72°C	x s	DNA-Synthese
	Schritt 2-4: 31 Zyklen		
5)	72°C	2 min	Nachsynthese
6)	8°C	Pause	

Das Programm wurde der Schmelztemperatur der individuellen Oligonukleotid-Primer (*annealing* Temperatur) und der Länge des zu amplifizierenden Fragments (DNA-Synthese-Schritt: 1 min/kb für *DreamTaq*-Polymerase bzw. 15-30 s/kb für *Phusion*-Polymerase) entsprechend angepasst. Ebenso entschied die verwendete Polymerase über die Denaturierungstemperatur (95°C für die *DreamTaq*-Polymerase / 98°C für die *Phusion*-Polymerase).

### 2.6.10.3. *site directed mutagenesis*-PCR

Diese PCR-Technik wurde verwendet um gezielte Nukleotidaustausche in einer Sequenz zu bewirken. Die dabei zu mutierende Sequenz befindet sich in einem kleinen doppelsträngigen, *supercoiled* Vektor, der aus einem *dam*<sup>+</sup> - *E. coli*-Stamm isoliert wurde. Die Primer zur Amplifizierung der mutierten Sequenz sind komplementär und enthalten beide die gewünschte Mutation. In der PCR-Reaktion wird unter Verwendung von möglichst wenigen PCR-Zyklen (18 Zyklen) der komplette Vektor mit Insert amplifiziert. Anschließend wird die parentale, *dam*-methylierte *template*-DNA durch Zugabe von 10 U *DpnI* für 1 h bei 37°C, gespalten.

Da das Restriktionsenzym spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA schneidet, blieb das unmethylierte PCR-Produkt intakt. Das modifizierte Plasmid konnte dann direkt in *E. coli* transformiert werden.

#### 2.6.11. Transformation nach der Rubidiumchlorid-Methode

Bei dieser Transformationsmethode wurden 50 µl bis 100 µl kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 µl Plasmid oder 1-5 µl Ligationsansatz (maximal 10 % des Gesamtvolumens) versetzt. Darauf folgte ein Inkubationsschritt für 20 min auf Eis und ein Hitzeschock für 20-45 s (abhängig vom verwendeten Bakterienstamm) bei 42°C. Anschließend wurde das Gemisch für 2 min auf Eis gestellt, mit 400 µl LB-Medium versetzt und bei 37°C für 45 min schüttelnd inkubiert. Die angezogenen Zellen wurden komplett oder nur zum Teil steril auf Selektions-Agar (abhängig von dem verwendeten Bakterienstamm und/oder Plasmid) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 2.6.12. CRISPR/Cas9

Für die Generierung einer homozygoten Squid-p30 und Squid-p32 *knockout*-Zelllinie in C6/36-Zellen wurde das *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats 9*-System (CRISPR/Cas9) genutzt. Als Vektor diente pAC-sgRNA-Cas9 (von Ji-Long Liu, Addgene plasmid # 49330). Da der Vektor als Bakterienstock geliefert wurde, wurde das Plasmid mit Hilfe des Präparationskit *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega) isoliert. Die Klonierung der spezifischen *single guide*-Oligonukleotide (sgRNA-Oligonukleotide) in den Vektor wurde mit dem außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidenden Restriktionsenzym *BspQI* durchgeführt. Bei dem Schneiden mit *BspQI* wird am Ende des U6 Promoters und an dem sgRNA *backbone* ein drei Nukleotid langer 5'-Überhang erzeugt. So wurde bei dem Design der sgRNA-Oligonukleotide zu diesen Überhängen komplementäre Sequenzen, welche die 20 Nukleotid langen Ziel-Sequenzen flankieren, eingefügt. Des Weiteren war es wichtig, dass die erste Nukleinbase der Sequenz ein Guanin ist, damit die RNA-Polymerase III die Transkription an dem dU6 Promoter initiieren kann. Die sgRNA-Sequenzen wurden mit dem Programm CRISPRdirekt entworfen. Es wurden nur hochspezifische, 20 Nukleotid lange sgRNAs mit der geringsten Anzahl an *off-target hits* ausgewählt. Die Zielsequenz dieser sgRNAs ist *upstream* eines *protospacer adjacent motif* (PAM, im Fall von Cas9: NGG) lokalisiert (Tabelle 5). Die einzufügenden Oligonukleotide, welche im Vektor als sgRNAs fungieren, wurden durch *annealing* von DNA-Oligonukleotiden generiert. Anschließend wurden die hybridisierten Oligonukleotide phosphoryliert und in den dephosphorylierten pAC-sgRNA-Cas9 Vektor ligiert.



Das ligierte Konstrukt wurde in den *E. coli*-Stamm DH5a transformiert, als Selektionsantibiotikum diente Ampicillin. Die transformierten Zellen wurden auf positive Klone mittels Kolonie-PCR getestet. Finale Konstrukte wurden mit Kit gereinigt und anschließend mittels Lipofectamine 2000 in C6/36-Zellen transfiziert.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten sgRNA-Oligonukleotide

Name	5'→3' Sequenz	Beschreibung
<b>sgRNA2-for</b>	<u>CTTC</u> <b>g</b> CGAGGTGGACGCGGGGGACC	<i>sense</i> DNA-Oligonukleotid für <i>annealing</i> von Doppelstrang-sgRNA2
<b>sgRNA2-rev</b>	<u>AAC</u> <b>g</b> GTCCCCCGCTCCACCTCGc	<i>antisense</i> DNA-Oligonukleotid für <i>annealing</i> von Doppelstrang-sgRNA2
<b>sgRNA3-for</b>	<u>TTC</u> <b>g</b> CAAGAAGGTGACCCCAAGA	<i>sense</i> DNA-Oligonukleotid für <i>annealing</i> von Doppelstrang-sgRNA3
<b>sgRNA3-rev</b>	<u>AACT</u> <b>CTT</b> GGGGTTCGACCTTCTTgC	<i>antisense</i> DNA-Oligonukleotid für <i>annealing</i> von Doppelstrang-sgRNA3
<b>sgRNA4-for</b>	<u>TTC</u> <b>g</b> CCCAACACGGGCCGCTCGCG	<i>sense</i> DNA-Oligonukleotid für <i>annealing</i> von Doppelstrang-sgRNA4
<b>sgRNA4-rev</b>	<u>AAC</u> <b>CGCG</b> AGCGGCCCGTGTGGGc	<i>antisense</i> DNA-Oligonukleotid für <i>annealing</i> von Doppelstrang-sgRNA4
<b>sgRNA5-for</b>	<u>TTC</u> <b>g</b> AAGAAGGCCAAGGCCCGCCA	<i>sense</i> DNA-Oligonukleotid für <i>annealing</i> von Doppelstrang-sgRNA5
<b>sgRNA5-rev</b>	<u>AACT</u> <b>GGCG</b> GGCCTTGGCCTTCTTc	<i>antisense</i> DNA-Oligonukleotid für <i>annealing</i> von Doppelstrang-sgRNA5
<b>sgRNA6-for</b>	<u>TTC</u> <b>g</b> ACGCCAAAGCAGACCATCTC	<i>sense</i> DNA-Oligonukleotid für <i>annealing</i> von Doppelstrang-sgRNA6
<b>sgRNA6-rev</b>	<u>AAC</u> <b>GAGAT</b> GGTCTGCTTTGGCGTc	<i>antisense</i> DNA-Oligonukleotid für <i>annealing</i> von Doppelstrang-sgRNA6
<b>sgRNA7-for</b>	<u>TTC</u> <b>GGCAT</b> GCGAGGCCCGCCACG	<i>sense</i> DNA-Oligonukleotid für <i>annealing</i> von Doppelstrang-sgRNA7
<b>sgRNA7-rev</b>	<u>AAC</u> <b>CGTGG</b> CGGGCCTCGCATGCC	<i>antisense</i> DNA-Oligonukleotid für <i>annealing</i> von Doppelstrang-sgRNA7

Die unterstrichenen Anfangssequenzen sind komplementär zu der 5'-Überhang-Sequenz des mit *Bsp*QI geschnittenen pAC-sgRNA-Cas9 Vektors. Klein geschrieben und hervorgehoben sind die eingefügten Start-Guanine.

### 2.6.13. DNA-Sequenzierung

Zur Analyse von neu generierten Plasmid-Konstrukten oder zur Überprüfung von CRISPR/Cas9 Mutanten wurde die DNA-Sequenzierung von kommerziellen Anbietern (Microsynth SeqLab) genutzt.

## 2.7. Proteinbiochemische Methoden

### 2.7.1. Rekombinante Expression und Reinigung von SUMO-Fusionsproteinen

Alle Säulenchromatographien wurden an der FPLC (*fast protein liquid chromatography*)-Anlage ÄKTA *Purifier* (GE Healthcare) sowie mit Hilfe einer Peristaltik-Pumpe P1 (Pharmacia) durchgeführt. Bei dem verwendeten pETSUMO Expressionssystem wird das Protein, welches von Interesse ist, N-terminal mit dem SUMO (*small ubiquitin-related modifier*)-Protein fusioniert. Zusätzlich besitzt das Protein am N-Terminus einen Hexahistidin-tag, welcher an die Matrix von Nickel-NTA-Säulen bindet. Die Vorteile dieses Expressionssystems sind, dass die Löslichkeit der Fusionsproteine erhöht wird und um das native Proteinende zu erzeugen, das SUMO-Protein spezifisch durch die SUMO-Protease abgespalten werden kann.

#### 2.7.1.1. Rekombinante Herstellung von Squid-p30/p32 und Squid-p32-Alanin Varianten

Um zu untersuchen, ob das YGG-Motiv wichtig für die RNA-Umstrukturierungsaktivität von Squid-p32 ist, wurden zwei Tryptophane innerhalb dieses Motives durch Alanine substituiert. Es wurden zwei Einzelvarianten Squid-p32<sub>W261A</sub> und Squid-p32<sub>W264A</sub> und eine Doppelvariante Squid-p32<sub>W261,264A</sub> generiert.

Die Synthese, sowie Reinigung der Proteine erfolgte nach einem etablierten Protokoll, welches schon für die Herstellung von AUF1p45, Squid-p30 und Squid-p32 verwendet wurde (Friedrich *et al.* 2014, Masterarbeit Alexandra Meyer).

Die jeweiligen Plasmid-Konstrukte wurden in den Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus® (DE3)-RP transformiert und als Vorkultur unter Zugabe von Kanamycin und Chloramphenicol über Nacht schüttelnd bei 37°C angezogen. Die Hauptkultur wurden mit 1 % Vorkultur angeimpft und ohne Antibiotikazugabe bis zu einer optischen Dichte von ca. OD<sub>600</sub> = 1 angezogen. Die Induktion der Expression erfolgte mit 1 mM IPTG. Die Flüssigkultur wurde auf einem Rotationsschüttler (GFL-3005, Hilab) bei 150 rpm für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 6000 rpm (SORVALL RC 6 Plus, Rotor: SLC 3000) und 6°C sedimentiert und das resultierende Zellpellet in flüssigem Stickstoff weggefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C.

Bei der Reinigung der Squid-p32-Varianten wurden die Zellen auf Eis in NiNTA-Puffer A gelöst und für 2 h mit 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich) und 0.5 mg/ml Lysozym (Sigma-Aldrich) inkubiert und gelegentlich gemischt. Die Zellen wurden mechanisch mit einer French Press (Gaulin Homogenisator, APV Homogenisator GmbH) aufgeschlossen und bei 17500 rpm für 1.5 h bei 4°C zentrifugiert (SORVALL RC 6 Plus, Rotor: Fiberlite F21-8x50y Thermo Scientific). Die lösliche Fraktion wurde zunächst mit Hilfe einer Peristaltik-Pumpe auf die 2 x 5 ml NiNTA-Affinitätssäulen (HisTrap™ HP, GE Healthcare) geladen. Für alle weiteren Reinigungsschritte wurden die Säulen an die FPLC-Anlage (GE Healthcare) angeschlossen. Zunächst wurden die Säulen mit NiNTA Puffer A gewaschen und später das Fusionsprotein mit NiNTA Puffer B mittels steigendem Imidazolgradienten eluiert. Dabei wurde ein Gradient von 0 - 100 % Puffer B in 50 min bei einer Flussrate von 1 ml/min genutzt. Die Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

NiNTA:	Puffer A:	20 mM Tris-HCl 1 M NaCl 30 mM Imidazol 10 % Glycerin (v/v) pH 7.5	Puffer B:	20 mM Tris-HCl 0.5 M NaCl 500 mM Imidazol 10 % Glycerin (v/v) pH 7.5
--------	-----------	---	-----------	--

Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit Heparin Puffer A 1:2 verdünnt. Anschließend wurde der SUMO-tag mit 0.1 % (v/v) SUMO-Protease (AG Behrens) für 30 min im Kühlschrank abgespalten. Die Elutionsfraktionen wurden weiter mit Heparin Puffer A verdünnt bis eine Salzkonzentration von ca. 150 mM NaCl eingestellt wurde, damit das Protein effizient an die Heparin-Säulen binden kann. Anschließend wurde das Protein über eine Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie (HiTrap Heparin HP, 5 ml, GE Healthcare) weiter aufgereinigt. Zunächst wurden die 2 x 5 ml Säulen mit Heparin Puffer A und 15 % Heparin Puffer B gewaschen und anschließend mit Heparin Puffer B mit steigender NaCl-Konzentration eluiert. Dabei wurde ein Gradient verwendet von 15 - 70 % Puffer B in 45 min bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Puffer setzten sich aus folgenden Substanzen zusammen:

Heparin-Säule:	Puffer A:	20 mM Tris-HCl 1 mM TCEP  pH 7.6	Puffer B:	20 mM Tris-HCl 1 M NaCl 1 mM TCEP pH 7.6
----------------	-----------	---	-----------	---

Abschließend wurde eine Größenausschlusschromatographie über eine Gelfiltrationssäule (HiLoad™ 16/60 Superdex 75™, GE Healthcare) durchgeführt, um monomere Proteinfractionen von Oligomeren zu trennen.

Der dabei verwendete Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

Gelfiltrationspuffer: 20 mM Tris-HCl  
 150 mM KCl  
 1 mM TCEP  
 pH 7.6

Das resultierende Protein wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Zellextrakten wurde durch photometrische Messung der Probe nach Bradford (1976) in einem Bradfordreagenz (Roti®-Quant 5x Konzentrat, Carl Roth) bei einer Wellenlänge von 595 nm an einem Photospektrometer (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt. Ein Ansatz beinhaltete 250 µl 1 x Bradfordreagenz, in welches 1-5 µl Probe eingesetzt wurde. Das Gemisch wurde für 5 min inkubiert und anschließend gemessen. Die Eichgerade zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde mit Verdünnung einer 10 mg/ml BSA-Stammlösung (NEB) erstellt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von rekombinant gereinigten Proteinen wurde ein Absorptionsspektrum am UV/VIS Spektrometer V-550 (JASCO) gemessen. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes konnte die Proteinkonzentration nach folgender Gleichung ermittelt werden:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

E = Absorption bei 280 nm

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )

c = Proteinkonzentration (M)

d = optische Weglänge (cm)

Der Koeffizient  $OD_{280}/OD_{260}$  gibt Aufschluss über Verunreinigungen des Proteins mit Nukleinsäuren.

### 2.7.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die analytische Auftrennung von Proteinen wurde ein diskontinuierliches Gelsystem nach Laemmli 1970 verwendet. Die Elektrophorese erfolgte unter denaturierenden Bedingungen. Die Gellösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Trenngel: 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8  
 10 % Acrylamid (Rotiphorese 30, Carl Roth)  
 0.1 % (w/v) SDS  
 0.125 % (w/v) APS  
 0.25 % (v/v) TEMED

Sammelgel: 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8  
4 % Acrylamid (Rotiphorese 30, Carl Roth)  
0.05 % (w/v) SDS  
0.07 % (w/v) APS  
0.3 % (v/v) TEMED

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris  
0.19 M Glycin  
0.1 % (w/v) SDS  
pH 8.3

Vor dem Auftragen der Proteinproben wurden diese mit 2 x SDS-Ladepuffer (10 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20 % (v/v) Glycerin, 0.01 % (w/v) Bromphenolblau, 6 % (w/v) SDS, 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt und für 3 min bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte pro Gel bei maximaler Spannung und bei einer Stromstärke von 25 - 35 mA (Consort EV233 *Electrophoresis Power Supply*, Sigma-Aldrich).

#### 2.7.4. Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteinbanden wurden die Gele nach der Elektrophorese in Coomassie-Färbelösung [0.2 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250, 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure] für 20 min bei Raumtemperatur schüttelnd angefärbt. Der Hintergrund wurde mit 7%iger Essigsäure entfärbt.

#### 2.7.5. FLAG-Immunpräzipitation

Das für diesen Versuch verwendete Sindbis-Expressionssystem (Thermo Fisher Scientific) ist ein transientes Expressionssystem für eukaryotische Zelllinien. Die RNA enthält 5'terminal eine für den FLAG-tag kodierende Sequenz. Die Mosquitozellen wurden wie unter 2.4.6. beschrieben mit 3  $\mu$ g rekombinanter Sindbis-Replikon-RNA kodierend jeweils für FLAG-Squid-p30 oder FLAG-Squid-p32 transfiziert. Nach maximal 24 h Inkubation wurden die Zellen geerntet, in 550  $\mu$ l [20 mM HEPES-NaOH, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 % (v/v) NP-40, 1 mM PMSF, pH 7.9] gelöst und für 30 min auf einem Drehrad bei 4°C lysiert. Das resultierende Zelllysate wurde mit 12000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand davon anschließend mit ANTI-FLAG® M2 *Affinity Gel* (Sigma-Aldrich), welches vorher mit IP-Waschpuffer äquilibriert wurde, und 0.1 mg/ml RNase A versetzt. Damit das FLAG-Fusionsprotein an das ANTI-FLAG *Affinity Gel* binden kann, wurde die Mischung über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurde die ANTI-FLAG® M2-Agarose bei 4°C und 5000 g für 1 min sedimentiert und anschließend 5 mal mit 500  $\mu$ l IP-Waschpuffer gewaschen.

Das FLAG-Fusionsprotein wurde durch einstündige Inkubation auf Eis mit 500 ng/ $\mu$ l 3X FLAG<sup>®</sup>-Peptid (Sigma-Aldrich) in IP-Elutionspuffer eluiert. Während der Elution musste die sich schnell absetzende ANTI-FLAG<sup>®</sup> M2-Agarose alle 10 min vorsichtig angestoßen werden. Abschließend wurde die Probe bei 5000 g und 4°C zentrifugiert, um das eluierte Protein von der ANTI-FLAG<sup>®</sup> M2-Agarose zu trennen. Die Überprüfung der Immunpräzipitation sowie Quantifizierung der FLAG-getaggten Proteine wurde mit Western Blot Analyse durchgeführt.

IP-Waschpuffer:	20 mM HEPES-NaOH	IP-Elutionspuffer:	20 mM HEPES-NaOH
	150 mM NaCl		100 mM KCl
	1 mM PMSF		3 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 mM EDTA		0.01 % Tween 20
	1% (v/v) NP-40		pH 7.6
	pH 7.6		

#### 2.7.6. Western Blot

Um die aufgetrennten Proteine spezifisch mittels Antikörperdetektion nachzuweisen findet ein elektrophoretischer Proteintransfer von dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran statt. Die Membran (Protran, Whatman GmbH) und vier Lagen Whatman-Papier (GB005, Whatman GmbH) wurden der Größe des SDS-Polyacrylamidgels angepasst und zuvor in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurden 2 Lagen Whatman-Papier, die Nitrozellulosemembran, das Proteingel und erneut 2 Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei in einer Blotapparatur (V10SDB und V20SDB, biostep GmbH) übereinander angeordnet. Der Proteintransfer erfolgte bei konstanter Stromstärke (0.8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche) für 1.5 - 2 h. Zur Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Membran wurde diese in *blocking*-Lösung, bestehend aus 7.5 % Milchpulver (Sucofin) in TN-Tween-Puffer, über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 2 h mit dem primären Antikörper (verdünnt in TN-Tween-Puffer; 7.5 % Milchpulver) schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächster Schritt wurde die Membran dreimal für 5 min in TN-Tween-Puffer gewaschen. Darauf folgte die lichtgeschützte Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff-markierten sekundären Antikörper (verdünnt in TN-Tween-Puffer; 7.5 % Milchpulver) für 1 h schüttelnd bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran wieder dreimal für 15 min mit TN-Tween-Puffer gewaschen.

Die Detektion der Proteine erfolgte an einem LI-COR Odyssey<sup>®</sup>CLx *Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences GmbH), welches mittels Infrarotdetektor die Infrarotfluoreszenz des sekundären Antikörpers misst. Die Puffer setzten sich aus folgenden Substanzen zusammen:

Transferpuffer: 48 mM Tris  
 39 mM Glycin  
 1.3 mM SDS  
 20 % (v/v) Methanol

TN-Tween: 20 mM Tris-HCl  
 150 mM NaCl  
 0.05 % (v/v) Tween 20  
 pH 7.5

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Antikörper

Name	Verdünnung	Reaktivität	Anbieter
<b>Primäre Antikörper</b>			
<b>Anti-p32</b>	1:5000	Mücke	Eurogentec
<b>Anti-β-Tubulin</b>	1:1000	Maus, Mensch, Fliege, Mücke, u. v. m.	Abcam
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
<b>IRDye<sup>®</sup> 800 CW donkey Anti-rabbit IgG-HRP</b>	1:10000	Kaninchen	LI-COR Biosciences GmbH

### 2.7.7. Analytische Ultrazentrifugation

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Squid-p30 und Squid-p32 wurde eine analytische Ultrazentrifugation von PD Dr. Hauke Lilie (Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg) mit einer BECKMAN Optima XL-A, einem Rotor An50Ti und Doppelsektorzellen (Beckman Coulter) durchgeführt. Der Sedimentationsgleichgewichtslauf erfolgte bei 14000 rpm und 20 °C, sowie einer Proteinkonzentration für Squid-p30 von 12.3 μM und Squid-p32 von 6.8 μM in 20 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 1 mM TCEP, pH 7.6. Das apparente Molekulargewicht der Proteinlösung wurde mit der Svedberg-Gleichung berechnet. Die resultierenden Daten wurden ebenfalls von PD Dr. Hauke Lilie mit Hilfe der Software von Beckman Coulter ausgewertet.

## 2.7.8. Präparation von Zellextrakt

### 2.7.8.1. Präparation von Gesamtzellextrakt

Zur Herstellung eines Gesamtzellextraktes wurden die Mosquitozellen bei 3420 g für 2 min zentrifugiert, mit PBS gewaschen und das resultierende Zellpellet in RIPA-Puffer gelöst. Die Zellen wurden für 5 min auf Eis lysiert und anschließend für 15 min bei 14000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zelllysate für weitere Analysen verwendet werden. Die Proteinkonzentration des Gesamtzellextraktes wurde photometrisch nach Bradford (1976), wie unter 2.7.2. beschrieben, ermittelt.

RIPA-Puffer: 50 mM Tris-HCl  
150 mM NaCl  
1 % (v/v) NP-40  
0.5 % (w/v) Natriumdesoxycholat  
0.1 % (w/v) SDS  
pH 8.0

### 2.7.8.2. Präparation von zytoplasmatischem Zellextrakt

Die Mosquitozellen wurden bei 3420 g für 2 min zentrifugiert, mit PBS gewaschen und das resultierende Zellpellet in 1 x Lyse-Puffer aus dem kommerziellen Kit *Renilla Luciferase Assay System* von Promega gelöst. Das Zelllysate wurde 2 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 12000 g und 4°C für 2 min zentrifugiert. Die Proteinkonzentration des zytoplasmatischen Extraktes wurde photometrisch nach Bradford (1976), wie unter 2.7.2. beschrieben, ermittelt.

## 2.8. Enzymologische Methoden

### 2.8.1. radioaktiver *in vitro* Methylierungs-Assay

Posttranslationale Modifikationen wie Methylierung können die Funktionen von Proteinen regulieren. So auch bei AUF1p45, bei welchem 5 Arginine im RGG/RG-Motiv in humanen Zellen als dimethyliert vorliegen. Die Methylierung führte zu einer Verstärkung der RNA-Chaperon-Aktivität, während die RNA-*annealing*-Aktivität nicht beeinflusst war (Friedrich *et al.* 2016). Um nun zu untersuchen ob die homologen Mosquito-Proteine ebenfalls methyliert in Mosquitozellen vorliegen, wurde ein *in vitro* Methylierungs-Assay durchgeführt. Dabei wurden die C6/36-Zellen sowie die U4.4-Zellen untersucht.



Als Argininmethyltransferase wurde die humane *protein arginine N-methyltransferase 1* (PRMT1) verwendet, welche als Substrat bevorzugt Arginine in einem RGG/RG-Motiv monomethyliert oder asymmetrisch dimethyliert (McBride und Silver 2001). Zur Detektion der Methylierung wurde [ $^{14}\text{C}$ ]adenosylmethionin (60 mCi/mmol, GE Healthcare) als Methylendonor genutzt. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

x pmol Protein	x $\mu\text{l}$
10 x Reaktions-Puffer	1 $\mu\text{l}$
5 pmol PRMT1	1 $\mu\text{l}$
10 mM DTT	0.5 $\mu\text{l}$
10 mg/ml BSA	0.2 $\mu\text{l}$
360 mM $^{14}\text{C}$ -S-adenosylmethionin	1 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}_{\text{Sigma}}$	ad 10 $\mu\text{l}$

10 x Reaktions-Puffer: 500 mM HEPES-NaOH  
 100 mM KCl  
 50 mM  $\text{MgCl}_2$   
 pH 8

Durch Zugabe von dem zu testenden Protein wurde die Reaktion gestartet und für 2 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 1 Volumen 2 x SDS-Ladepuffer gestoppt. Die Proben wurden für 3 min bei 95°C erhitzt und danach auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel wie unter 2.7.3. beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Darauf folgte die 3-malige, schüttelnde Inkubation des Polyacrylamidgels in Fixierlösung (10 % (v/v) Essigsäure; 10 % (v/v) Methanol) für je 10 min. Abschließend wurde das Gel auf Whatman<sup>®</sup> Papier vakuumgetrocknet (Unigeldryer 3545 D, UniEquip). Das getrocknete Polyacrylamidgel wurde unter einem *Storage-Phosphor-Screen* (GE Healthcare) über mindestens 2 Tage exponiert. Die Signale wurden an einem *Phosphor Imager* (Molecular Dynamics, STORM 860) visualisiert und mit Hilfe des Softwareprogramms Image Quant 5.0 (GE Healthcare) die Bandenintensität quantifiziert.

### 2.8.2. *in vitro* RNA-abhängiger RNA-Polymerase-Assay

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der radioaktiven Detektion von *de novo* synthetisierter (-)-Strang-RNA, ausgehend von einer subgenomischen *template*-RNA. Mit diesem Assay ist es möglich den stimulatorischen Effekt der Squid-Proteine auf die (-)-RNA-Strang-Synthese des West-Nil-Virus zu testen. Die neu synthetisierte RNA wurde mit [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] CTP-Markierung detektiert. Als RNA-Polymerase diente das Nichtstrukturprotein 5 (NS5) des West-Nil-Virus (AG Behrens).

Die Reaktion erfolgte in 50 mM HEPES-NaOH, 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.5 mM MnCl<sub>2</sub> bei pH 8. Zusätzlich wurde 500 µM rATP, rGTP, rUTP, 0.1 µM rCTP, 10 µCi [α-<sup>32</sup>P] CTP, 10 nM *template*-RNA, 15 nM NS5 und 200 nM Protein pro Ansatz hinzugegeben. Die Reaktionsansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert, anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>Sigma</sub> auf 200 µl aufgefüllt und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)) aufgereinigt. Es folgte eine Fällung des wässrigen Überstandes mit 2.36 Vol 100%igem Ethanol und 0.18 Vol 6 M Ammoniumacetat bei -20°C für mindestens 30 min und ein halbstündiger Zentrifugationsschritt bei 16060 x g. Die RNA-Proben wurden mit 70 % Ethanol gewaschen, in 20 µl Formamid-Ladepuffer gelöst und für 3 min bei 95°C erhitzt. Die RNA wurde elektrophoretisch auf einem 5%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel, wie unter 2.5.4. beschrieben, aufgetrennt. Das getrocknete Polyacrylamidgel wurde unter einem *Storage-Phosphor-Screen* (GE Healthcare) über Nacht exponiert und am nächsten Tag wurden die Signale an einem *Phosphor Imager* (Typhoon Trio *Variable Mode Imager*, GE Healthcare) visualisiert und mit Hilfe des Softwareprogramms Image Quant 5.0 (GE Healthcare) die Bandenintensität quantifiziert. Bei Bestimmung des Stimulationsfaktors des jeweiligen Proteins wurde das Signal der Pufferkontrolle (Reaktion ohne Zugabe von Protein, nur Lagerpuffer) auf 1 gesetzt.

### 2.8.3. Messung der Renilla-Luziferase-Aktivität

Zur Bestimmung der Translation und Replikation der West-Nil-Virus-RNA wurde ein WNVRLuc-Replikon genutzt, welches eine integrierte Renilla-Luziferase-Sequenz beinhaltet (Friedrich *et al.* 2014). Nach der Transfektion wird die Renilla-Luziferase als Teil des Polyproteins translatiert, deren Aktivität gemessen werden kann. Die Renilla-Luziferase-Aktivität 4 h nach Transfektion entspricht dabei der Translation, 24-120 h nach Transfektion wiederum der Replikation der viralen Replikon-RNA. Dieser Assay wurde genutzt, um den Effekt der Squid-Proteine auf die virale Replikation in Mosquitozellen zu untersuchen. Dafür wurden die Proteine siRNA-vermittelt depletiert und den Einfluss auf die Replikation untersucht. Dies wurde wie unter 2.4.3. beschrieben durchgeführt. Der zytoplasmatische Zellextrakt wurde mit dem kommerziellen Kit *Renilla Luziferase Assay System* von Promega nach Angaben des Herstellers analysiert. Die *relative light units* (RLU) wurden an einem Luminometer (GloMax<sup>®</sup> 20/20, Promega) quantifiziert.

#### 2.8.4. Bestimmung der RNA-Bindeaffinität

Zur Bestimmung der RNA-Bindeaffinitäten der Mosquito-Proteine und der Squid-p32-Varianten wurden die Proteine in ansteigender Konzentration zu 5'-FAM-EX-gelabelter RNA (5 - 25 nM) in Assay-Puffer [50 mM HEPES/NaOH, pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>] hinzugegeben. Das Fluoreszenz-Signal wurde an einem FluoroMax-4 Spektrofluorometer (Jobin Yvon) bei 22°C verfolgt. Die Anregung erfolgte bei 491 nm und einer Spaltbreite von 0.5 nm, die Emission bei 515 nm und einer Spaltbreite von 10 nm. Das Signal der 5'-FAM-EX-gelabelten RNA wurde auf die Volumenveränderung korrigiert und die normalisierten Fluoreszenzsignale gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen. Die Daten wurden mit einem *single-site binding model* nach Gleichung 1 (Meyer *et al.* 2019) mit dem Programm KaleidaGraph™ (Synergy software) analysiert und so die resultierenden Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) ermittelt.

$$\Delta F = 1 + \gamma \cdot \left[ \frac{(b + c + K_D) - \sqrt{(b + c + K_D)^2 - 4 \cdot b \cdot c}}{2 \cdot b} \right]$$

(Gleichung 1)

$\Delta F$  - Änderung der relativen Fluoreszenzamplitude

$\gamma$  - Signal-Amplitude

$b$  - Gesamtkonzentration der RNA

$c$  - Gesamtkonzentration des Proteins

$K_D$  – Dissoziationskonstante

#### 2.8.5. Fluorimetrische RNA-RNA-Interaktions-Assays

##### 2.8.5.1. Fluorimetrischer RNA-Destabilisierungs-Assay

Dieser Assay ist der Umstrukturierung der UTRs während der Zyklisierungsreaktion des flaviviralen Genoms nachempfunden. Dabei kommt es aufgrund von komplementären RNA-RNA-Basenpaarungen zu einer Umgestaltung der 3'- und 5'UTR, welche in eine für die flavivirale Replikation essentielle Zyklisierung des Genoms resultiert. Basierend darauf kann mit Hilfe des fluorimetrischen RNA-Destabilisierungs-Assays die Fähigkeit von Proteinen zur Destabilisierung der 3'SL-RNA und somit zur Beschleunigung der Zyklisierungsreaktion analysiert werden. AUF1p45 besitzt eine RNA-Chaperon-Aktivität, welche es ermöglicht die Destabilisierung des 3'SL stark zu beschleunigen (Friedrich *et al.* 2014).

Um zu testen, ob die Mosquito-Proteine ebenso wie AUF1p45 in der Lage sind den 3'SL der WNV-RNA zu destabilisieren wurde dieser Assay durchgeführt.

Um die Reaktion verfolgen zu können wurde eine 5'-Cy5 markierte 3'SL<sup>trunc</sup>-RNA (entspricht dem unteren Teil des WNV 3'SL) genutzt, welche am 3'-Ende zusätzlich einen sogenannten *black-hole-Quencher* (BHQ) besitzt. Befinden sich der *black-hole-Quencher* und das Fluorophor Cy5 in räumlicher Nähe, wie es bei der nativen Form des *stem loops* der Fall ist, wird das Fluoreszenzsignal durch den BHQ gelöscht und ist nur schwach detektierbar. Die zweite RNA ist unmarkiert und enthält die 5'UAR-Sequenz. Findet eine Interaktion der beiden RNAs statt, wird durch die Umstrukturierung des 3' *stem loops* ein räumlicher Abstand zwischen dem BHQ und dem Cy5 induziert und das Fluoreszenzsignal steigt an.

Die in diesem Assay verwendeten RNA-Oligonukleotide 3'SL<sup>trunc</sup> und 5'UAR wurden von IBA bezogen (Sequenz in Tabelle 7). Die fluorimetrische RNA-RNA-Interaktion wurde in Assay-Puffer [50 mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>] an einem FluoroMax-4 Spektrofluorometer (Jobin Yvon) bei 22°C gemessen. Die Anregung erfolgte bei 643 nm, die Emission bei 667 nm, jeweils mit 10 nm Spaltbreite und einer Messung der Fluoreszenzintensität jede Sekunde. Zunächst wurden 10 nM 5'-Cy5-markierte 3'SL<sup>trunc</sup>-RNA mit dem zu untersuchenden Protein präinkubiert und das resultierende Fluoreszenzsignal für 100 s gemessen. Dabei wurde die Konzentration des Proteins pro Messung erhöht. Die Reaktion wurde mit Zugabe von 100 nM 5'UAR-RNA gestartet und für mindestens 400 s verfolgt. Es wurde pro Messreihe eine Kontrollreaktion ohne Protein (nur unter Zugabe von Assay-Puffer) durchgeführt. Die normalisierten Fluoreszenz-Signale wurden gegen die Zeit aufgetragen und nach einer Reaktion erster Ordnung (für Reaktionen ohne Protein) und nach einer Reaktion zweiter Ordnung (für Reaktionen mit Protein) mit dem Programm KaleidaGraph™ (Synergy software) analysiert und so die Geschwindigkeitskonstante  $k_{obs}$  ermittelt.

$$1. \text{ Ordnung } \Delta F = F_{\text{offset}} + F_{\text{max}} \cdot (1 - \exp(-k_{\text{obs}} \cdot t)) \quad (\text{Gleichung 2})$$

$$2. \text{ Ordnung } \Delta F = F_{\text{offset}} + F_{\text{max}} \cdot (1 - 1/(k_{\text{obs}} \cdot t + 1)) \quad (\text{Gleichung 3})$$

$\Delta F$  - Änderung der relativen Fluoreszenzamplitude

$F_{\text{offset}}$  - Fluoreszenzintensität am Startpunkt der Reaktion

$F_{\text{max}}$  - maximale Signalamplitude

$k_{\text{obs}}$  - beobachtete Geschwindigkeitskonstante

t - Zeit

### 2.8.5.2. Fluorimetrischer RNA-*annealing*-Assay

Dieser Assay ist der Hybridisierung der komplementären Zyklisierungselemente 5'CS- und 3'CS-Sequenz in den UTRs während der flaviviralen Zyklisierungsreaktion nachempfunden. Mit Hilfe dieser Methode kann untersucht werden, welche Proteine eine RNA-*annealing*-Aktivität aufweisen und somit die Hybridisierung der komplementären RNA-Sequenzen unterstützen. Da das humane Protein AUF1p45 eine RNA-*annealing*-Aktivität besitzt, mit welcher es die Hybridisierung der komplementären Zyklisierungselemente fördert (Friedrich *et al.* 2014), war es nun von Interesse die homologen Mosquito-Proteine und die Squid-p32-Alanin-Varianten auf eine RNA-*annealing*-Aktivität zu testen. Um die Reaktion verfolgen zu können wurde eine Cy3 markierte 3'CS-RNA und eine Cy5 markierte 5'CS-RNA genutzt, deren Interaktion zu einem messbaren Förster-Resonanzenergietransfer-Signal (FRET) führt. Die in diesem Assay verwendeten RNA-Oligonukleotide wurden von IBA bezogen (Sequenzen in Tabelle 7). Die fluorimetrische RNA-RNA-Interaktion wurde in Assay-Puffer [50 mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>] an einem FluoroMax-4 Spektrofluorometer (Jobin Yvon) bei 22°C gemessen. Die Anregung erfolgte bei 535 nm und einer Spaltbreite von 5 nm, die Emission bei 680 nm und einer Spaltbreite von 10 nm. Abweichend zum RNA-Destabilisierungs-Assay wurde in diesem Assay die fluoreszenzmarkierten RNAs in gleicher Konzentration von 10 nM in die Reaktion eingesetzt. Des Weiteren wurden alle Reaktionen, auch Reaktionen ohne Protein, mit einer Reaktion zweiter Ordnung analysiert (Gleichung 3). Es wurden 400 s der Reaktion bzw. so lange wie der *Fit* den Reaktionsverlauf optimal beschrieb, ausgewertet. Alle weiteren Mess- und Auswertungsbedingungen entsprechen den Ausführungen unter 2.8.5.1.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Fluoreszenz-markierten RNAs

Name	5'→3'-Sequenz	Beschreibung
<b>AU/GU-reiche RNA</b>	UAUUUAGUGGUGUUAG	FAM-EX-5' gelabelte AU/GU-reiche RNA
<b>ssRNA</b>	CUAAGAUGCUCGCGUC	FAM-EX-5' gelabelte <i>random</i> RNA
<b>3'SL<sup>trunc</sup></b>	Cy5- AGAUCUUCUGCUCUGCACAAUGGUGCGAG AACACAGGAUCU-3'BHQ	Cy5 gelabelt, RNA entspricht dem unteren Teil des WNV 3'SL, zusätzlich BHQ am 3'-Ende
<b>5'UAR</b>	UCUUAGCACGAAGAUCU	unmarkierte UAR-Sequenz-RNA
<b>3'CS Cy3</b>	Cy3-AGCAUAUUGACACC	Cy3 gelabelte CS-RNA
<b>5'CS Cy5</b>	Cy5-UGUCAUAUUGCUAA	Cy5 gelabelte CS-RNA

### 2.8.6. Circular dichroismus

Mit Hilfe des Circular dichroismus (CD) von Molekülen mit einem oder mehreren chiralen (optisch aktiven) Chromophoren können Aussagen über Sekundärstrukturelemente von Proteinen getroffen werden. Dies ist möglich da verschiedene Strukturelemente wie  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter, als auch *random-coil*-Strukturen spezifische CD-Spektren aufweisen. Des Weiteren kann analysiert werden, ob ein rekombinant gereinigtes Protein korrekt gefaltet ist oder ob eine Mutation eines Proteins dessen Konformation oder Stabilität verändert (Greenfield 2006). So konnte untersucht werden, ob die Substitution der Tryptophane in Squid-p32 zu einer veränderten Sekundärstruktur führt. Gemessen wird hierfür der ferne UV-Bereich (190 nm - 250 nm), welcher Aufschluss über den Anteil an Sekundärstrukturelementen gibt. Der nahe UV-Bereich (250 nm - 300 nm) wird für Tertiärstrukturanalysen von aromatischen Seitenketten genutzt. Die Analyse des Circular dichroismus der Proteine wurde an einem JASCO J-810 Spektropolarimeter bei 20°C in einer HELMA-Küvette (1 mm optische Weglänge) durchgeführt. Die Proteine lagen in einer Konzentration von 2  $\mu$ M in 20 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 1 mM TCEP, pH 7.6 vor. Die Spektren Manager I Software (JASCO) wurde genutzt um die gemessenen Proteinspektren mit einem Pufferspektrum zu korrigieren und zu glätten. Die Elliptizität wurde wie folgt berechnet:

$$[\theta]MRW = \theta \cdot \Phi \cdot [MRW] \cdot 3300 / (c \cdot d)$$

$\theta$  = gemessene Elliptizität (mdeg)

$[\theta]MRW$  = *mean residue weight ellipticity*

c = Proteinkonzentration (mg/ml)

d = optische Weglänge (cm)

$\Phi$  = Eichfaktor des Geräts (142.5/5610051)

$[MRW]$  = mittleres Molekulargewicht einer Aminosäure des Proteins

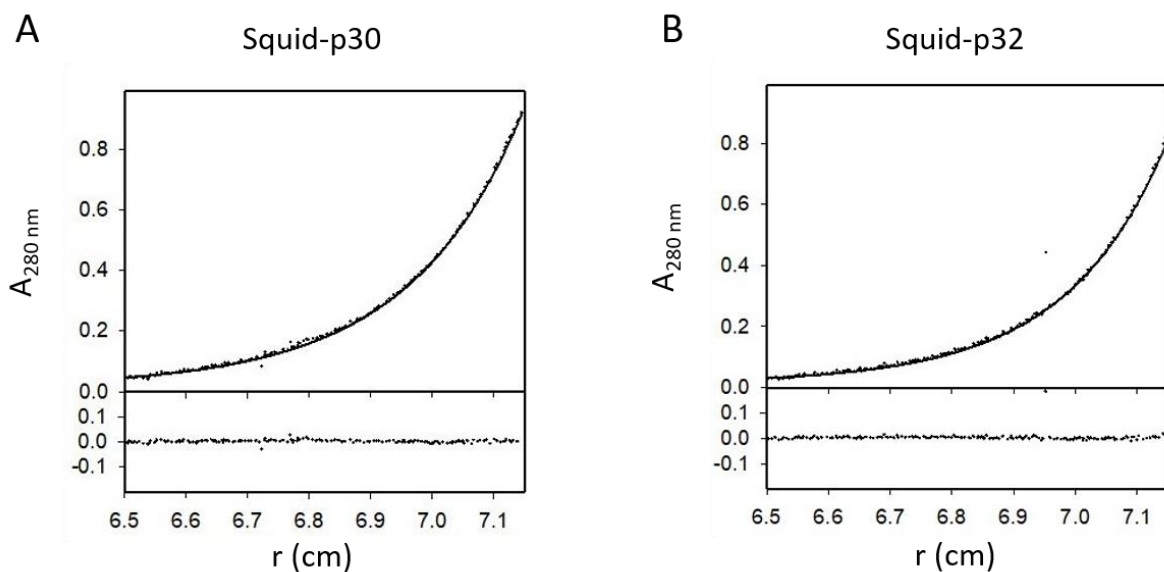
### III. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung der Mosquito-Proteine Squid-p30 und Squid-p32

Das Protein AUF1p45 ist ein flaviviraler Wirtsfaktor in humanen Zellen (Friedrich *et al.* 2014, Friedrich *et al.* 2018). In vorangegangenen Arbeiten (Masterarbeit Alexandra Meyer) konnten zwei homologe Proteine in *A. albopictus* identifiziert und erste Daten generiert werden. Ziel war es nun die beiden Mosquito-Proteine Squid-p30 und Squid-p32 näher zu charakterisieren.

##### 3.1.1. Squid-p30 und Squid-p32 liegen als Monomer vor

Für das humane Protein AUF1 ist bekannt, dass es als Monomer vorliegt (Friedrich *et al.* 2014, unveröffentlichte Daten (Julian Bender, AG Bacia, Halle)). Um herauszufinden, in welcher Form die Squid-Proteine vorliegen, wurde das Molekulargewicht der Proteine mittels analytischer Ultrazentrifugation analysiert (durchgeführt von PD Dr. Hauke Lilie, Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg, Abb. 6A, B). Dabei kam das experimentell ermittelte Molekulargewicht von Squid-p30 mit 30.6 kDa, dem theoretischen Molekulargewicht von 29.9 kDa sehr nah. Für Squid-p32 stimmt das experimentell ermittelte Molekulargewicht von 33.3 kDa ebenfalls gut mit dem theoretischen Molekulargewicht von 32.3 kDa überein. Somit liegen beide Mosquito-Proteine, ebenso wie das humane AUF1, als Monomer vor.



C

Protein	theoretisches M <sub>r</sub> (kDa)	experimentelles M <sub>r</sub> (kDa)
Squid-p32	32.3	33.3
Squid-p30	29.9	30.6

**Abbildung 6: Die Mosquito-Proteine Squid-p30 und Squid-p32 liegen als Monomer vor.**

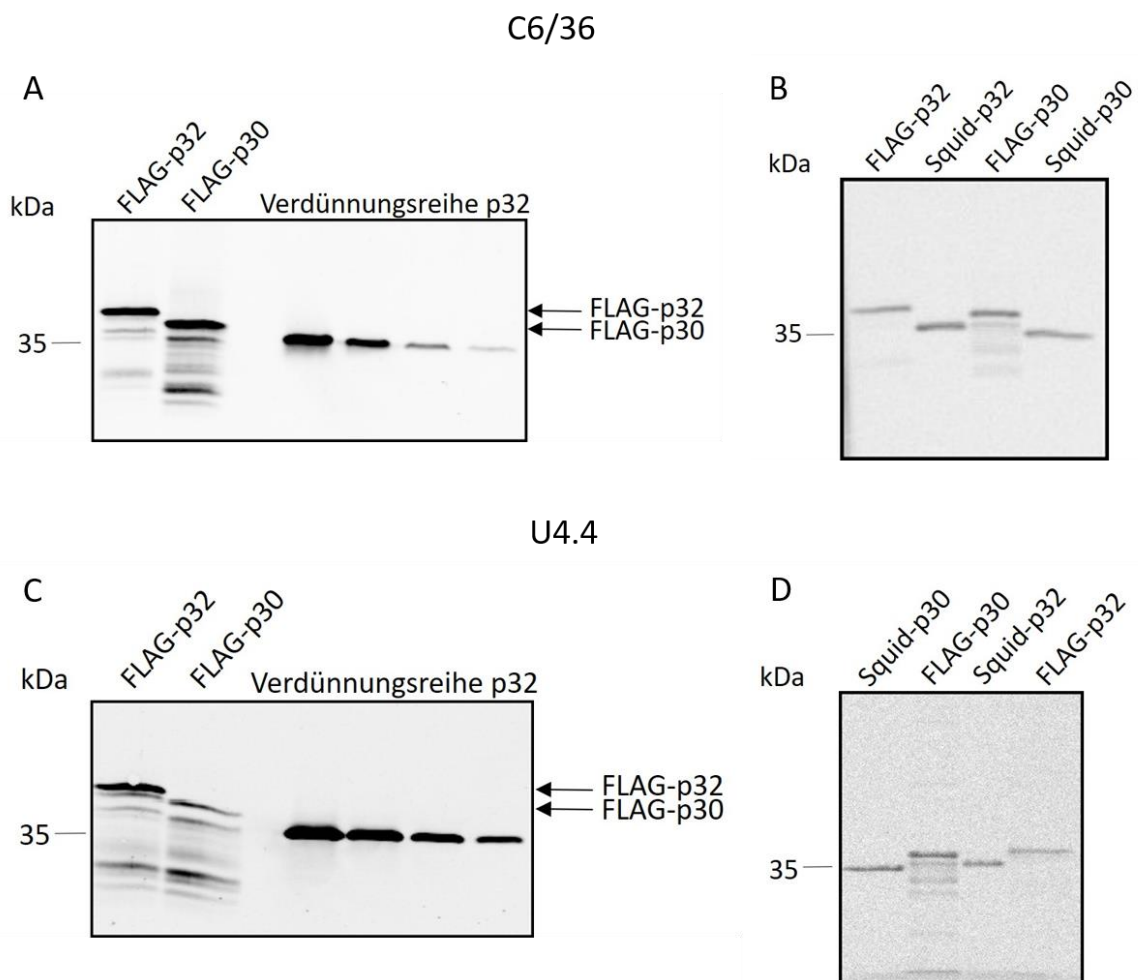
(A) Darstellung der analytischen Ultrazentrifugation von Squid-p30. Der Sedimentationsgleichgewichtslauf erfolgte bei 14000 rpm und 20°C, sowie einer Proteinkonzentration von 12.3 µM in 20 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 1 mM TCEP, pH 7.6. Im oberen Teil der Grafik sind die experimentell ermittelten Datenpunkte bei 280 nm in Abhängigkeit von dem Radius (r) dargestellt. Diese wurden mit der Svedberg-Gleichung gefittet. Der untere Teil zeigt die Abweichung der Daten von der Regressionsanalyse. (B) Darstellung der analytischen Ultrazentrifugation von Squid-p32. Der Sedimentationsgleichgewichtslauf erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 6.8 µM. Die restliche Analyse fand unter den gleichen Bedingungen wie unter (A) beschrieben statt. (C) Tabelle mit den theoretischen und experimentell ermittelten Molekulargewichten (M<sub>r</sub>) von Squid-p32 und Squid-p30. Das apparente Molekulargewicht der Proteinlösung wurde mit der Svedberg-Gleichung berechnet.

**3.1.2. Immunpräzipitiertes FLAG-Squid-p30 und FLAG-Squid-p32 aus Mosquitozellen ist nicht methyliert**

Bei AUF1p45 liegen fünf Arginine im RGG/RG-Motiv in humanen Zellen als dimethyliert vor. Diese Methylierung führte zu einer Verstärkung der RNA-Chaperon-Aktivität, während die RNA-*annealing*-Aktivität nicht beeinflusst war (Friedrich *et al.* 2016). Da Squid-p30 und Squid-p32 analog zu AUF1p45 in der C-terminalen Region ein RGG/RG-Motiv besitzen, war es von Interesse zu untersuchen, ob sie in Mosquitozellen ebenfalls methyliert vorliegen. Eine Analyse in C6/36-Zellen wurde bereits in der Masterarbeit von Alexandra Meyer durchgeführt und hier nochmal validiert. Zusätzlich wurden U4.4-Zellen analysiert. Um aus dem authentischen System stammende Proteine zu untersuchen, wurden die Squid-Proteine als FLAG-getaggte Varianten mit Hilfe des Sindbis-Expressionssystems in C6/36- und U4.4-Zellen transient hergestellt. Dafür wurden die Mosquitozellen mit Hilfe von Elektroporation mit rekombinanter Sindbis-RNA transfiziert und die synthetisierten Proteine unter Anwendung einer FLAG-Immunpräzipitation gereinigt. Die isolierten FLAG-Fusionsproteine wurden mittels Western Blot Analyse nachgewiesen (Abb. 7A, 7C). Zur Quantifizierung der immunpräzipitierten Proteine wurde eine Verdünnungsreihe von rekombinantem Squid-p32 mit bekannter Konzentration mitgeführt. Die Intensität der visualisierten Banden wurde in einem Diagramm gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und mit der resultierenden linearen Formel die annähernden Proteinkonzentrationen von FLAG-Squid-p30 und FLAG-Squid-p30 berechnet. Dabei ergab sich für beide Squid-Proteine aus C6/36-Zellen eine Konzentration von 0.5 pmol/µl.



Für FLAG-Squid-p32 aus U4.4-Zellen konnten 0.08 pmol/ $\mu$ l und für FLAG-Squid-p30 0.075 pmol/ $\mu$ l berechnet werden. Zur Bestimmung des Methylierungsstatus wurde in folgenden ein *in vitro* Methylierungsassay durchgeführt, für den je Reaktion 1 pmol FLAG-Fusionsprotein eingesetzt wurden. Zusätzlich wurde als Kontrolle die gleiche Menge rekombinant gereinigter Squid-Proteine eingesetzt, welche nicht-methyliert vorliegen sollten, da in *E. coli*-Zellen keine Argininmethylierung von Proteinen stattfindet. Zu sehen ist, dass sowohl die FLAG-Fusionsproteine aus C6/36-Zellen, als auch aus U4.4-Zellen *in vitro* von der eingesetzten humanen Methyltransferase PRTM1 methyliert werden. Dabei werden beide rekombinante Squid-Proteine ebenso effizient methyliert (Abb. 7B, 7D). Somit kann geschlussfolgert werden, dass Squid-p30 und Squid-p32 in C6/36-Zellen und U4.4-Zellen als nicht-methylierte Proteine vorliegen. Des Weiteren konnte bei den FLAG-Fusionsproteinen, insbesondere bei FLAG-Squid-p30, zusätzliche Proteinbanden detektiert werden, welche vermutlich Abbauprodukte darstellen (Abb. 7A-D).



**Abbildung 7: FLAG-p30 und FLAG-p32 aus Mosquitozellen sind nicht methyliert.** (A) 10 µl des immunpräzipitierten FLAG-p32 und FLAG-p30 aus C6/36-Zellen wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit  $\alpha$ -p32 Antikörper detektiert. Zusätzlich wurde zur Quantifizierung der Proteinmenge eine Verdünnungsreihe von rekombinantem Squid-p32 mit bekannter Konzentration aufgetrennt. Auftragung mit absteigender Konzentration: 4 pmol, 2 pmol, 1 pmol und 0.5 pmol Squid-p32. (B) Je 1 pmol FLAG-p32 und FLAG-p30 gereinigt aus C6/36-Zellen und Squid-p32 und Squid-p30 gereinigt aus *E. coli* wurden von 5 pmol PRMT1 methyliert. Nach 2 h wurde die Reaktion abgestoppt und in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktiven Signale wurden mittels Autoradiographie detektiert. (C) 10 µl des immunpräzipitierten FLAG-p32 und FLAG-p30 aus U4.4-Zellen wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis fand unter den gleichen Bedingungen wie unter (A) beschrieben statt. (D) Je 1 pmol FLAG-p32 und FLAG-p30 gereinigt aus U4.4-Zellen und Squid-p32 und Squid-p30 gereinigt aus *E. coli* wurden von 5 pmol PRMT1 methyliert. Der Reaktionsablauf und die Analyse fanden unter den gleichen Bedingungen wie unter (B) beschrieben statt.

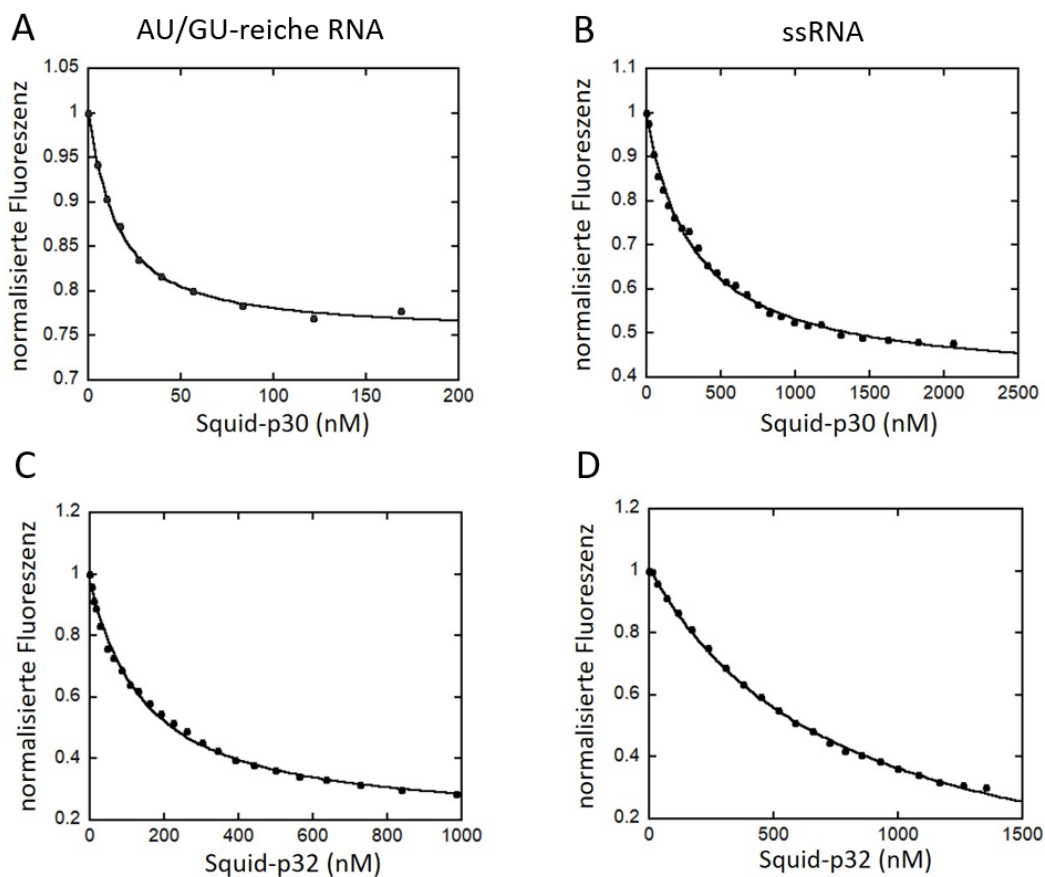
### 3.1.3. Squid-p30 zeigt eine zehnfach höhere RNA-Bindeaffinität zu AU/GU-reicher RNA als Squid-p32

Für die humanen AUF1-Proteine wurden bereits starke Bindeaffinitäten zu AU/GU-reicher RNA beschrieben (DeMaria und Brewer 1996, Friedrich *et al.* 2014, unveröffentlichte Daten Susann Friedrich). Um nun zu untersuchen, ob die Mosquito-Proteine ebenso eine starke Affinität zu AU/GU-reicher RNA aufweisen, wurde eine RNA-Bindungsstudie mit einer AU/GU-reichen RNA durchgeführt. Dafür wurde eine natürliche Ziel-RNA von AUF1p45 eingesetzt, welche folgende Kriterien erfüllt: Sie besteht größtenteils aus Uracil und Guanin, da AUF1p45 vorrangig U-/GU-reiche Sequenzen der 3'UTR von mRNAs und nicht-kodierenden RNAs erkennt (Yoon *et al.* 2014). Ebenso entspricht die verwendete RNA einem Teil der AU-reichen Region des WNV, welche eine hoch-affine Bindestelle von AUF1p45 ist (Friedrich *et al.* 2014). Zusätzlich enthält sie zwei UUAG-Motive, welche von AUF1p45 spezifisch erkannt werden (Kajita *et al.* 1995).

Um nun zu untersuchen, ob die Mosquito-Proteine ebenfalls eine hohe Affinität zu AU/GU-reichen Sequenzen besitzen, wurde ein RNA-Bindungs-Assay mit der spezifischen AU/GU-reichen RNA (Abb. 8A, B) im Vergleich zu einer unspezifischen RNA (ssRNA) durchgeführt (Abb. 8C, D). Die Sequenz der unspezifischen RNA ist zufällig zusammengestellt. Des Weiteren sind beide RNAs 16 Nukleotide lang und einzelsträngig.

Die zu untersuchenden Proteine wurden in ansteigender Konzentration zu den 5'-FAM-EX-gelabelten RNAs hinzugegeben und die Abnahme des Fluoreszenzsignals gemessen. Die resultierenden Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 8 dargestellt. Dabei zeigte das humane Protein AUF1p45 eine achtfach höhere ( $K_D = 1.6$  nM) Affinität zu der spezifischen AU/GU-reichen RNA als Squid-p30 ( $K_D = 13$  nM). Verglichen mit Squid-p32 ( $K_D = 130$  nM) zeigte AUF1p45 eine sogar fast hundertfach höhere Affinität.

Die RNA-Bindung von AUF1p45 zu der ssRNA ( $K_D=157$ ) ist ebenfalls höher, aber nur um Faktor 1.5 verglichen mit Squid-p30 ( $K_D= 250$  nM) und Faktor 4 verglichen mit Squid-p32 ( $K_D=680$  nM). Werden die Squid-Proteine untereinander verglichen, besitzt Squid-p30 eine zehnfach höhere Affinität zu der spezifischen AU/GU-reichen RNA, als Squid-p32. Die RNA-Bindung zu der ssRNA ist im Gegensatz dazu bei Squid-p30 nur leicht erhöht (um Faktor zwei). Vergleicht man die Affinitäten der Squid-Proteine zwischen den verwendeten RNAs, ist auffällig, dass die spezifische AU/GU-reiche RNA von beiden Proteinen mit deutlich höherer Affinität gebunden wird, als die ssRNA. So zeigt Squid-p30 einen 19-fach höheren  $K_D$ -Wert für die AU/GU-reiche RNA als für die ssRNA. Bei Squid-p32 ist die Affinität zur AU/GU-reichen RNA um Faktor 5 höher als zur ssRNA. So zeigen beide Squid-Proteine eine Substratspezifität für AU/GU-reiche RNA. Generell ist diese Substratspezifität sowie die Bindungsaffinität bei den Mosquito-Proteinen aber geringer ausgeprägt als bei AUF1p45.



**Abbildung 8: RNA-Bindung der Squid-Proteine zu den RNA-Substraten.**

**(A)** Repräsentative RNA-Bindungskurve von Squid-p30 mit 5 nM AU/GU-reicher RNA. Das Signal der 5'-FAM-EX-gelabelten RNA wurde gemessen, um die Volumenveränderung korrigiert und die normalisierten Fluoreszenzsignale gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen. Die Daten wurden mit Gleichung 1 gefittet (siehe 2.8.4.). **(B, C, D)** Exemplarische Darstellung einer RNA-Bindungskurve von **(B)** Squid-p30 mit 25 nM ssRNA, **(C)** Squid-p32 mit 25 nM AU/GU-reicher RNA, **(D)** Squid-p32 mit 25 nM ssRNA. Die Analysen fanden unter den gleichen Bedingungen wie unter (A) beschrieben statt.

Tabelle 8: RNA-Bindeaffinitäten der verschiedenen Proteine zu RNA-Substraten

Protein	AU/GU-reiche RNA $K_D$ (nM)	ssRNA $K_D$ (nM)
AUF1p45 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.5	157 ± 24
Squid-p30	13 ± 0.8	250 ± 92
Squid-p32	130 ± 11	680 ± 79

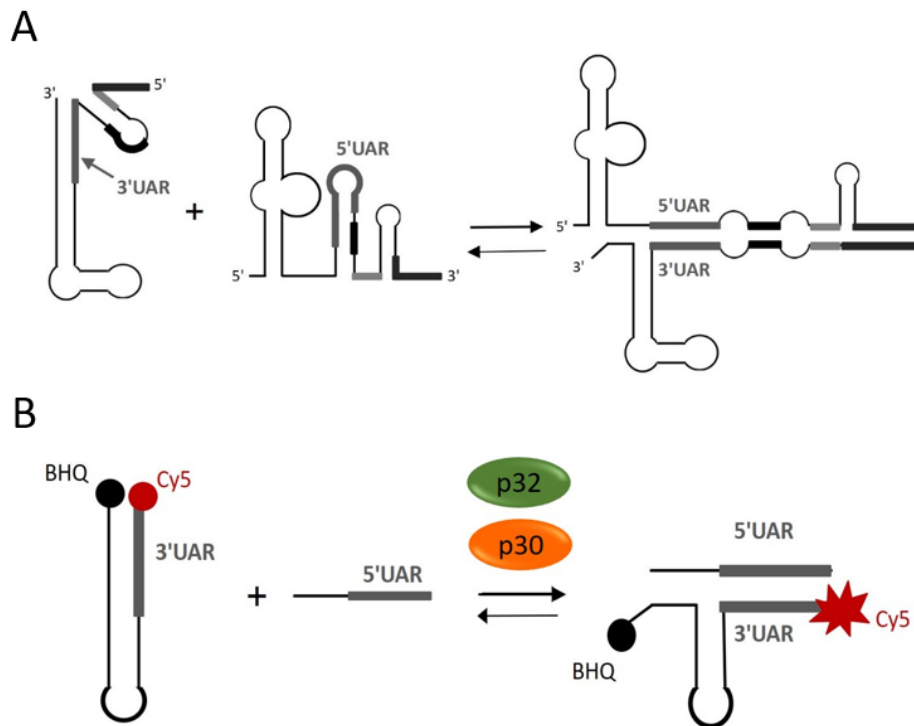
<sup>a</sup>Messungen der RNA-Bindung von AUF1p45 von Susann Friedrich durchgeführt (Meyer *et al.* 2019). Die  $K_D$ -Werte und die Standard-Abweichungen sind von mindestens drei unabhängigen Messungen generiert.

### 3.1.4. Die Squid-Proteine besitzen eine RNA-Chaperon-Aktivität

Eine wichtige Eigenschaft von AUF1p45, in der Funktion als Wirtsfaktor, ist die Umstrukturierung flaviviraler RNA-Strukturen: Das Protein besitzt eine RNA-Chaperon-Aktivität, welche es ermöglicht die Destabilisierung des 3'SL zu beschleunigen und eine RNA-*annealing*-Aktivität, mit welcher es die Hybridisierung der komplementären Zyklisierungssequenzen unterstützen kann (Friedrich *et al.* 2014, Friedrich *et al.* 2016).

Um nun zu untersuchen, ob die Mosquito-Proteine Squid-p30 und Squid-p32 ebenso eine RNA-Chaperon-Aktivität aufweisen, wurden die Proteine auf ihre Fähigkeit, die Destabilisierung des 3'SL zu beschleunigen, untersucht. Dazu wurden bereits in der Masterarbeit von Alexandra Meyer Daten generiert, welche hier detaillierter validiert wurden. Für diese Analyse wurde der fluorimetrische RNA-Destabilisierungs-Assay genutzt, mit welchem es möglich ist, die Umstrukturierung des 3'SL während der flaviviralen Zyklisierungsreaktion nachzubilden (Friedrich *et al.* 2014, Abb. 9A). Dabei wird eine verkürzte Version des nativen 3'SL des WNV verwendet, welche dem unteren Teil des *stem loops* entspricht und die 3'UAR-Sequenz beinhaltet. Diese 3'SL<sup>trunc</sup>-RNA ist am 5'-Ende mit einem Cy5-Fluorophor markiert und besitzt am 3'-Ende einen *black-hole-Quencher* (BHQ), welcher zunächst bei intakter *stem-loop*-Struktur das Fluoreszenz-Signal des Cy5 löscht. Eine zweite RNA in diesem Assay ist unmarkiert und enthält die 5'UAR-Sequenz. Die Interaktion dieser beiden RNAs führt zu einer Umstrukturierung des 3'SL<sup>trunc</sup> und einem größeren räumlichen Abstand zwischen dem Cy5-Fluorophor und dem BHQ. Dies resultiert in einem Anstieg des Fluoreszenz-Signals, welches nun gemessen werden kann (Abb. 9B). Die Reaktion findet ebenso ohne die Zugabe von RNA-Chaperonen statt, wird aber durch die Anwesenheit dieser stark beschleunigt. Zunächst wurde die Fluoreszenz der 3'SL<sup>trunc</sup>-RNA allein

und anschließend unter Zugabe von Protein in ansteigender Konzentration gemessen. Mit Zugabe der 5'UAR-RNA wurde die Reaktion gestartet und weiter fluorimetrisch verfolgt.

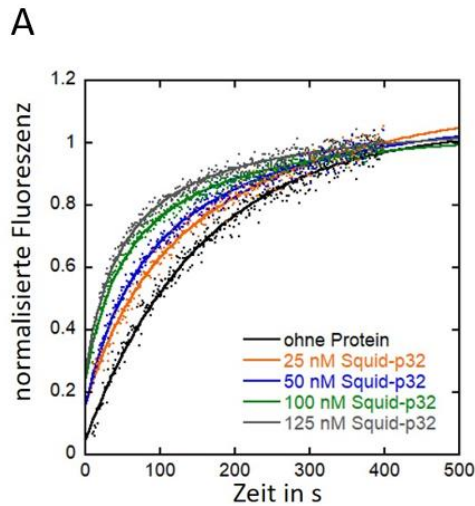


**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Zyklisierungsreaktion des WNV und des davon abgeleiteten fluorimetrischen RNA-Destabilisierungs-Assays. (A)** Hier dargestellt sind die *stem loop* Strukturen der 3' und 5'UTR mit den markierten 3' und 5'UAR-Elementen, welche in Folge der Zyklisierungsreaktion umstrukturiert werden, damit die komplementären RNA-Bereiche miteinander interagieren können (Friedrich *et al.* 2014). **(B)** Hier sind die im RNA-Destabilisierungs-Assay verwendete Cy5 (Fluorophor) markierte 3'SL<sup>trunc</sup>-RNA und die unmarkierte 5'UAR-RNA dargestellt, deren Interaktion den räumlichen Abstand zwischen dem Cy5-Fluorophor und BHQ (Fluoreszenz-*quencher*) vergrößert und so den Anstieg des Fluoreszenzsignals bewirkt. Die 3'SL<sup>trunc</sup>-RNA entspricht dem unteren Teil des nativen WNV 3'SL (Friedrich *et al.* 2014).

Dabei zeigte sich mit zunehmender Squid-p32 Konzentration ein im Vergleich zur Probe ohne Protein schnellerer Anstieg der Fluoreszenz (Abb. 10A), welcher sich ebenso in einem Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{obs}$ ) widerspiegelte (Abb. 10B). Ein ähnliches Bild ergab sich für Squid-p30, wobei der Anstieg der Fluoreszenz (Abb. 10C), sowie der Anstieg der  $k_{obs}$ -Werte (Abb. 10D) weniger stark ausgeprägt waren als bei Squid-p32.

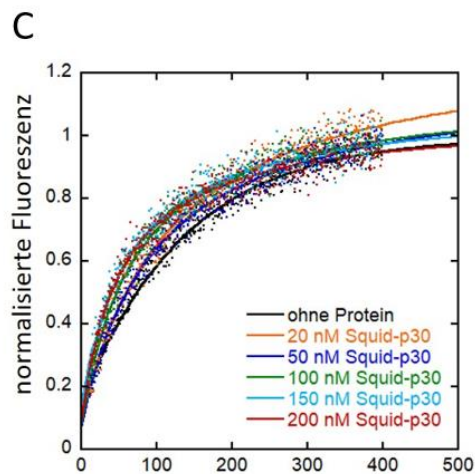
Zum Vergleich wurde ebenso die Aktivität von AUF1p45 gemessen (Daten aus Masterarbeit Alexandra Meyer). Bei einer Konzentration von 150 nM AUF1p45 konnte anhand der beobachteten Geschwindigkeitskonstante eine Beschleunigung der Reaktion um Faktor 5.6 bestimmt werden. 125 nM Squid-p32 beschleunigten die Reaktion um Faktor 2.9 (Abb. 10B). Dagegen wurde die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion von Squid-p30 bei einer eingesetzten

Proteinkonzentration von 150 nM um Faktor 2.1 erhöht (Abb. 10D). Die berechneten Beschleunigungs-Faktoren wurden hierbei immer mit einer Reaktion ohne Protein verglichen. Zusammenfassend ist bei dem Vergleich aller Daten erkennbar, dass beide Mosquito-Proteine eine RNA-Chaperon-Aktivität haben, welche aber geringer als die Aktivität von AUF1p45 ist (Abb. 10E, F).



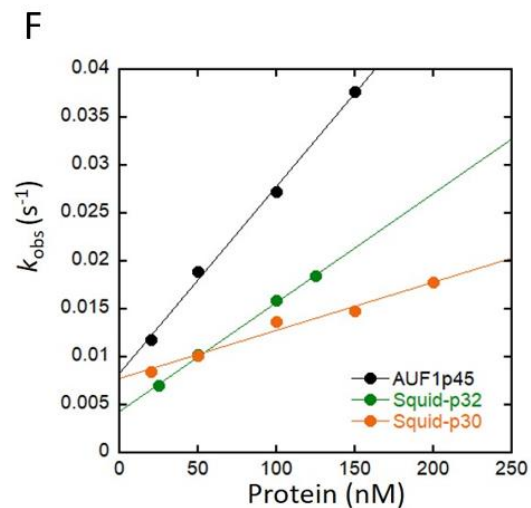
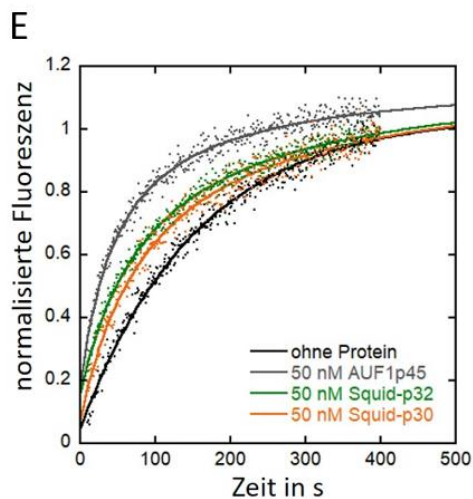
**B**

Squid-p32 (nM)	$k_{obs}(s^{-1})$	Faktor
0	0.0064	1
25	0.0070	1.1
50	0.0103	1.6
100	0.0159	2.5
125	0.0184	2.9



**D**

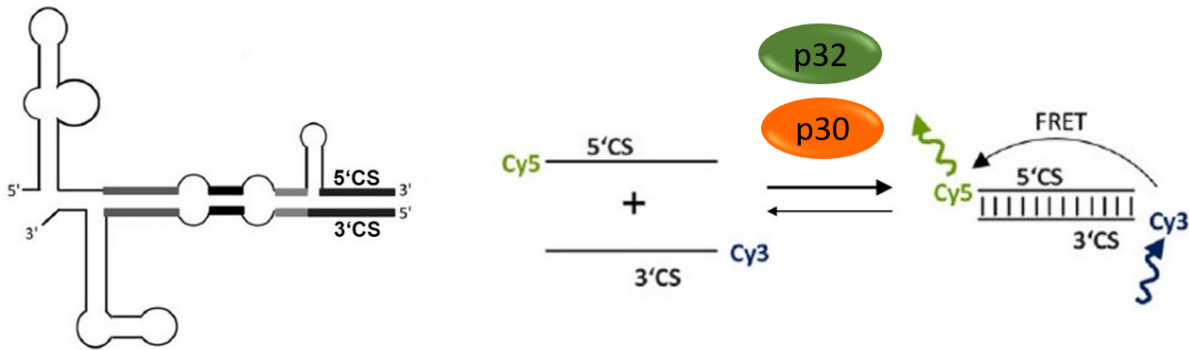
Squid-p30 (nM)	$k_{obs}(s^{-1})$	Faktor
0	0.0072	1
20	0.0085	1.2
50	0.0102	1.4
100	0.0137	1.9
150	0.0148	2.1
200	0.0178	2.5



**Abbildung 10: Die Mosquito-Proteine haben eine RNA-Chaperon-Aktivität, welche geringer ist als die Aktivität von AUF1p45.** (A) Zunächst wurde die Fluoreszenz der 3'SL<sup>trunc</sup>-RNA allein und anschließend unter Zugabe von Squid-p32 in ansteigender Konzentration gemessen. Mit Zugabe von 5'UAR-RNA wurde die Reaktion gestartet und fluorimetrisch weiterverfolgt. Die gemessenen Fluoreszenzsignale wurden auf das Startsignal normalisiert, gegen die Zeit aufgetragen und mit einer Reaktion erster Ordnung (Gleichung 2) oder einer Reaktion zweiter Ordnung (Gleichung 3) gefittet. (B) Übersicht der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten aus (A) und der daraus berechneten Beschleunigungsfaktoren. (C) Unter den gleichen Bedingungen wie unter (A) beschrieben wurde Squid-p30 in ansteigender Konzentration untersucht. (D) Übersicht der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten aus (C) und der berechneten Beschleunigungs-Faktoren. (E) Vergleich der normalisierten Fluoreszenzsignale von 50 nM AUF1p45 (Daten aus Masterarbeit Alexandra Meyer), Squid-p32 und Squid-p30, aufgetragen gegen die gemessene Zeit. (F) Übersicht der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Mosquito-Proteine und AUF1p45 (Daten aus Masterarbeit Alexandra Meyer), welche gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen und linear gefittet wurden. Dabei wurden die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten aus Abb. 10A und 10C verwendet.

### 3.1.5. Die Squid-Proteine besitzen nur eine schwache RNA-*annealing*-Aktivität

Da AUF1p45 unter anderem eine RNA-*annealing*-Aktivität aufweist, welche die *annealing*-Reaktion der komplementären Sequenzen innerhalb der flaviviralen Zyklisierungsreaktion unterstützt (Friedrich *et al.* 2016), war es von Interesse zu identifizieren, ob die Mosquito-Proteine ebenfalls eine solche Aktivität besitzen. Dazu wurde ein fluorimetrischer RNA-*annealing*-Assay genutzt. Mit diesem Assay kann untersucht werden, ob ein Protein die Hybridisierung der komplementären Zyklisierungselemente stimuliert. Dabei wird eine mit einem Cy5-Fluorophor markierte RNA, welche die 5'CS-Sequenz beinhaltet und eine Cy3-fluoreszenzmarkierte RNA mit der 3'CS-Sequenz, genutzt. Die Hybridisierung dieser beiden RNAs resultiert in einem messbaren Förster-Resonanzenergietransfer-Signal (FRET, Abb. 11). Das Prinzip dieses Prozesses ist die abstandsabhängige Energieübertragung des angeregten Cy3-Fluorophors auf das Cy5-Fluorophor über den Förstermechanismus. Voraussetzung für diesen Prozess ist die Überlappung des Emissionsspektrums von Cy3 mit dem Anregungsspektrum von Cy5. Die Emission des Cy5-Fluorophors kann anschließend detektiert werden.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Hybridisierung der komplementären CS-Sequenzen des WNV und der darauf basierende fluorimetrische RNA-annealing-Assay.** Dargestellt ist die *annealing*-Reaktion der komplementären 5'CS- und 3'CS-RNA-Bereiche innerhalb der Zyklisierungsreaktion des WNV. Davon abgeleitet sind die Cy5 markierte 5'CS-RNA und die Cy3 markierte 3'CS-RNA, deren Interaktion zu einem messbaren FRET-Signal führt (Friedrich *et al.* 2016).

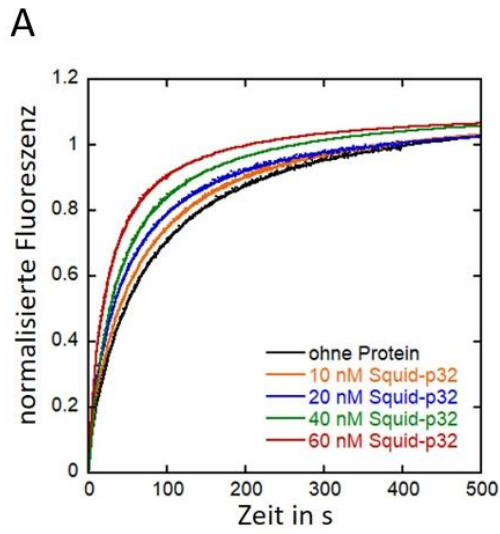
Bei der Durchführung des RNA-*annealing*-Assays wird zunächst die Fluoreszenz der 3'CS-RNA allein gemessen und anschließend unter Zugabe von Protein in ansteigender Konzentration. Die Reaktion wird mit Zugabe der 5'CS-RNA gestartet und weiter fluorimetrisch verfolgt.

Die normalisierten Fluoreszenz-Signale wurden gegen die gemessene Zeit aufgetragen und mit einer Reaktion zweiter Ordnung gefittet. Dabei war mit zunehmender Squid-p32 Konzentration ein im Vergleich zur Probe ohne Protein schnellerer Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 12A), welcher sich ebenso in einem Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten widerspiegelte (Abb. 12B). Ein ähnliches Bild ergab sich für Squid-p30 (Abb. 12C, D).

Zum Vergleich wurde ebenso die Aktivität von AUF1p45 ermittelt (Daten von Dr. Susann Friedrich). Die berechneten Beschleunigungs-Faktoren wurden dabei immer mit einer Reaktion ohne Protein verglichen. Eine Reaktion mit Zugabe von 20 nM AUF1p45 resultierte in einer Beschleunigung um Faktor 8. Im Gegensatz dazu wiesen die Mosquito-Proteine deutlich schwächere Aktivitäten auf.

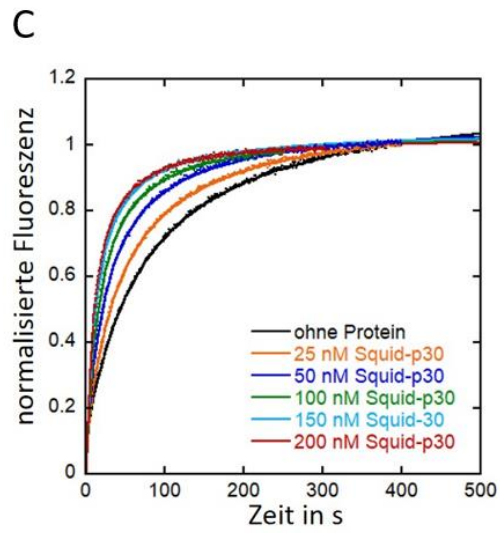
Bei der Zugabe von 20 nM Squid-p32 zu der Reaktion konnte die Geschwindigkeitskonstante um Faktor 1.5 erhöht werden (Abb. 12A, B). Bei einer Konzentration von 25 nM zeigte Squid-p30 eine Erhöhung der Geschwindigkeitskonstante um Faktor 1.7 (Abb. 12C, D). Die Daten zeigen, dass die Mosquito-Proteine eine vergleichbare RNA-*annealing*-Aktivität haben (Abb. 12E, F), jedoch ist diese deutlich schwächer als die des humanen Wirtsfaktors AUF1p45 (Abb. 12E, F).





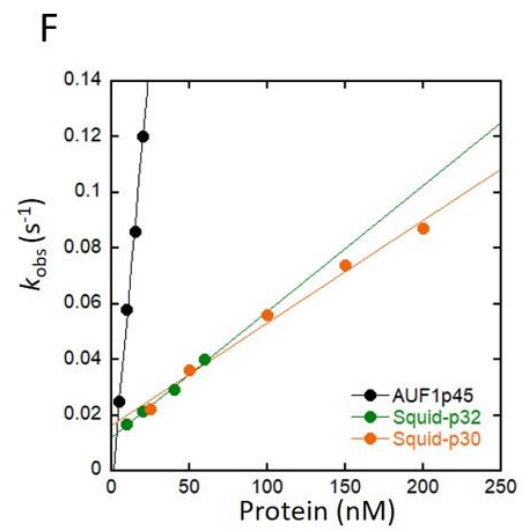
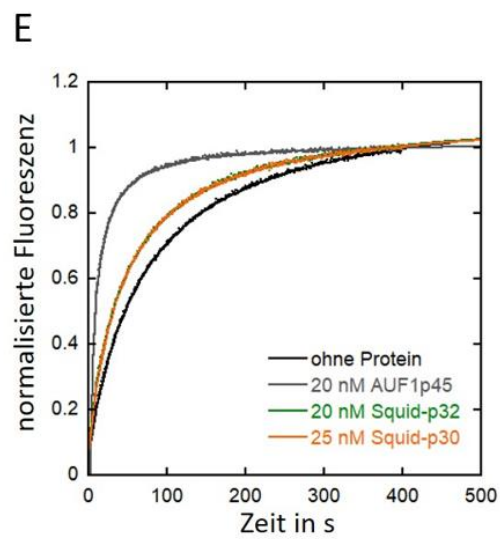
**B**

Squid-p32 (nM)	$k_{\text{obs}}(\text{s}^{-1})$	Faktor
0	0.0140	1
10	0.0169	1.2
20	0.0215	1.5
40	0.0290	2.1
60	0.0400	2.9



**D**

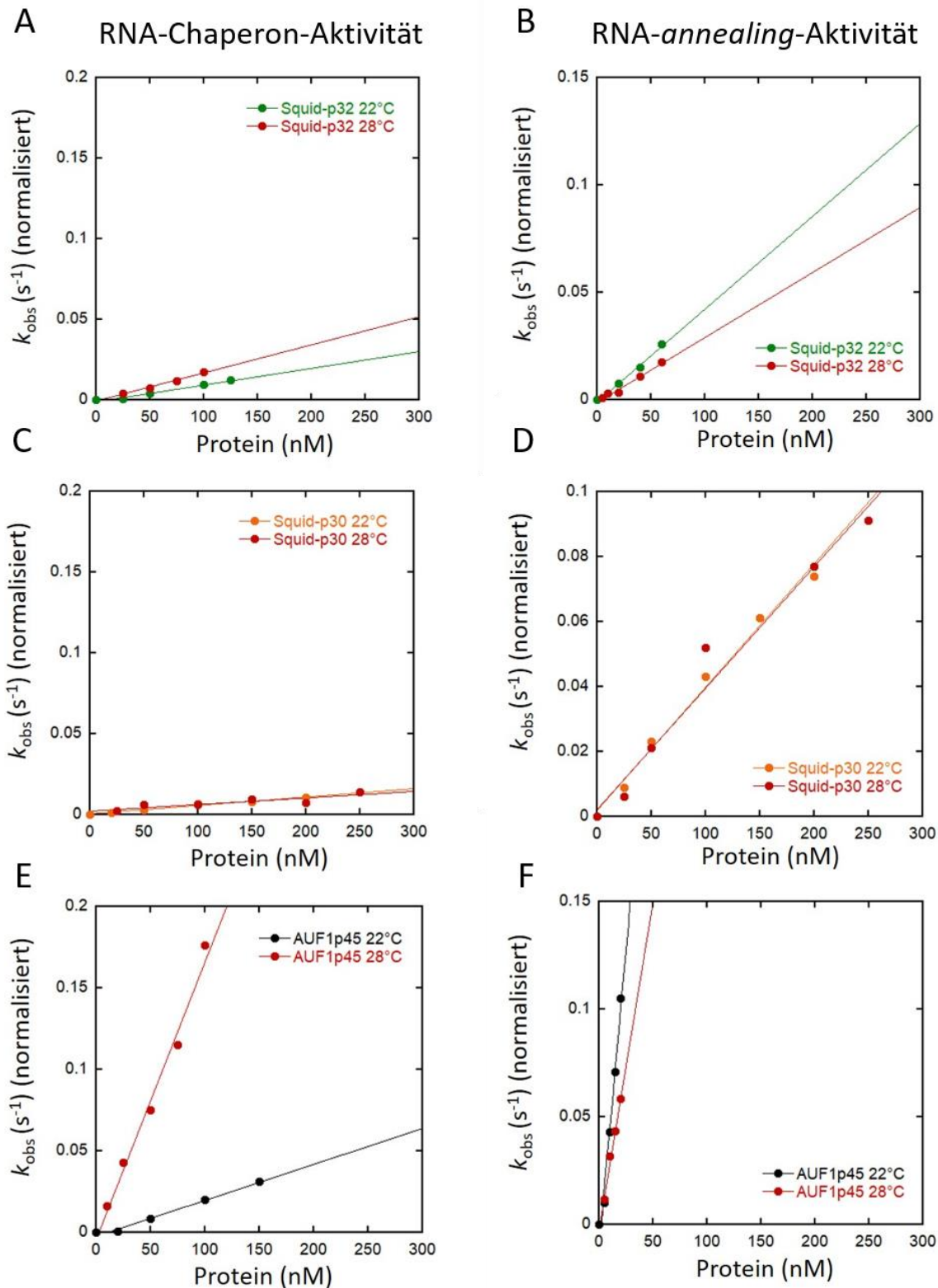
Squid-p30 (nM)	$k_{\text{obs}}(\text{s}^{-1})$	Faktor
0	0.0130	1
25	0.0220	1.7
50	0.0360	2.8
100	0.0560	4.3
150	0.0740	5.7
200	0.0870	6.7



**Abbildung 12: Die RNA-annealing-Aktivität der Mosquito-Proteine ist deutlich schwächer als die des humanen AUF1p45.** (A) Zunächst wurde die Fluoreszenz der 3'CS-RNA allein und anschließend unter Zugabe von Squid-p32 in ansteigender Konzentration gemessen. Mit Zugabe der 5'CS-RNA wurde die Reaktion gestartet und weiter fluorimetrisch verfolgt. Die gemessenen Fluoreszenzsignale wurden auf das Startsignal normalisiert, gegen die Zeit aufgetragen und mit einer Reaktion zweiter Ordnung gefittet. (B) Übersicht der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten aus (A). (C) Unter den gleichen Bedingungen wie unter (A) beschrieben wurde Squid-p30 in ansteigender Konzentration untersucht. (D) Übersicht der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten und Beschleunigungs-Faktoren aus (C). (E) Vergleich der normalisierten Fluoreszenzsignale von 20 nM AUF1p45, Squid-p32 und Squid-p30, aufgetragen gegen die gemessene Zeit. (F) Übersicht der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Mosquito-Proteine und AUF1p45 (Daten von Dr. Susann Friedrich), welche gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen und linear gefittet wurden. Dabei wurden die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten aus Abb. 12A und 12C verwendet.

### 3.1.6. Die Umstrukturierungsaktivitäten der Squid-Proteine sind nicht temperaturabhängig

Das Replikationsverhalten von WNV-Replikons ist in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie unterschiedlich. So konnte beobachtet werden, dass sich beim Replikon WNVRLuc in den Mosquitozellen eine 48 h lange Lag-Phase zeigt, wohingegen die Replikation in humanen Zellen schon nach 24 h ihr Maximum erreicht. Dieses Replikationsverhalten ist abhängig von der für die Zelllinien genutzten Kultivierungstemperatur (Meyer *et al.* 2020). Daher war es von Interesse zu untersuchen, ob die Squid-Proteine möglicherweise ebenso eine temperaturabhängige Aktivität aufweisen. Um dies zu untersuchen wurden die bereits unter 3.1.4. und 3.1.5. aufgeführten RNA-Destabilisierungs- und RNA-annealing-Assays, welche sonst bei 22°C durchgeführt wurden, hier bei 28°C ausgeführt. Dabei zeigte Squid-p32 eine minimale Erhöhung der RNA-Chaperon-Aktivität (Abb. 13A). Die RNA-annealing-Aktivität dagegen war bei 28°C schwach vermindert (Abb. 13B). Bei Squid-p30 bleiben beide Aktivitäten vergleichbar (Abb. 13C, D). Als Referenz wurden ebenfalls die RNA-Umstrukturierungsaktivitäten von AUF1p45 bei 28°C untersucht (Daten von Dr. Susann Friedrich). Die RNA-annealing-Aktivität von AUF1p45 war von der Erhöhung der Temperatur kaum beeinflusst und nur minimal verschlechtert (Abb. 13F). Dagegen war die RNA-Chaperon-Aktivität von AUF1p45 bei 28°C, verglichen mit 22°C, deutlich besser (Abb. 13E). Zusammenfassend zeigt die Erhöhung der Temperatur bei beiden Mosquito-Proteinen, im Gegensatz zu AUF1p45, keinen bzw. einen sehr geringen Effekt auf die RNA-Chaperon- und RNA-annealing-Aktivität. Diese Daten verdeutlichen wichtige Unterschiede in den Eigenschaften der Proteine bei unterschiedlichen Temperaturen.

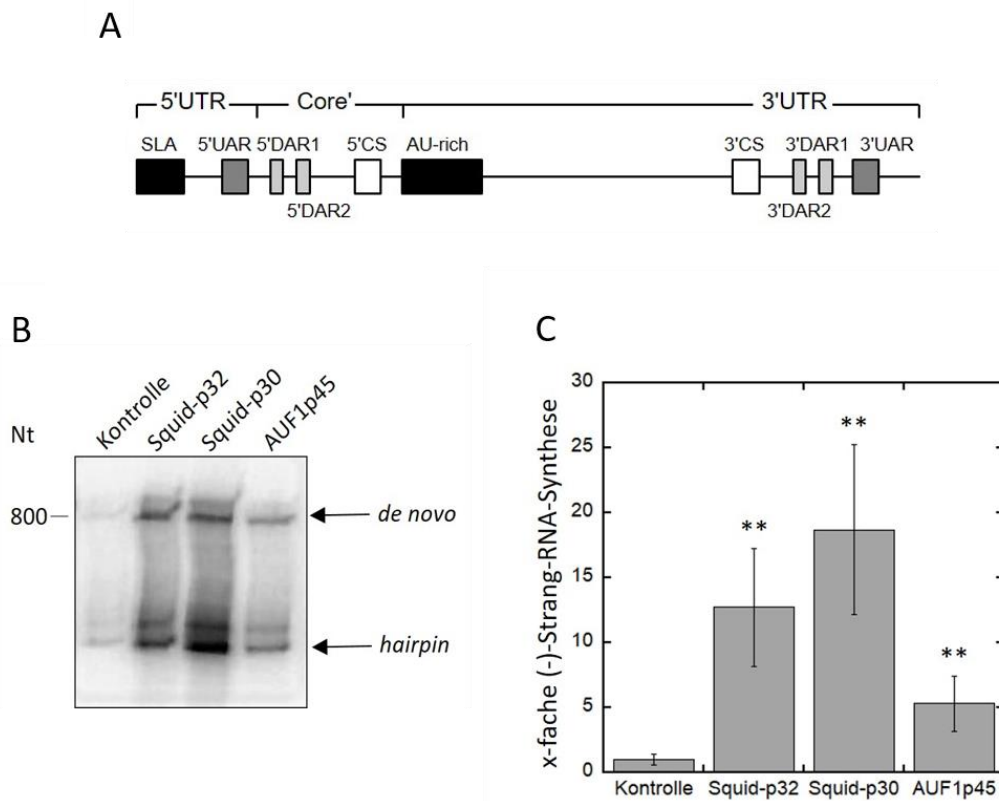


**Abbildung 13: Einfluss der Temperatur auf die RNA-Umstrukturierungsaktivitäten der Mosquito-Proteine und AUF1p45.** Untersuchung der RNA-Chaperon-Aktivität (links) und RNA-annealing-Aktivität (rechts) von (A, B) Squid-p32, (C, D) Squid-p30 und (E, F) AUF1p45 bei 22°C und 28°C. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten wurden normalisiert, indem die Reaktion ohne Protein von der Gesamtreaktion abgezogen wurde. Die normalisierten Geschwindigkeitskonstanten wurden gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen und linear gefittet.

### 3.1.7. Die Squid-Proteine stimulieren die (-)-Strang-RNA-Synthese des WNV stärker als AUF1p45

Mit dem RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Assay (RdRp) kann der erste Replikationsschritt des WNV, die Synthese des viralen (-)-Strang-Intermediates, *in vitro* rekonstituiert werden. Dieser Assay wurde von Friedrich *et al.* (2014) etabliert, um zelluläre Proteine mit Wirtsfaktorfunktion zu identifizieren. Dabei diente die Stimulation der (-)-Strang-RNA-Synthese des WNV als Maß für die Wirtsfaktoraktivität. So konnte mit diesem Assay bereits der virale Wirtsfaktor AUF1p45 identifiziert werden (Friedrich *et al.* 2014).

Da aus den vorangegangenen Aktivitätstests ersichtlich ist, dass die Mosquito-Proteine grundsätzlich Aktivitäten wie AUF1p45, nur in verringerter Ausprägung besitzen, war es von Interesse zu untersuchen, ob die Mosquito-Proteine ebenso die (-)-Strang-RNA-Synthese stimulieren können. Der RdRp beruht auf der Detektion der radioaktiv markierten *de novo* synthetisierten (-)-Strang-RNA, für die eine subgenomische RNA (sgRNA) als *template* fungiert. Diese subgenomische RNA besteht größtenteils aus der 3'UTR und der 5'UTR des WNV und beinhaltet somit alle Zyklisierungselemente. Zusätzlich besitzt die RNA einen kleinen Teil der kodierenden Sequenz für das *core*-Protein (Abb. 14A). Als RNA-Polymerase fungierte das gereinigte Nichtstrukturprotein 5 (NS5) des WNV (AG Behrens). Die Proben mit *de novo* synthetisierter RNA wurden mit Hilfe einer 5%igen Harnstoff-PAGE aufgetrennt und die radioaktiven Signale mittels Autoradiographie detektiert (Abb. 14B). Zusätzlich zu dem *de novo* synthetisierten (-)-Strang-RNA-Produkt, welches eine Größe von ca. 800 Nt aufweist, migriert ein sogenanntes *hairpin*-Produkt. Dieses entsteht durch ein Umklappen des 3'-Endes der RNA (*copy-back*-Mechanismus). Das *hairpin*-Produkt ist doppelt so lang wie das *de novo* synthetisierte (-)-Strang-RNA-Produkt, bildet aber aufgrund der semi-denaturierenden Bedingungen der Harnstoff-PAGE stabile Sekundärstrukturen aus und migriert dadurch deutlich schneller (Abb. 14B). Dies wurde bereits von Behrens *et al.* (1996) und Friedrich *et al.* (2014) näher beschrieben. Als Kontrolle diente pro Bestimmungsreihe eine Reaktion ohne Protein, nur mit Zugabe des Lagerpuffers der zu testenden Proteine. Nach der Quantifizierung wurden die ermittelten Signalintensitäten durch die der Kontrollreaktion geteilt (Abb. 14C). AUF1p45 zeigte eine signifikante Stimulation der (-)-Strang-RNA-Synthese um Faktor 5.3. Dagegen konnten für die Mosquito-Proteine deutlich höhere Stimulations-Faktoren von 12.7 bei Squid-p32 und 18.7 bei Squid-p30 ermittelt werden. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den bisher ermittelten Aktivitäten der Mosquito-Proteine, welche deutlich schwächer waren verglichen mit AUF1p45.



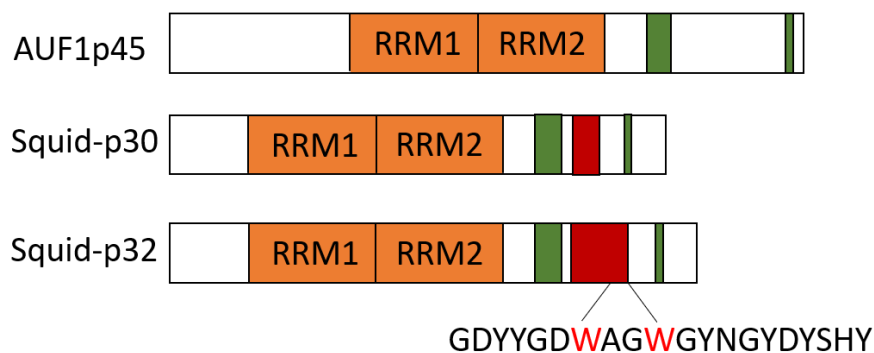
**Abbildung 14: Die Squid-Proteine stimulieren die (-)-Strang-RNA-Synthese des WNV in einem RdRp-Assay. (A)** Schematische Darstellung der sgRNA, welche aus der 3'UTR und 5'UTR des WNV und einem kleinen Teil der kodierenden Sequenz des *core*-Proteins besteht. **(B)** Exemplarische Darstellung eines RdRp-Assays, in welchem AUF1p45 und die Mosquito-Proteine untersucht wurden. Die Auftrennung der *de novo* synthetisierten RNA erfolgte mit Hilfe einer 5%igen Harnstoff-PAGE und die Detektion der radioaktiven Signale mittels Autoradiographie. Die *de novo* synthetisierten RNA-Produkte und die *hairpin*-RNA-Produkte sind auf der rechten Seite markiert. **(C)** Zusammenfassende Darstellung der Daten aus zwei unabhängigen Experimenten, welche in einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Signale wurden mit *Image Quant 5.0* analysiert und die Mittelwerte in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. T-Test: \*\*,  $0.01 \geq p \geq 0.001$

### 3.2. Charakterisierung der Proteinvarianten des Mosquito-Proteins Squid-p32

Die bisherige *in vitro* Analyse der Mosquito-Proteine Squid-p30 und Squid-p32 zeigte insbesondere in der RNA-Chaperon-Aktivität und in der RNA-Bindungsaffinität deutliche Unterschiede zwischen den Proteinen. Um nun zu ergründen, worauf diese Unterschiede zurückzuführen sind, wurde versucht die Proteine anhand ihrer Aminosäuren-Zusammensetzung zu analysieren.

Die Squid-Proteine sind identisch, abgesehen von dem Exon 5-kodierten Bereich, welcher bei Squid-p30 aufgrund einer alternativen Selektion der 3' Spleißstelle, um 20 Aminosäuren kürzer ist, als bei Squid-p32. Diese zusätzlichen 20 Aminosäuren verlängern ein sogenanntes YGG-Motiv (Abb. 15). Über YGG-Motive ist bisher nicht viel bekannt. Sie treten häufig zusammen mit RNA *recognition motifs* oder RGG/RG-Motiven auf und wurden mit Protein-Oligomerisierung in Verbindung gebracht (Zucconi *et al.* 2010).

Innerhalb dieses Motivs befinden sich zwei Tryptophane. Um die Bedeutung dieser innerhalb des Motivs genauer zu untersuchen, wurden sie durch Alanine substituiert. Die resultierenden Varianten Squid-p32<sub>W261A</sub>, Squid-p32<sub>W264A</sub> und Squid-p32<sub>W261,264A</sub> wurden in den fluorimetrischen RNA-RNA-Interaktionsassays und auf ihre RNA-Bindungsaffinität getestet.

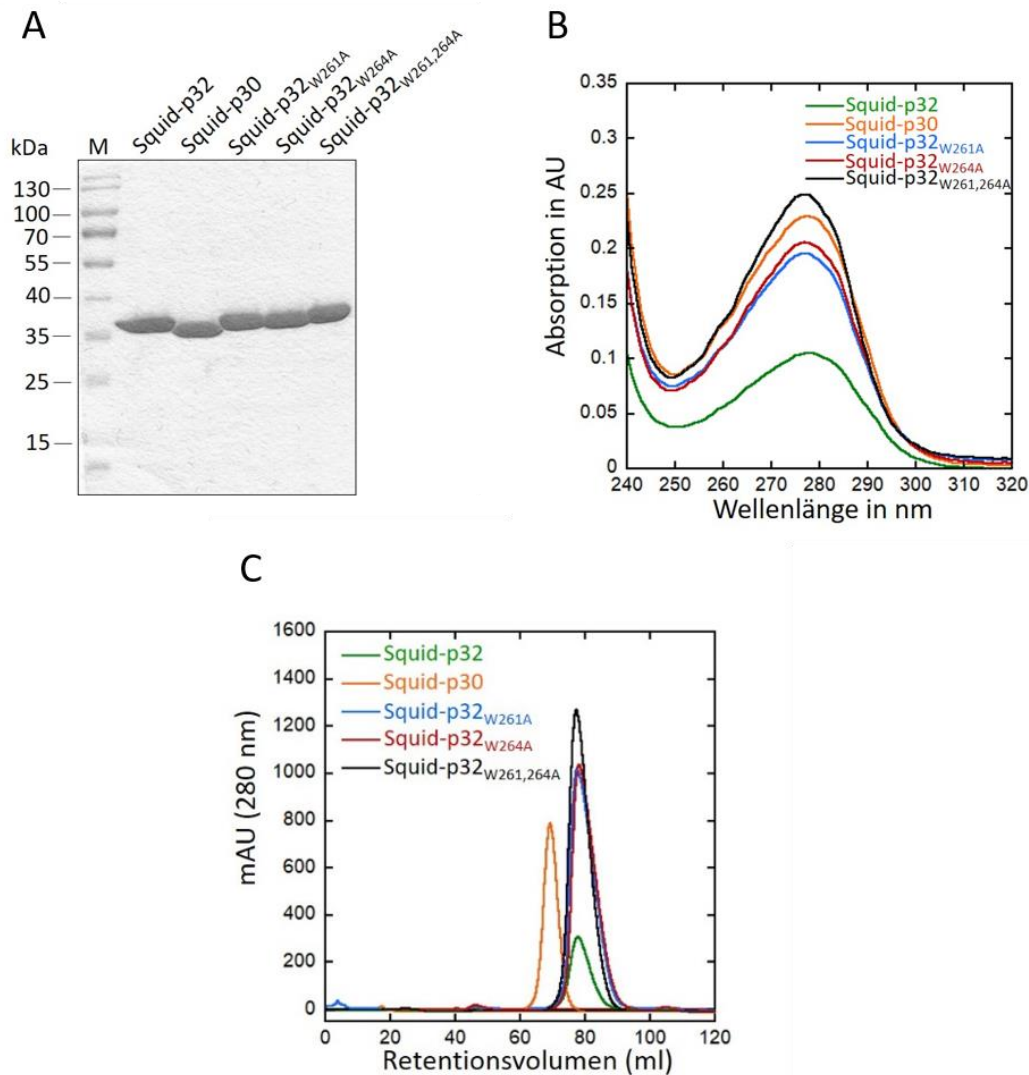


**Abbildung 15: Darstellung der Domänenorganisation des humanen AUF1p45 und der Mosquito-Proteine Squid-p30 und Squid-p32.** Die Mosquito-Proteine besitzen ebenso wie AUF1p45 zwei nicht identische, nebeneinander angeordnete RNA *recognition motifs* (RRM-Domänen). In grün markiert ist die Arginin-Glycin-reiche Region (RGG/RG-Motiv) und in rot markiert der durch Exon 5-kodierte Bereich. Der Exon 5-kodierte Bereich ist aufgrund einer alternativen Selektion der 3' Spleißstelle innerhalb des Exon 5 bei Squid-p30 um 20 Aminosäuren kürzer, als bei Squid-p32. Dieser Bereich verlängert eine Tyrosin-Glycin-reiche Region (YGG-Motiv).

### 3.2.1. Rekombinante Reinigung der Squid-p32-Varianten

Um gezielt die Nukleotide, welche für Tryptophan kodieren, gegen Nukleotide kodierend für Alanin auszutauschen, wurde eine *site-directed mutagenesis*-PCR durchgeführt. Der korrekte Einbau der Mutationen wurde anschließend mittels Sequenzierung der für Squid-p32<sub>W261A</sub>, Squid-p32<sub>W264A</sub> und Squid-p32<sub>W261,264A</sub> kodierenden Plasmide verifiziert. Die Proteinvarianten wurden rekombinant in *E. coli* synthetisiert und analog zu einem etablierten Reinigungsprotokoll (Friedrich *et al.* 2014), welches auch schon für die Wildtyp (WT) Squid-Proteine genutzt wurde (Masterarbeit Alexandra Meyer), gereinigt. Die Squid-p32-Varianten wurden über eine Nickel-NTA- und eine Heparin-Affinitätschromatographie gereinigt. Charakteristisch bei der Reinigung der Wildtyp Squid-Proteine war, dass Squid-p32 innerhalb des Reinigungsprozesses zur Oligomerisierung tendierte und Squid-p30 nicht. Bei der Heparin-Affinitätschromatographie konnte ein unterschiedliches Elutionsverhalten von monomerem und oligomerem Squid-p32 beobachtet werden. Die Einzel-Alanin-Varianten Squid-p32<sub>W261A</sub> und Squid-p32<sub>W264A</sub> zeigten dabei ein intermediäres Oligomerisierungsverhalten. Die Doppel-Alanin-Variante Squid-p32<sub>W261,264A</sub> verhielt sich bei der Reinigung dagegen wie Squid-p30. Es wurden nur die Proben mit mutmaßlich monomerem Protein weiterverarbeitet. Bei der abschließenden Größenausschlusschromatographie wurden alle Squid-p32-Varianten mit einem identischen Retentionsvolumen zum WT-Squid-p32 von der Gelfiltrations-Säule eluiert (Abb. 16C). Daraus wird geschlossen, dass die Proteine höchstwahrscheinlich in einem monomeren Zustand gewonnen wurden, da für die WT-Squid-Proteine bereits gezeigt wurde, dass sie als Partikel mit einer dem Monomer entsprechenden Masse vorliegen (siehe 3.1.1.).

Die gereinigten Squid-p32-Varianten wurden mittels 12%iger SDS-PAGE analysiert und waren frei von Verunreinigungen (Abb. 16A, B). Des Weiteren wurde für jedes Protein der Quotient von OD<sub>280</sub>/OD<sub>260</sub> bestimmt, welcher mit Werten im Bereich 1.8-1.9 indizierte, dass die Proteine frei von Verunreinigungen durch Nukleinsäuren waren (Abb. 16B).



**Abbildung 16: Rekombinante Reinigung der Squid-p32-Varianten:** (A) Die Proteine wurden rekombinant als SUMO-Fusionsproteine in *E. coli* synthetisiert und über mehrere Affinitätschromatographie-Schritte gereinigt. 4 µg der gereinigten Mosquito-Proteine und der Squid-p32-Varianten wurden in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind angegeben. (B) Von den gereinigten Proteinen wurde ein UV-Absorptionsspektrum aufgenommen. (C) Darstellung des Elutionsverhalten der Mosquito-Proteine und der Squid-p32-Varianten. Die gemessene Absorption bei 280 nm wurde gegen das Retentionsvolumen aufgetragen.

### 3.2.2. Der Sekundärstrukturgehalt der Squid-p32-Varianten ist fast identisch mit dem des Wildtyps

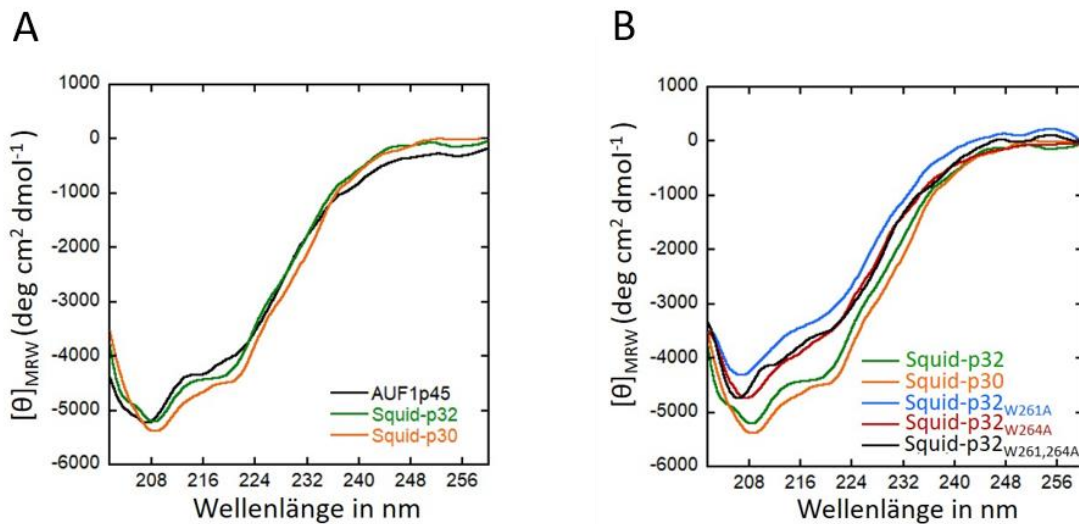
Mit Hilfe der Messung eines Fern-UV-Spektrums an einem Spektropolarimeter lassen sich Aussagen über den Sekundärstrukturgehalt eines Proteins treffen. Die Messungen der Proteine wurden in einem Bereich von 200 nm bis 260 nm durchgeführt. Als Messgröße wurde die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest ( $[\theta]_{MRW}$ ) bestimmt, welche den durchschnittlichen Betrag einer einzelnen Aminosäure am Gesamtsignal ausdrückt. Das CD-Spektrum von Squid-p30 und



Squid-p32 wurde bereits aufgenommen und mit dem CD-Spektrum von AUF1p45 verglichen (Masterarbeit Alexandra Meyer). Dabei konnte festgestellt werden, dass nicht nur die CD-Spektren der Squid-Proteine, abgesehen von minimalen Abweichungen, identisch waren, ebenso stimmten sie nahezu mit dem CD-Spektrum von AUF1p45 überein (Abb. 17A). Alle drei CD-Spektren zeigen bei ca. 208 nm ein schwaches Minimum, was einen Anteil an  $\alpha$ -Helix-Strukturen vermuten lässt. Abweichend zu AUF1p45 war bei den Mosquito-Proteinen ein weiteres Minimum bei ca. 220 nm zu detektieren. Dies deutet ebenfalls auf  $\alpha$ -helikale Strukturen hin. Bei AUF1p45 zeigt das CD-Spektrum ein weiteres Minimum bei 215 nm, was vermutlich auf geringe Anteile an  $\alpha$ -Helix-Strukturen und  $\beta$ -Faltblättern zurück zu führen ist (Abb. 17A). Die Proteine zeigen strukturelle Integrität, jedoch lässt das schwache CD-Signal auf einen hohen Anteil an ungeordneten Proteinstrukturen schließen.

Um nun zu untersuchen, ob der Aminosäureaustausch der Squid-p32-Varianten einen Einfluss auf die Sekundärstruktur der Proteine hat, wurden die CD-Spektren von Squid-p32<sub>W261A</sub>, Squid-p32<sub>W264A</sub> und Squid-p32<sub>W261,264A</sub> ermittelt (Abb. 17B). Die Signalamplitude der Squid-p32-Varianten ist etwas geringer als bei den Wildtyp-Proteinen, besonders Squid-p32<sub>W261A</sub> zeigt einen schwächeren Circular dichroismus. Des Weiteren weisen Squid-p32<sub>W261A</sub> und Squid-p32<sub>W261,264A</sub> eine leichte Verschiebung des CD-Spektrum-Minimums um ca. 2 nm auf. So besitzen Squid-p30 und Squid-p32 ein Minimum bei 208 nm, wohingegen Squid-p32<sub>W261A</sub> und Squid-p32<sub>W261,264A</sub> eines bei 206 nm aufweisen. Ein weiteres Minimum bei ca. 220 nm ist bei den Squid-p32-Varianten schwächer ausgeprägt, als bei den WT-Proteinen. Squid-p32<sub>W261,264A</sub> zeigt ein zusätzliches, schwaches Minimum bei ca. 212 nm (Abb. 17B).

Zusammenfassend zeigen die CD-Spektren der Squid-p32-Varianten ein sehr ähnliches CD-Signal zum WT. Die Proteine besitzen eine strukturelle Integrität und es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Sekundärstruktur aufgrund des Aminosäureaustauschs nicht schwerwiegend verändert hat.



**Abbildung 17: Vergleich der Fern-UV-CD-Spektren von AUF1p45, der Mosquito-Proteine und Squid-p32-Varianten.** (A) Das CD-Spektrum von 2  $\mu\text{M}$  Protein in 20 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 1 mM TCEP, pH 7.6 wurde in einem Bereich von 202 nm – 260 nm an einem Spektropolarimeter aufgenommen. 40 Spektren wurden akkumuliert, mit einem Pufferspektrum korrigiert und das resultierende CD-Spektrum wurde geglättet (Masterarbeit Alexandra Meyer). Die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure-Rest wurde mit der Formel unter 2.8.6. berechnet und bezieht sich auf den durchschnittlichen Betrag einer einzelnen Aminosäure am Gesamtsignal des Proteins. (B) Die CD-Spektren der Squid-p32-Varianten wurden unter den gleichen Bedingungen wie unter (A) aufgeführt erzeugt.

### 3.2.3. Die Substitution der Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs von Squid-p32 führt zu einer zehnfach höheren RNA-Bindeaffinität zu AU/GU-reicher RNA

Um den möglichen Einfluss der substituierten Tryptophane von Squid-p32 auf die RNA-Bindfähigkeit zu untersuchen wurden nun ebenfalls die Squid-p32-Varianten in einem RNA-Bindungs-Assay mit den bereits eingeführten RNA-Substraten untersucht. Dabei zeigten alle Squid-p32-Varianten eine 10-fach höhere Bindungsaffinität zu AU/GU-reichen RNA als Squid-p32 ( $K_D = 12.5-14.6$ ). Die Bindung zu der unspezifischen RNA ist bei Squid-p32<sub>W261A</sub> vergleichbar zum WT-Protein ( $K_D = 557$ ). Dagegen zeigen Squid-p32<sub>W264A</sub> eine zweifach ( $K_D = 348$ ) und Squid-p32<sub>W261,264A</sub> eine dreifach ( $K_D = 245$ ) höhere Affinität zu der unspezifischen RNA, verglichen mit dem WT-Protein ( $K_D = 680$ ).

Die  $K_D$ -Werte der Squid-p32-Varianten sind vergleichbar mit den  $K_D$ -Werten von Squid-p30. Dies gilt für die spezifische ( $K_D = 12.5-14.6$ ) und die unspezifische RNA ( $K_D = 245-348$  nM), mit Ausnahme von Squid-p32<sub>W261A</sub>, dessen Affinität nur für die AU/GU-reiche RNA erhöht ist. Der Austausch der Tryptophane führt somit zu einer stärkeren Bindung an spezifische und unspezifische RNA. Dabei genügt bei der Bindung von spezifischer RNA bereits die Substitution von einem Tryptophan gegen Alanin.

Die Bindung zu unspezifischer RNA scheint von der Anzahl der ausgetauschten Aminosäuren abhängig. So ist nur der  $K_D$ -Wert von Squid-p32<sub>W261,264A</sub> geringer, als bei den Einzelaustausch-Varianten.

Tabelle 9: RNA-Bindeaffinitäten der verschiedenen Proteine zu RNA-Substraten (Erweiterung Tabelle 8)

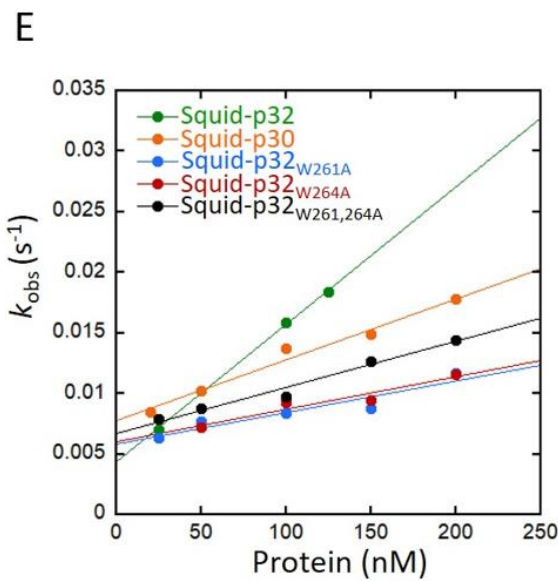
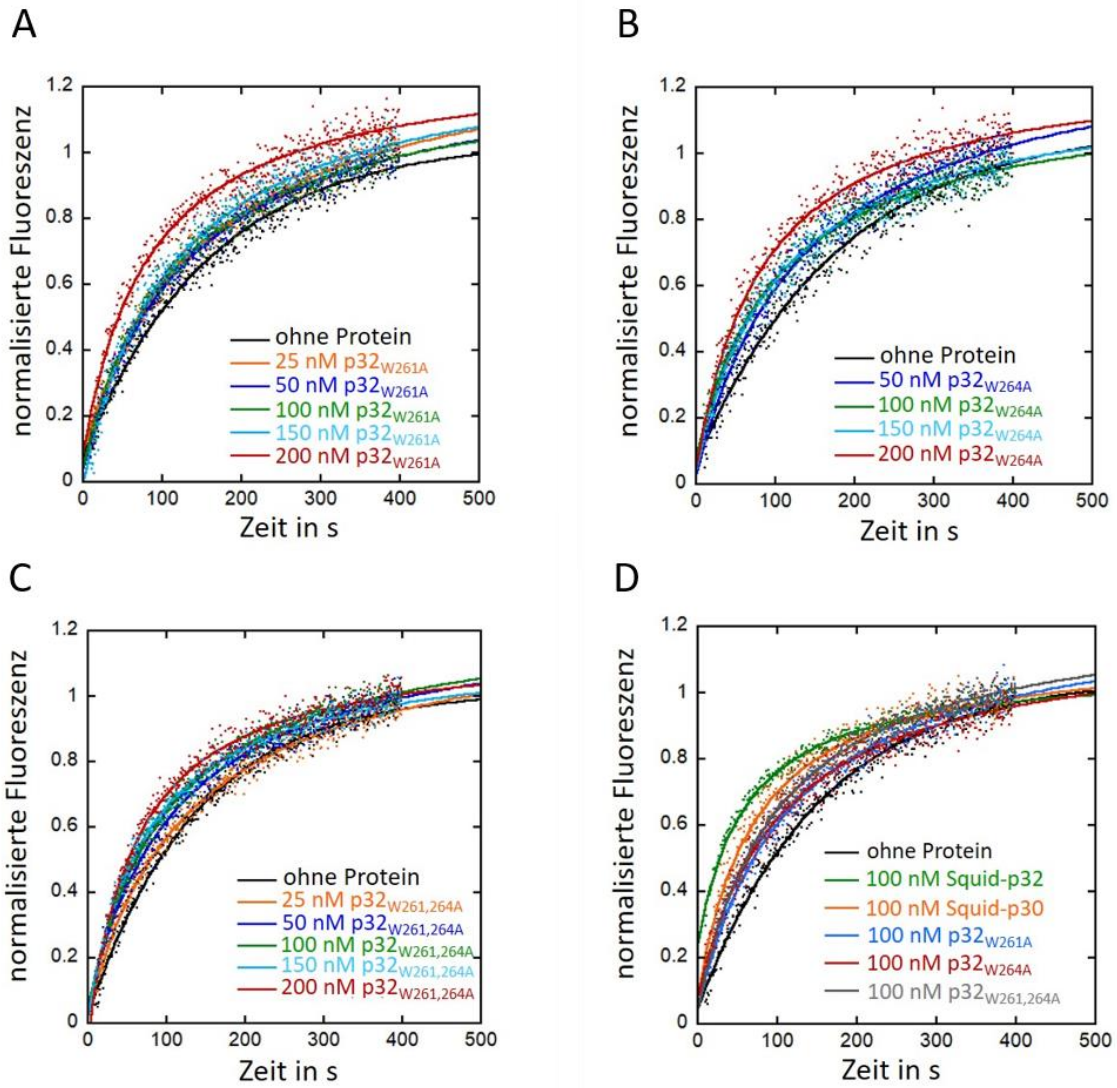
Protein	AU/GU-reiche RNA $K_D$ (nM)	ssRNA $K_D$ (nM)
<b>AUF1p45<sup>a</sup></b>	1.6 ± 0.5	157 ± 24
<b>Squid-p32</b>	130 ± 11	680 ± 79
<b>Squid-p30</b>	13 ± 0.8	250 ± 92
<b>Squid-p32<sub>W261A</sub></b>	14.6 ± 2.6	557 ± 118
<b>Squid-p32<sub>W264A</sub></b>	12.5 ± 2.5	348 ± 54.5
<b>Squid-p32<sub>W261,264A</sub></b>	14 ± 3.7	245 ± 36

<sup>a</sup>Messungen der RNA-Bindung von AUF1p45 von Susann Friedrich durchgeführt (Meyer *et al.* 2019). Die  $K_D$ -Werte und die Standard-Abweichungen wurden in mindestens drei unabhängigen Messungen generiert.

### 3.2.4. Die Substitution der Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs von Squid-p32 beeinträchtigt dessen RNA-Chaperon-Aktivität

Um nun zu untersuchen, ob die Substitution der Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs von Squid-p32 einen Einfluss auf dessen RNA-Chaperon-Aktivität hat, wurden die Squid-p32-Varianten p32<sub>W261A</sub>, p32<sub>W264A</sub> und p32<sub>W261,264A</sub> ebenfalls im fluorimetrischen RNA-Destabilisierungs-Assay getestet (Abb. 18A-C). Die Messungen erfolgten wie bereits unter 3.1.4. beschrieben.

Dabei war mit zunehmender Konzentration der Squid-p32-Varianten im Vergleich zu Proben ohne Protein ein etwas schnellerer Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 18A-C), welcher sich in einem ebenso leichten Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten widerspiegelte (Tabelle 10). Die Squid-p32-Varianten unterscheiden sich untereinander kaum und zeigen eine verminderte RNA-Chaperon-Aktivität verglichen mit dem WT-Protein (Abb. 18D, E). Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs einen wichtigen Beitrag zur RNA-Chaperon-Aktivität des Squid-Proteins leisten.



**Abbildung 18: Die Squid-p32-Varianten zeigen eine verminderte RNA-Chaperon-Aktivität verglichen mit dem WT-Protein. (A)** Zunächst wurde die Fluoreszenz der 3'SL<sup>trunc</sup>-RNA allein und anschließend unter Zugabe von Squid-p32<sub>W261A</sub> in ansteigender Konzentration gemessen. Mit Zugabe von 5'UAR-RNA wurde die Reaktion gestartet und fluorimetrisch weiterverfolgt. Die gemessenen Fluoreszenzsignale wurden auf das Startsignal normalisiert, gegen die Zeit aufgetragen und mit einer Reaktion erster Ordnung (Gleichung 2) oder einer Reaktion zweiter Ordnung (Gleichung 3) gefittet. **(B)** Unter den gleichen Bedingungen wie unter (A) beschrieben wurde Squid-p32<sub>W264A</sub> in ansteigender Konzentration gemessen. **(C)** Unter den gleichen Bedingungen wie unter (A) beschrieben wurde Squid-p32<sub>W261,264A</sub> in ansteigender Konzentration gemessen. **(D)** Vergleich der normalisierten Fluoreszenzsignale von 100 nM Squid-Protein und der Squid-p32-Varianten, aufgetragen gegen die gemessene Zeit. **(E)** Übersicht der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Squid-Proteine und Squid-p32-Varianten, welche gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen und linear gefittet wurden. Dabei wurden die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten aus Abb. 10A, 10C, 18A, 18B, und 18C verwendet.

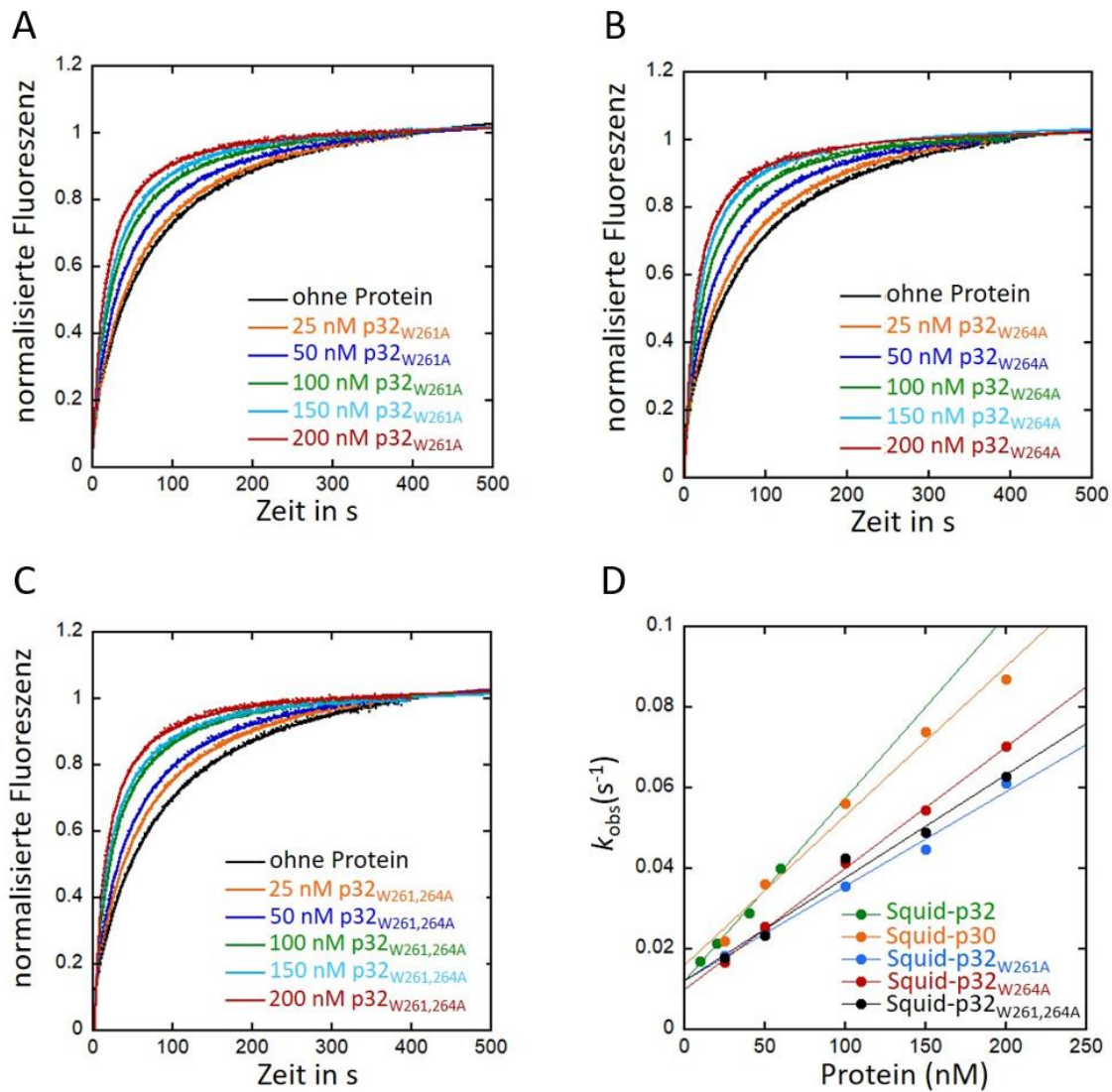
Tabelle 10: Übersicht der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten aus Abb. 18

Proteinkonz. (nM)	$k_{obs}$ (s <sup>-1</sup> )		
	Squid-p32 <sub>W261A</sub>	Squid-p32 <sub>W264A</sub>	Squid-p32 <sub>W261,264A</sub>
0	0.0062	0.0055	0.0071
25	0.0063	-	0.0078
50	0.0077	0.0072	0.0088
100	0.0084	0.0093	0.0098
150	0.0088	0.0095	0.0127
200	0.0117	0.0116	0.0144

### 3.2.5. Die Substitution der Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs von Squid-p32 beeinträchtigt dessen RNA-*annealing*-Aktivität

Da die Squid-p32-Varianten bereits einen partiellen Verlust der RNA-Chaperon-Aktivität aufwiesen, war es von Interesse zu untersuchen, ob die RNA-*annealing*-Aktivität ebenso betroffen ist. Um dies zu untersuchen wurden die Squid-p32-Varianten im RNA-*annealing*-Assay getestet (Abb. 19A-C). Die Messungen erfolgten wie bereits unter 3.1.5. beschrieben.

Dabei war zu beobachten, dass alle Squid-p32-Varianten weiterhin eine RNA-*annealing*-Aktivität zeigen, welche sich innerhalb der Varianten kaum unterscheidet (Abb. 19D). Verglichen mit dem WT-Squid-p32 ist die RNA-*annealing*-Aktivität aber leicht vermindert. So kann geschlussfolgert werden, dass die Tryptophane scheinbar ebenfalls einen begrenzten Einfluss auf die RNA-*annealing*-Aktivität haben.



**Abbildung 19: Die Squid-p32-Varianten zeigen eine leicht verminderte RNA-annealing-Aktivität im Vergleich zum WT-Protein. (A)** Zunächst wurde die Fluoreszenz der 3'CS-RNA allein und anschließend unter Zugabe von Squid-p32<sub>W261A</sub> in ansteigender Konzentration gemessen. Mit Zugabe der 5'CS-RNA wurde die Reaktion gestartet und weiter fluorimetrisch verfolgt. Die gemessenen Fluoreszenzsignale wurden auf das Startsignal normalisiert, gegen die Zeit aufgetragen und mit einer Reaktion zweiter Ordnung gefittet. **(B)** Squid-p32<sub>W264A</sub> wurde in ansteigender Konzentration unter den gleichen Bedingungen wie unter (A) beschrieben gemessen. **(C)** Unter den gleichen Bedingungen wie unter (A) beschrieben wurde Squid-p32<sub>W261,264A</sub> in ansteigender Konzentration gemessen. **(D)** Übersicht der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Squid-Proteine und Squid-p32-Varianten, welche gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen und linear gefittet wurden. Dabei wurden die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten aus Abb. 12A, 12C, 19A, 19B und 19C verwendet.

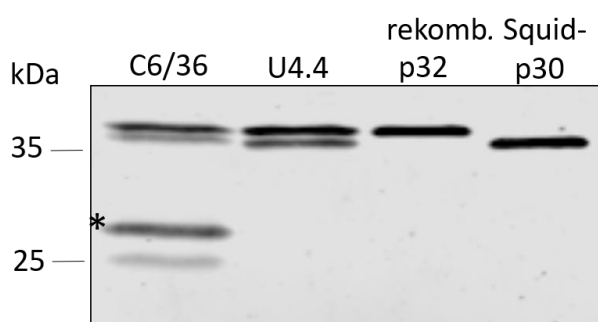
Tabelle 11: Übersicht der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten aus Abb. 19

Proteinkonz. (nM)	$k_{obs}$ (s <sup>-1</sup> )		
	Squid-p32 <sub>W261A</sub>	Squid-p32 <sub>W264A</sub>	Squid-p32 <sub>W261,264A</sub>
0	0.0146	0.0131	0.0128
25	0.0183	0.0168	0.0178
50	0.0248	0.0256	0.0233
100	0.0354	0.0415	0.0426
150	0.0448	0.0544	0.0488
200	0.0611	0.0703	0.0629

### 3.3. Analyse der Squid-Proteine in Mosquitozellen

#### 3.3.1. Detektion der Squid-Proteine in verschiedenen Mosquitozellen

Die bisher unbekanntes Mosquito-Proteine Squid-p30 und Squid-p32 wurden in den vorangegangenen Kapiteln *in vitro* charakterisiert, jedoch gibt es bisher noch keine *in cellulo*-Daten. Die verwendeten Mosquitozelllinien C6/36 und U4.4. stammen aus *A. albopictus* Larven. So wurde zunächst, um die Proteine in einem Western Blot detektieren zu können, ein Antikörper gegen das aus *E. coli* gereinigte Vollängen-Squid-p32-Protein von der Firma Eurogentec generiert ( $\alpha$ -p32). Für die Herstellung wurde ein Kaninchen mit dem gereinigten Squid-p32 Protein immunisiert. Da Squid-p30 zu großen Teilen mit Squid-p32 identisch ist erkennt dieser Antikörper ebenso Squid-p30. In Zellextrakten aus C6/36- und U4.4-Zellen konnten so zwei Proteine detektiert werden, welche in der SDS-PAGE auf derselben Höhe wie die aus *E. coli* rekombinant gereinigten Isoformen Squid-p30 und Squid-p32 migrieren (Abb. 20). In C6/36-Zellextrakten konnten außerdem zusätzliche Proteinbanden detektiert werden, welche vermutlich Abbauprodukte von Squid-p30 darstellen (Abb. 20). Dies wird vermutet, da die transiente Expression von FLAG-Squid-p30, jedoch nicht die von FLAG-Squid-p32 zu solchen Abbauprodukten führte (3.1.2.).



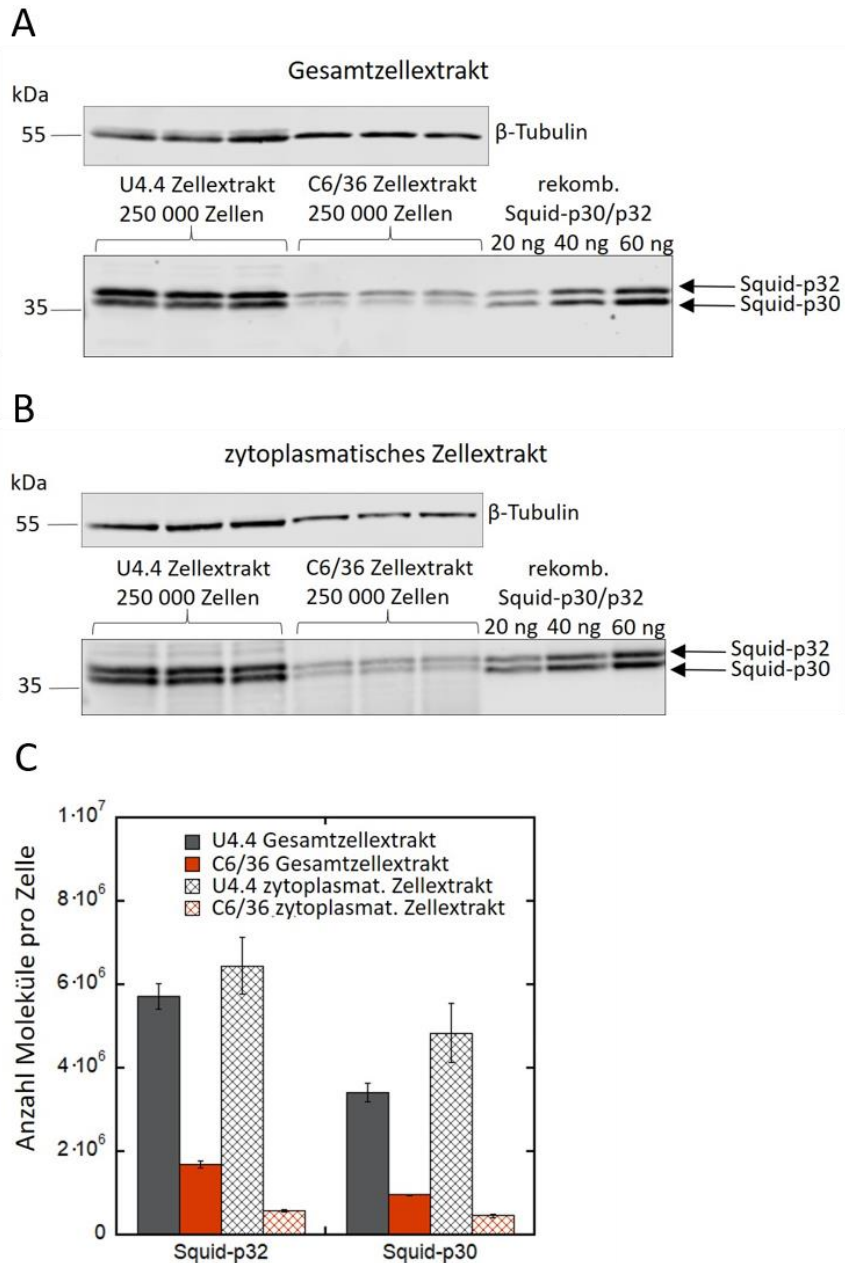
**Abbildung 20: Detektion der Squid-Proteine in C6/36- und U4.4-Zellen.** Zu sehen ist ein Western Blot in welchem Squid-p32 und Squid-p30 in C6/36- und U4.4-Zellen nachgewiesen werden konnten. Es wurde Zellysate entsprechend 10  $\mu$ g Gesamtprotein oder 50 ng gereinigtes rekombinantes Protein in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem  $\alpha$ -p32 Antikörper (erkennt auch p30) detektiert. Der Stern markiert ein Abbauprodukt was vermutlich von Squid-p30 stammt.

Des Weiteren war es von Interesse, zu untersuchen, ob in beiden Zelllinien die gleiche Anzahl Squid-p30- und Squid-p32 Moleküle pro Zelle vorhanden sind. Dabei wurde zwischen Gesamtzellextrakt und zytoplasmatischen Zellextrakt unterschieden. Die Menge an Mosquito-Protein in einer definierten Anzahl von Zellen wurde mittels Western Blot und Verdünnungsreihe der rekombinant gereinigten Squid-Proteine mit bekannter Konzentration analysiert (Abb. 21A, B). Die Anzahl der Squid-p32 Moleküle in U4.4-Zellen im Gesamtzellextrakt, sowie im zytoplasmatischen Zellextrakt ist ähnlich. Ebenso ist die Molekülanzahl für Squid-p30 im Zytoplasma verglichen mit der Anzahl in der gesamten Zelle ähnlich. Squid-p32 zeigt in beiden Zellextrakten eine leicht höhere Abundanz als Squid-p30 (Abb. 21C).

In C6/36-Zellen ist die Anzahl der Squid-p32 Moleküle in der Gesamtzelle um beinahe den Faktor 3 höher, als im Zytoplasma. Bei Squid-p30 beträgt der Unterschied von Gesamtzelle zu Zytoplasma Faktor 2. Die Molekülanzahl von Squid-p32 verglichen mit Squid-p30 ist in der Gesamtzelle sehr ähnlich und im Zytoplasma identisch. Die größten Unterschiede sind zu beobachten, wenn man die Zelllinien untereinander vergleicht. So war für beide Squid-Proteine im Gesamtzellextrakt eine 3.5-fach höhere Molekülanzahl und im Zytoplasma eine 10-fach höhere Molekülanzahl in U4.4-Zellen zu beobachten (Abb. 21C). Dies ist vermutlich auf die unterschiedliche Größe der Mosquitozellen zurückzuführen, da die U4.4-Zellen deutlich größer sind als die C6/36-Zellen. In U4.4-Zellen kommen die Squid-Proteine vermutlich größtenteils im Zytoplasma vor, da kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellextrakten detektiert werden konnten. In C6/36-Zellen kommen die Squid-Proteine vermutlich nur zum Teil im Zytoplasma, aber auch im Zellkern vor.

Zusätzlich war es von Interesse die Abundanz der Squid-Proteine in Mosquitozellen mit der des humanen AUF1p45 in Huh7-Zellen zu vergleichen. In einem zytoplasmatischen Zellextrakt konnten von AUF1p45 ca.  $2.2 \cdot 10^6$  Moleküle pro Zelle quantifiziert werden (Daten von Dr. Susann Friedrich, Daten nicht gezeigt). Die Molekülanzahl von AUF1p45 ist verglichen mit der Molekülanzahl der Squid-Proteine in U4.4-Zellen fast um Faktor 3 geringer und um Faktor 4 höher als in C6/36-Zellen. Somit liegt die Molekülanzahl der Mosquito-Proteine und AUF1p45 in etwa in der gleichen Größenordnung.



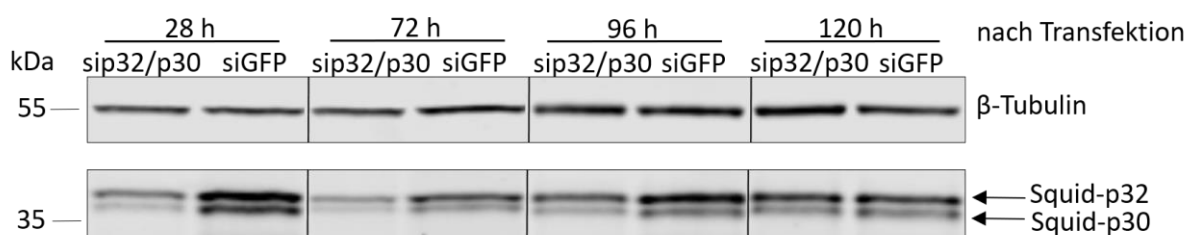


**Abbildung 21: Die Squid-Proteine sind in U4.4-Zellen deutlich abundanter als in C6/36-Zellen. (A)** Dieser Western Blot wurde für die Analyse der Squid-p30 und Squid-p32 Molekülanzahl im Gesamtzellextrakt genutzt. Je  $1 \cdot 10^6$  Zellen wurden in  $20 \mu\text{l}$  RIPA-Puffer gelöst, inkubiert und abzentrifugiert. Von dem resultierenden Zelllysat wurden  $5 \mu\text{l}$  in einer 12%igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die Squid-Proteine mit einem  $\alpha$ -p32 Antikörper detektiert. Die Analyse der Mosquito-Proteine wurde in einer Dreifachbestimmung durchgeführt und als Ladekontrolle für die Zellproben diente ein  $\beta$ -Tubulin spezifischer Antikörper. **(B)** Dieser Western Blot wurde für die Analyse der Squid-p30 und Squid-p32 Molekülanzahl im zytoplasmatischen Zellextrakt genutzt. Je  $1 \cdot 10^6$  Zellen wurden in  $20 \mu\text{l}$  1x Lysis-Puffer (Promega) gelöst, inkubiert und abzentrifugiert. Alle weiteren Bedingungen sind wie unter (A) aufgeführt. **(C)** Darstellung der Anzahl an Squid-p32 und Squid-p30 Molekülen in verschiedenen Zellextrakten. Hierfür wurden die detektierten Signale unter (A) und (B) quantifiziert und mit Hilfe der Verdünnungsreihe der rekombinant gereinigten Squid-Proteine mit bekannter Konzentration analysiert. Zur Berechnung der Molekülanzahl pro Zelle diente das Molekulargewicht der Proteine und die Avogadro-Konstante.

### 3.3.2. RNAi-vermittelte Depletion von Squid-p30 und Squid-p32 in C6/36-Zellen

Der humane Wirtsfaktor AUF1p45 unterstützt die Replikation des WNV in Huh7-Zellen. So führt dessen Depletion zu einer Verzögerung des WNV-Infektionsverlaufes. Dies konnte mit Hilfe von Transfektions-Experimenten mit WNVRLuc-Replikon, sowie mit infektiösem WNV (WNV-Stamm 3356) nachgewiesen werden. Insbesondere in der Anfangsphase der Replikation (24 h nach Transfektion) zeigt AUF1p45 den größten Einfluss auf die Replikation (Friedrich *et al.* 2014).

Um nun zu untersuchen, ob die zu AUF1p45-homologen Mosquito-Proteine einen ähnlichen Einfluss auf die WNV-Replikation haben, wurde zunächst versucht, diese mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi) in Mosquitozellen zu depletieren. Dafür wurde *small interfering RNA* (siRNA) genutzt, welche spezifisch die *messenger RNA* (mRNA) von Squid-p30 und Squid-p32 als Zielsequenz hat (sip30/p32). Von dieser siRNA wurden 1200 pmol in C6/36-Zellen und parallel dazu 1200 pmol einer Kontroll-siRNA (siGFP, für das *green fluorescent protein* kodierend) mittels Elektroporation transfiziert. Dieser sogenannte *knockdown* von Squid-p30 und Squid-p32 wurde anschließend mittels Western Blot analysiert (Daten nicht gezeigt). Da die Depletion der Squid-Proteine nicht effektiv war und noch viel endogenes Protein mittels Western Blot detektiert werden konnte, wurde die siRNA anschließend zweimal hintereinander in die Zellen transfiziert. So wurden die Zellen nach der ersten Transfektion der siRNA mit einem Abstand von 48 h das zweite Mal transfiziert. Diese Doppel-Transfektion konnte zwar den *knockdown* von Squid-p30 und Squid-p32 verstärken, jedoch war dieser nicht langanhaltend (Abb. 22).



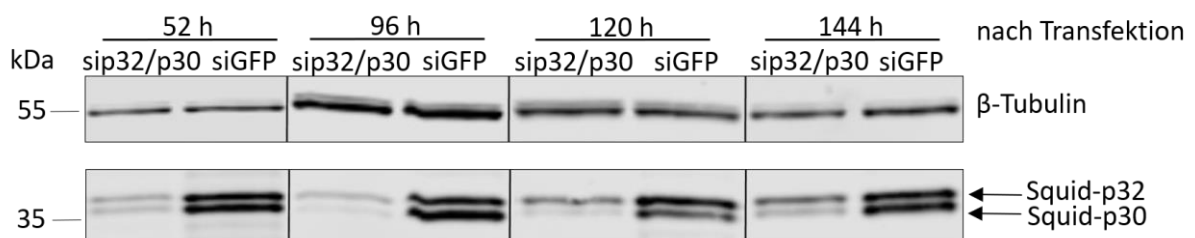
**Abbildung 22: Western Blot zur Detektion der siRNA-vermittelten Depletion von Squid-p30 und Squid-p32 in C6/36-Zellen.** Die Zellen wurden zwei Mal mit siRNA in 48 h Abstand transfiziert. Die Depletion der Squid-Proteine wurde anschließend mittels Western Blot analysiert. Dafür wurde Zelllysate entsprechend 10 µg Gesamtprotein der *knockdown*-Zeitreihe von Squid-p30 und Squid-p32 in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem α-p32 Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente ein β-Tubulin spezifischer Antikörper.

Der *knockdown* der Squid-Proteine ist bei 28 h bis 96 h nach Transfektion gut sichtbar, wird aber ab 96 h nach Transfektion wieder schlechter, bis bei 120 h nach Transfektion kein Unterschied mehr zur Kontrolle sichtbar ist (Abb. 22).

Ein Grund für die ineffiziente Depletion von Squid-p30 und Squid-p32 ist vermutlich, dass die C6/36-Zellen ein funktionsgestörtes RNAi-System besitzen (Brackney *et al.* 2010). Morazzani *et al.* (2012) konnten für C6/36-Zellen zeigen, dass das für die RNAi-Komponente Dicer-2 kodierende Gen eine homozygote Deletion von einem Basenpaar aufweist, was zu einem *frameshift* mit einem frühzeitigen Stopp-Codon führt. Dies resultiert in einer verkürzten, nicht funktionsfähigen Protein-Variante, welcher die wichtige sogenannte PAZ-Domäne und die zwei RNase-III-Domänen fehlen. Zur Optimierung des Transfektions-Prozesses wurden alternativ zur Elektroporation verschiedene Transfektions-Reagenzien wie CellfectinII (Thermo Fisher Scientific) oder X-tremeGENE™HP DNA (Merck), sowie verschiedene siRNAs getestet. Jedoch ließ sich die *knockdown*-Effizienz nicht verbessern (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.3. RNAi-vermittelte Depletion von Squid-p30 und Squid-p32 in U4.4-Zellen

Eine weitere Mosquitozelllinie, welche aus *A. albopictus* Larven generiert wurde, sind die U4.4-Zellen. Da diese Zelllinie, im Gegensatz zu C6/36-Zellen, ein intaktes RNAi-System aufweist, wurde nun versucht in dieser Zelllinie eine effizientere siRNA-vermittelte Depletion der Squid-Proteine zu generieren. Dafür wurden 600 pmol, der bereits unter 3.3.2. beschriebenen siRNAs mittels Elektroporation transfiziert. Der *knockdown* von Squid-p30 und Squid-p32 wurde anschließend mittels Western Blot analysiert (Abb. 23). Die Depletion der Squid-Proteine in U4.4-Zellen war trotz der reduzierten siRNA-Menge deutlich effizienter als in C6/36-Zellen. 52 h nach Transfektion der siRNA ist ein deutlicher *knockdown* von Squid-p30 und Squid-p32 erkennbar. Diese Depletion wird bis 96 h nach der Transfektion noch effizienter und hält dann bis mindestens 144 h nach Transfektion an (Abb. 23).



**Abbildung 23: Western Blot zur Detektion der siRNA-vermittelten Depletion von Squid-p30 und Squid-p32 in U4.4-Zellen.** Die Zellen wurden mit siRNA transfiziert und die Depletion der Squid-Proteine anschließend mittels Western Blot analysiert. Es wurden 10 µg Gesamtprotein der *knockdown*-Zeitreihe von Squid-p30 und Squid-p32 in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem α-p32 Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente ein β-Tubulin spezifischer Antikörper.

### 3.3.4. Das WNV-Replikon repliziert in U4.4-Zellen ineffizient

Die Etablierung von sogenannten Replikon-Systemen ermöglichte die gezielte Forschung am Prozess der viralen Replikation, unabhängig von Zusammenbau und Reifung der Viruspartikel. So konnten Proteine, Motive und RNA-Sequenzen, welche direkt an der RNA-Replikation beteiligt sind, genauer bestimmt werden (Khromykh und Westaway 1997). Bei subgenomischen Replikons ist ein großer Teil der Regionen deletiert, welche für die virale Replikation nicht essentiell sind. Das erste WNV-Replikon der Abstammungslinie I wurde von Shi *et al.* (2002) generiert. Bei diesem WNV-Replikon sind über 92 % der Strukturgene deletiert, so dass keine infektiösen Viruspartikel mehr gebildet werden können. Da das Replikon aber die intakten Nichtstrukturgene, sowie die 3' und 5'UTR enthält, kann es autonom replizieren (Shi *et al.* 2002). Das in dieser Arbeit verwendete Reporter-Replikon basierend auf Shi *et al.* (2002) wurde von Friedrich *et al.* (2014) generiert und enthält zusätzlich eine Sequenz, welche für die *Renilla*-Luziferase kodiert (nach Lo *et al.* 2003, Abb. 24A). Diese Sequenz ist *in-frame* zum offenen Leserahmen in den Bereich der deletierten Strukturgene eingefügt worden. Mit Hilfe dieses Reporter-Replikons kann zwischen den Prozessen der Translation und Replikation unterschieden werden (Lo *et al.* 2003). Zusätzlich wurde von Friedrich *et al.* (2014) an das 3'-Ende ein Hepatitis-Delta-Ribozym (HDVr) fusioniert, welches nach Abspaltung das native WNV 3'-Ende generiert (nach Tilgner und Shi 2004).

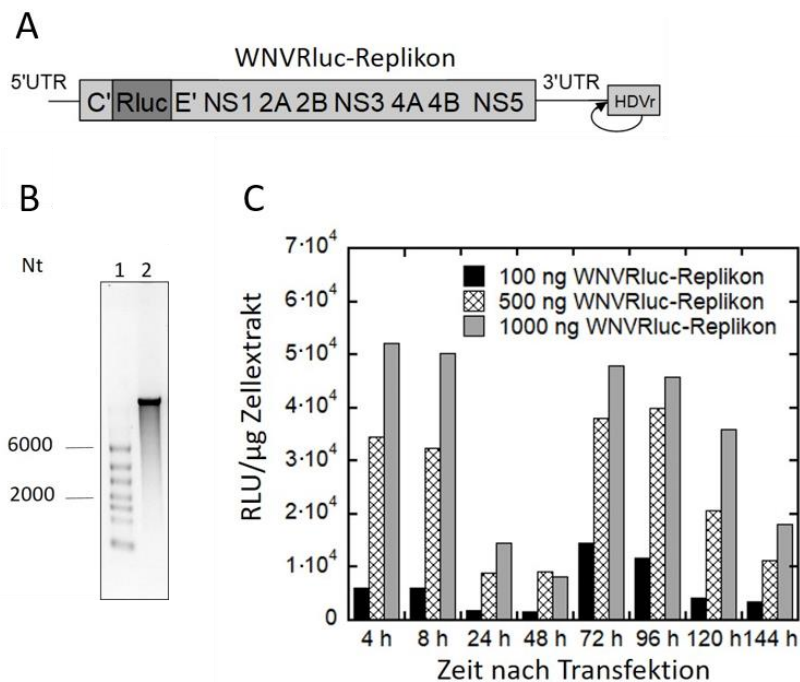
Da der *knockdown* von Squid-p30 und Squid-p32 erfolgreich in U4.4-Zellen etabliert werden konnte, war der nächste Schritt zur Untersuchung der Funktion der Squid-Proteine die Transfektion eines solchen WNVRLuc-Replikons in die Mosquitozellen (Abb. 24A).

Das Plasmid pWNVRLucHDVr kodiert für das WNV-Replikon und wurde mit dem Restriktionsenzym *Xba*I linearisiert. Die Replikon-RNA wurde mit Hilfe einer *in vitro* Transkription generiert und eine ausreichende Qualität und korrekte Größe von ca. 9800 Nt mit einer 1%igen Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese bestätigt (Abb. 24B).

Die Transfektion des Replikons erfolgte mit Hilfe von Elektroporation unter den gleichen Bedingungen, wie die siRNA Transfektion. Zunächst wurden naive U4.4-Zellen mit WNVRLuc-Replikon getestet, um einen unbeeinträchtigten Replikationsverlauf des Replikons in dieser Zelllinie zu verfolgen. Dafür wurden naive U4.4-Zellen mit unterschiedlichen Mengen WNVRLuc-Replikon transfiziert. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert und die *Renilla*-Luziferase-Aktivität gemessen. Nach Auswertung der Daten ist ein klassischer Translations- und Replikationsverlauf zu sehen (Lo *et al.* 2003). Bei frühen Zeitpunkten nach der Transfektion (4 h nach Transfektion) ist eine hohe Aktivität zu verzeichnen, welche der Translation der eingebrachten RNA entspricht. Darauf folgt eine Lag-Phase, in welcher die Aktivität sinkt.

Nach 48 h/72 h nach Transfektion steigt die Aktivität wieder an, was die Replikation der WNV-RNA repräsentiert. Jedoch sind die Werte der Replikation kaum höher als die der Translation, was nach Erfahrungswerten auf eine sehr ineffiziente Replikation hindeutet (Abb. 24C). Dies steht im Gegensatz zum Replikationsverhalten der WNV-RNA in C6/36- oder Huh7-Zellen. Ein Grund hierfür ist vermutlich das intakte RNAi-System der U4.4-Zellen, welches die Replikon-RNA abbauen könnte.

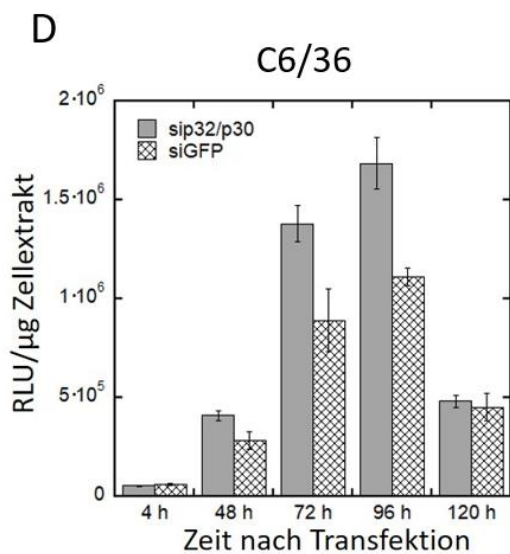
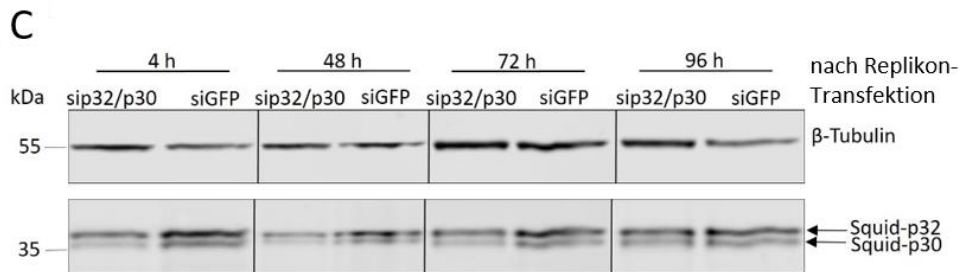
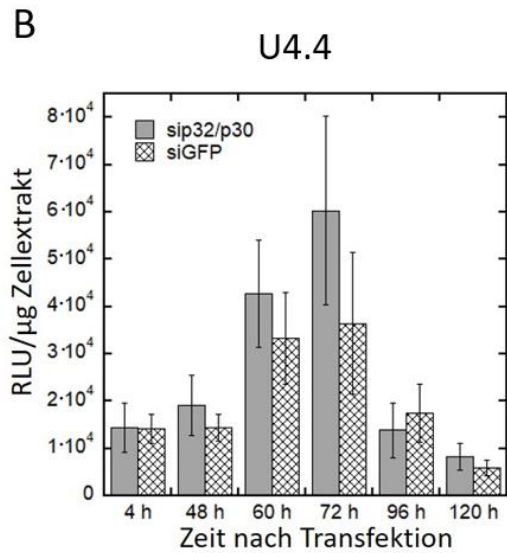
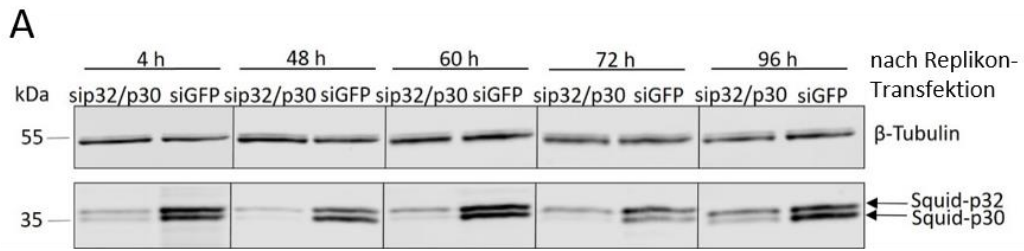
Zur Optimierung des Transfektions-Prozesses in dieser Zelllinie wurden unterschiedliche Transfektions-Reagenzien wie verschiedene Polyethylenimine (PEI) oder Elektroporations-Bedingungen variierend in den Elektroporations-Küvetten und der Kombination aus Spannung, Kapazität und Widerstand getestet (Daten nicht gezeigt). Dies führte jedoch nicht zu einer deutlichen Verbesserung der Transfektion.



**Abbildung 24: Das WNVRLuc-Replikon repliziert ineffizient in U4.4-Zellen.** (A) Schematische Darstellung der Genomorganisation des Renilla-Luziferase-Reporter-WNV-Replikons von Friedrich *et al.* (2014). Ca. 90 % der Strukturgene dieses Replikons sind deletiert, stattdessen enthält es eine für die *Renilla*-Luziferase kodierende Sequenz (Lo *et al.* 2003). Da es die intakten Nichtstrukturgene, sowie die 3' und 5'UTR enthält, kann dieses Replikon autonom replizieren (Shi *et al.* 2002). Am 3'-Ende enthält es zusätzlich ein Hepatitis-Delta-Ribozym (HDVr), welches nach Abspaltung das native WNV 3'-Ende generiert. (B) Das Plasmid pWNVRLucHDVr wurde mit *Xba*I linearisiert und anschließend als *template* für eine *in vitro* Transkription eingesetzt. In Spur 2 wurden ca. 400 ng WNVRLuc-RNA in einem Formaldehyd-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Marker ist in Spur 1 zu sehen und die Größen sind angegeben. (C) Naive U4.4-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen WNVRLuc-Replikon transfiziert, um die generelle Replikationsfähigkeit des Replikons zu untersuchen. Dafür wurde zu verschiedenen Zeitwerten die Renilla-Luziferase-Aktivität jeder Probe in einer Doppelbestimmung gemessen und die resultierenden *relative light units* (RLU) auf 1 µg Zellextrakt normalisiert.

### 3.3.5. Die Depletion der Squid-Proteine hat keinen negativen Effekt auf die WNV-Replikation in Mosquitozellen

Um die Renilla-Luziferase-Aktivität zuverlässig messen zu können, wurde entschieden die größte getestete Menge Replikon-RNA (1 µg) in U4.4-Zellen zu transfizieren. Die Squid-Proteine wurden zwei Tage vorher, wie unter 3.3.3. beschrieben, depletiert. Der erfolgreiche *knockdown* von Squid-p30 und Squid-p32 wurde mittels Western Blot bestätigt (Abb. 25A). Zeitwerte wurden ab 4 h nach Transfektion der Replikon-RNA bis 120 h nach Transfektion analysiert. Die Depletion der Squid-Proteine zeigte keinen negativen Einfluss auf die Replikation des WNVrluc-Replikons. Bei 72 h nach Transfektion ist eher noch ein gegenteiliger Effekt, ein leichter Anstieg der Replikationsrate zu beobachten (Abb. 25B). Dieses Experiment wurde ebenfalls in C6/36-Zellen durchgeführt. Dabei war zu beobachten, dass die Effizienz der Replikation des WNVrluc-Replikons erwartungsgemäß deutlich höher war als in U4.4-Zellen (Abb. 25D). Die *knockdown*-Effizienz von Squid-p30 und Squid-p32 war, wie ebenfalls erwartet, deutlich schlechter (Abb. 25C). Auch in dieser Zelllinie ist kein negativer Effekt der Depletion der Squid-Proteine auf die WNV-Replikation festzustellen (Abb. 25D). Die Squid-Proteine zeigen somit in zwei verschiedenen Mosquitozelllinien keine Unterstützung der WNV-Replikation, im Gegensatz zu AUF1p45, dessen Depletion in Huh7-Zellen die WNV-Replikation verzögerte. Zusätzlich zu den Replikon-Experimenten wurden ebenso Infektionsexperimente mit WNV von Grit Szczepankiewicz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Liebert (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Leipzig) durchgeführt. Aber auch hier konnte kein negativer Einfluss der Depletion der Squid-Proteine auf die WNV-Vermehrung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 25: Die Depletion der Squid-Proteine hat keinen negativen Einfluss auf die Replikation des WNVRLuc-Replikons. (A)** Darstellung des Western Blots zur Überprüfung der Depletion von Squid-p30 und Squid-p32. Es wurden 10 µg Gesamtprotein der transfizierten U4.4-Zellen in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem α-p32 Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente ein β-Tubulin spezifischer Antikörper. **(B)** Die Squid-Proteine wurden in U4.4-Zellen mittels siRNA-Transfektion depletiert und 48 h später mit 1 µg WNVRLuc-Replikon transfiziert. Die Renilla-Luziferase-Aktivität wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und die resultierenden RLU auf 1 µg Zellextrakt normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung eines in Dreifachbestimmung durchgeführten, repräsentativen Experiments. **(C)** Der Nachweis der Depletion der Squid-Proteine in den C6/36-Zellen wurde wie unter (A) beschrieben durchgeführt und ausgewertet. **(D)** Die Squid-Proteine wurden in C6/36-Zellen mittels doppelter siRNA-Transfektion depletiert. 48 h nach der ersten siRNA-Transfektion folgte die zweite siRNA-Transfektion und 24 h später wurden die Zellen mit 1 µg WNVRLuc-Replikon transfiziert. Alle weiteren Versuchsbedingungen und Auswertungen wurden wie unter (B) beschrieben durchgeführt.

### 3.3.6. Die Depletion der Squid-Proteine hat auch bei höheren Temperaturen keinen negativen Einfluss auf die WNV-Replikation

Wie bereits unter 3.1.6. beschrieben, ist ein unterschiedlicher WNV-Replikationsverlauf in verschiedenen Zelllinien abhängig von der Kultivierungstemperatur. So ist eine erhöhte Temperatur ebenso mit einer erhöhten Flexibilität des WNV 3'SL verbunden, welche wiederum einen positiven Einfluss auf den Replikationsverlauf hat (Meyer *et al.* 2020).

Da bei der Depletion der Squid-Proteine während einer Kultivierung bei 28°C kein Effekt auf die WNV-Replikation ersichtlich war, war es von Interesse zu untersuchen, ob die Squid-Proteine *in cellulo* möglicherweise eine temperaturabhängige Aktivität aufweisen oder ob deren Aktivität von der erhöhten Flexibilität des 3'SL profitiert.

So wurden die Experimente, welche unter 3.3.5 erläutert wurden, bei einer Kultivierungstemperatur von 37°C wiederholt. Das heißt, die Zellen wurden direkt nach der Transfektion der Replikon-RNA bei einer höheren Temperatur kultiviert. Für U4.4-Zellen musste die Temperatur etwas niedriger, auf 34°C angepasst werden, da eine Inkubation bei 37°C morphologische Veränderungen der Zellen induzierte. Die erfolgreiche Depletion von Squid-p30 und Squid-p32 wurde anschließend mittels Western Blot analysiert (Abb. 26A). Bei erhöhter Kultivierungstemperatur ist die Replikationsrate des WNVRLuc-Replikons niedriger, aber der Replikationsverlauf ist schneller. So ist in U4.4-Zellen die Lag-Phase verkürzt und das Renilla-Luziferase-Maximum wird schon 48 h nach Transfektion der WNVRLuc-RNA erreicht (Abb. 26B).

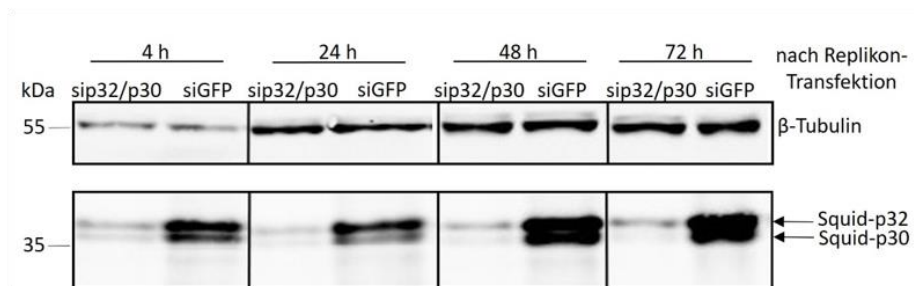
Bei C6/36-Zellen wurden 250 ng WNVRLuc-Replikon-RNA mit Hilfe des Transfektionsreagens Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) transfiziert. Die Translation konnte aufgrund der geringen RLU-Werte 4 h nach Transfektion nicht zuverlässig ausgewertet werden.



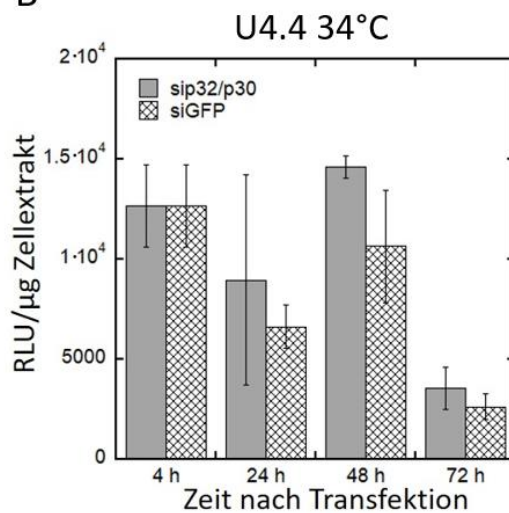
Deshalb wurden die Werte erst ab 24 h nach Transfektion analysiert (Abb. 26D). Dies liegt vermutlich wieder an der hohen Kultivierungstemperatur, welche generell zu niedrigeren RLU-Werten führte. Die erfolgreiche Depletion von Squid-p30 und Squid-p32 wurde anschließend mittels Western Blot festgestellt (Abb. 26C). Auch bei C6/36-Zellen ist mit erhöhter Kultivierungstemperatur die Lag-Phase verkürzt und das Renilla-Luziferase-Maximum wird schon 48 h nach Transfektion der WNVRLuc-RNA erreicht (Abb. 26D).

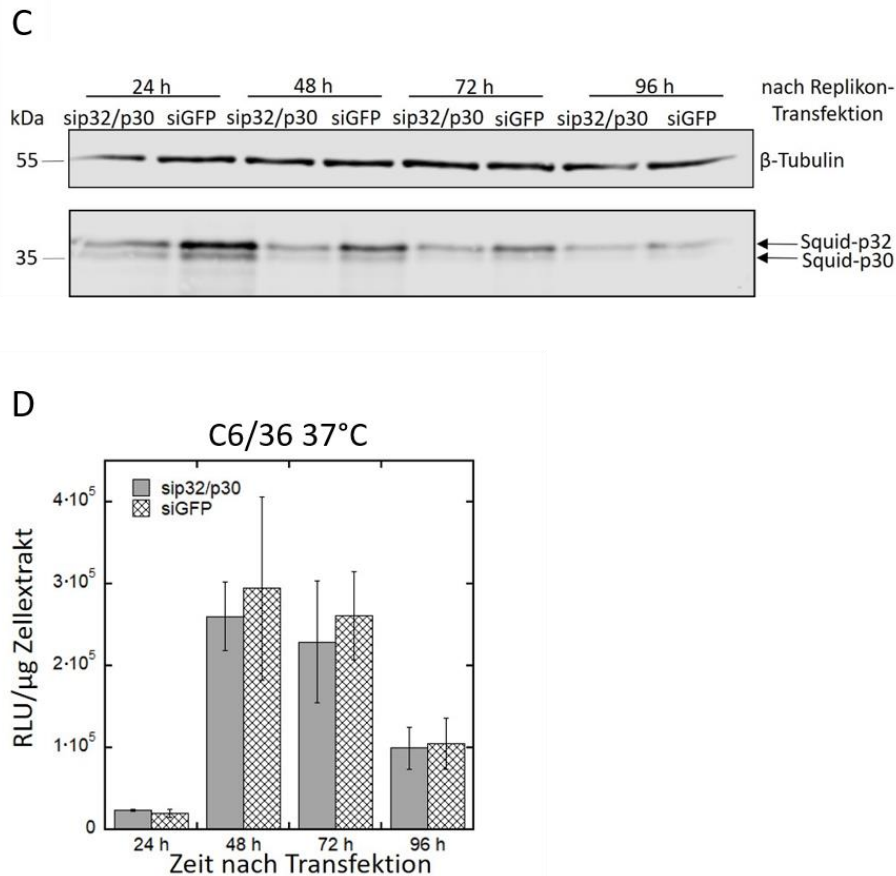
Die Daten zeigen, dass auch mit Erhöhung der Kultivierungstemperatur weder in U4.4-Zellen, noch in C6/36-Zellen ein negativer Effekt der Depletion der Squid-Proteine auf die Replikation sichtbar ist.

A



B





**Abbildung 26: Die Depletion der Squid-Proteine hat auch bei höheren Kultivierungstemperaturen keinen negativen Einfluss auf die Replikation des WNVRLuc-Replikon.** (A) Darstellung des Western Blots zur Überprüfung der Depletion von Squid-p30 und Squid-p32. Es wurden 20  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein der transfizierten U4.4-Zellen in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem  $\alpha$ -p32 Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente ein  $\beta$ -Tubulin spezifischer Antikörper. (B) Die Squid-Proteine wurden in U4.4-Zellen mittels siRNA-Transfektion depletiert, 48 h später mit 1  $\mu\text{g}$  WNVRLuc-Replikon transfiziert und direkt im Anschluss bei 34°C inkubiert. Die Renilla-Luziferase-Aktivität wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und die resultierenden RLUs auf 1  $\mu\text{g}$  Zellextrakt normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung eines in Dreifachbestimmung durchgeführten repräsentativen Experiments. (C) Der Nachweis der Depletion der Squid-Proteine in C6/36-Zellen erfolgte mit Western Blot Analyse von 10  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein. Alle weiteren Bedingungen sind wie unter (A) beschrieben durchgeführt worden. (D) Die Squid-Proteine wurden in C6/36-Zellen mit siRNA-Transfektion depletiert. 24 h später wurden die Zellen mit 250 ng WNVRLuc-Replikon mittels Lipofectamine 2000 transfiziert und direkt im Anschluss bei 37°C inkubiert. Alle weiteren Versuchsbedingungen und Auswertungen wurden wie unter (B) beschrieben durchgeführt.

### 3.4. CRISPR/Cas9-vermittelter Gen-*knockout* von Squid-p30 und Squid-p32

Als weitere Möglichkeit einen Einfluss der Squid-Proteine auf die WNV-Replikation zu untersuchen, wurde versucht mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems einen stabilen *knockout* des Gens, welches für Squid-p30 und Squid-p32 kodiert, in C6/36-Zellen zu generieren. Hierfür wurden C6/36-Zellen verwendet, da die Replikationseffizienz des WNVrluc-Replikons in dieser Zelllinie höher als bei U4.4-Zellen ist.

#### 3.4.1. Erzeugung und Screening der mittels CRISPR/Cas9 generierten Gen-*knockout*-Klone

Mit Hilfe des Plasmids pAC-sgRNA-Cas9 (Abb. 27A) konnte bereits von Varjak *et al.* (2017) in Aag2-Zellen ein stabiler Dicer-2 (*Drc2*) *knockout* (KO) generiert werden. Aag2-Zellen sind ebenfalls Mosquitozellen isoliert aus *A. aegypti*.

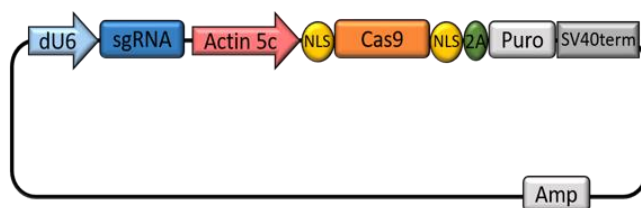
Die spezifischen *single guide*-Oligonukleotide (sgRNA), welche das Cas9-Enzym an die zu schneidende Genomsequenz dirigieren, wurden in den pAC-sgRNA-Cas9 Vektor über das Restriktionsenzym *BspQI* eingefügt. Es wurden insgesamt sechs pAC-sgRNA-Cas9 Konstrukte mit jeweils unterschiedlichen sgRNAs erstellt. Das Screening auf erfolgreich mutierte Squid-p30 und Squid-p32 Klone erfolgte zunächst mittels Western Blot Detektion (Abb.27B). Dabei diente die Quantifizierung des detektierten Squid-p30- und Squid-p32-Signals in nicht transfizierten, naiven C6/36-Zellen als Kontrolle (Abb. 27B). Es wurden ca. 170 Klone mit dieser Methode gescreent, davon konnte im Western Blot bei insgesamt 13 Klonen ein im Vergleich zum WT-Protein deutlich vermindertes Signal festgestellt werden. Bei allen dieser Klone war das Signal sowohl von Squid-p30, als auch von Squid-p32 vermindert (Abb. 27B, Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde bei der Analyse nicht zwischen Squid-p30 und Squid-p32 unterschieden.

Im Western Blot positiv getestete Klone wurden mit Analyse der genomischen DNA weiter untersucht. Der Bereich, in welchem die jeweilige sgRNA binden und dementsprechend die Mutation auftreten sollte, wurde mit flankierenden Primern amplifiziert. Zunächst wurde das resultierende PCR-Fragment direkt per Sequenzierung analysiert und mit der WT-Sequenz verglichen. Bei erfolgreich mutierten Klonen weist die Sequenz Veränderungen in Form von Nukleotid-Deletionen oder -Insertionen auf. In den Chromatogrammen der analysierten Klone waren mit Beginn der Deletionen überlagerte Profile zu sehen (Abb. 27C). Da die Zellen diploid sind, handelt es sich ausschließlich um heterozygote Mutationen bei denen die WT-Sequenz auf einem Allel immer noch vorhanden ist.

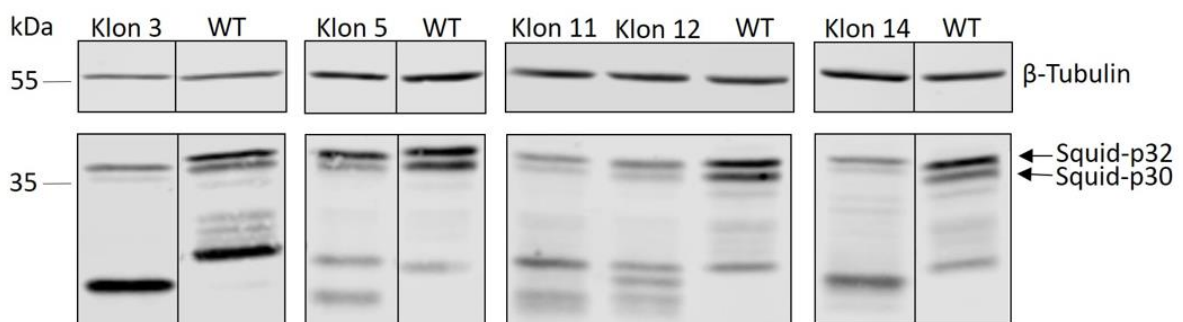
Von den 13 Klonen, welche mittels Sequenzierung analysiert wurden, konnten bei 5 Klonen heterozygote Mutationen festgestellt werden.

Davon führte aber nur die Deletionen von 3 Klonen zu einem *frameshift*. So wurden bei Klon 3 vier Nukleotide deletiert. Dies resultierte in einem *frameshift* und der Synthese von zwei Proteinen mit einem großen Anteil von *nonsense*-Sequenz, welche mit einem Molekulargewicht von 35 kDa und 33 kDa, größer als die Squid-Proteine waren. So wird statt Squid-p32 das 35 kDa Protein generiert und statt Squid-p30 das 33kDa Protein. Bei Klon 5 wurden nur 3 Nukleotide deletiert, was in der *in-frame* Deletion von einem Prolin resultierte. Die restliche Sequenz entspricht der des WT-Proteins. Klon 11 besitzt eine Deletion von 22 Nukleotiden, was zu einem *frameshift* der Squid-Proteine führt. Bei Klon 12 wurden nur 9 Nukleotide deletiert und somit zwei Proline und ein Arginin entfernt, die restliche Sequenz entspricht der des WT-Proteins. Klon 14 zeigte eine Deletion von 14 Nukleotiden (Abb. 27D). Dies führt zu einem *frameshift* von Squid-p32 und zu einer Verkürzung des Proteins auf 28 kDa. Bei Squid-p30 führt der *frameshift* zu einem größeren Protein von 34 kDa (Tabelle 12). Zur Verifizierung der Mutationen wurden die jeweiligen PCR-Fragmente in den pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor subkloniert und einzelne Klone erneut anhand der Sequenzierung analysiert. Die einzelnen Deletionen konnten bestätigt werden. Für Klon 14 konnte eine weitere Deletion auf einem anderen Allel identifiziert werden (siehe 3.4.2.). Es wurden dabei 3 Nukleotide deletiert, was zur Deletion eines Prolins führt, der Rest der Aminosäure-Sequenz ist identisch mit dem WT-Protein. Für weitere Experimente wurden nur die C6/36 Gen-*knockout*-Klone 3, 11 und 14 verwendet, da nur in diesen Zellen ein *frameshift* der kodierenden Sequenz von Squid-p30/p32 detektiert werden konnte.

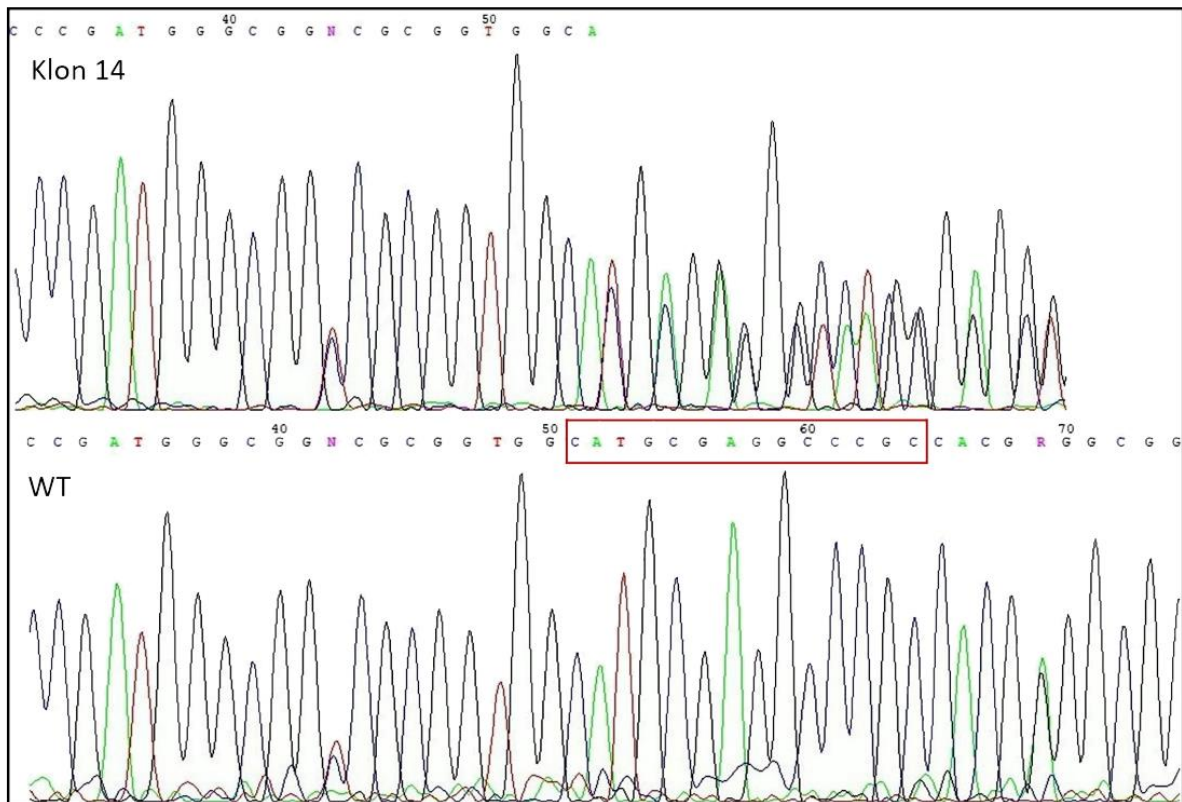
A



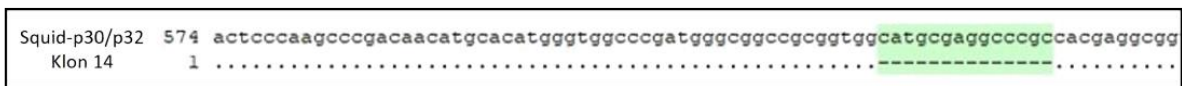
B



C



D



**Abbildung 27: Screening der mittels CRISPR/Cas9 generierten Gen-*knockout*-Klone.**

(A) Schematische Darstellung des verwendeten pAC-sgRNA-Cas9 Plasmids nach Bassett *et al.* 2014. Die Expression der sgRNAs ist unter Kontrolle eines dU6 Promoters. Cas9 wird als Teil eines bicistronischen Transkriptes über einen Actin5C-Promoter kontrolliert und ist N- und C-terminal von einem Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS) flankiert. Die beiden offenen Leseraster werden über die virale 2B *ribosome skipping site* getrennt. Das andere Transkript beinhaltet das Puromycin N-Acetyltransferase Resistenzmarker-Gen und wird über das Polyadenylierungssignal des SV40 Virus (Simian-Virus 40) terminiert. (B) Darstellung des Screenings nach Squid-p30/p32 *knockout* Mutanten über Western Blot Analyse. Es wurden 10 µg Gesamtprotein der potentiellen *knockout*-Zellen in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem α-p32 Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente ein β-Tubulin spezifischer Antikörper. (C) Im oberen Teil der Grafik sind die überlagerten Peaks der Sequenzierung einer *knockout*-Mutante (Klon 14) dargestellt. Im unteren Grafikteil ist das Chromatogramm der WT-Sequenz von Squid-p30/p32 dargestellt. Die deletierte Sequenz in Klon 14 ist in der WT-Sequenz mit einem roten Rahmen markiert. (D) Ausschnitt eines *alignments* der Squid-p30/p32 Wildtyp-Sequenz, verglichen mit der Sequenz von Klon 1 der Subklonierung von Klon 14. Das Alignment wurde mit dem Programm *Clone Manager* erstellt und die deletierte Sequenz ist grün markiert.

Tabelle 12: Übersicht der verschiedenen Mutationen der Squid-Gene und Auswirkungen auf die Proteinsequenz der Squid-Proteine

Name	sgRNA	Deletion (Nukleotidsequenz)	Auswirkung auf Proteinebene
<u>Klon 3</u>	sgRNA7	CGCC	Deletion von 2 Prolinen, führt zu <i>frameshift</i> , 35 kDa und 33 kDa Proteine
Klon 5	sgRNA7+5	GCC	1 Prolin deletiert, keine Änderung der restlichen Aminosäuresequenz
<u>Klon 11</u>	sgRNA7	TGGCATGCGAGGCCCGCCACGG	Deletion von GMRGPPR, führt zu <i>frameshift</i> , 34 kDa Protein
Klon 12	sgRNA7	CCCGCCACG	Deletion von PPR, keine Änderung der restlichen Aminosäuresequenz
<u>Klon 14</u>	sgRNA7	CATGCGAGGCCCGC	Deletion von MRGPP, führt zu <i>frameshift</i> , einer verkürzten Proteinvariante von 28 kDa und einer größeren Proteinvariante von 34 kDa
		GCC	1 Prolin deletiert, keine Änderung der restlichen Aminosäuresequenz

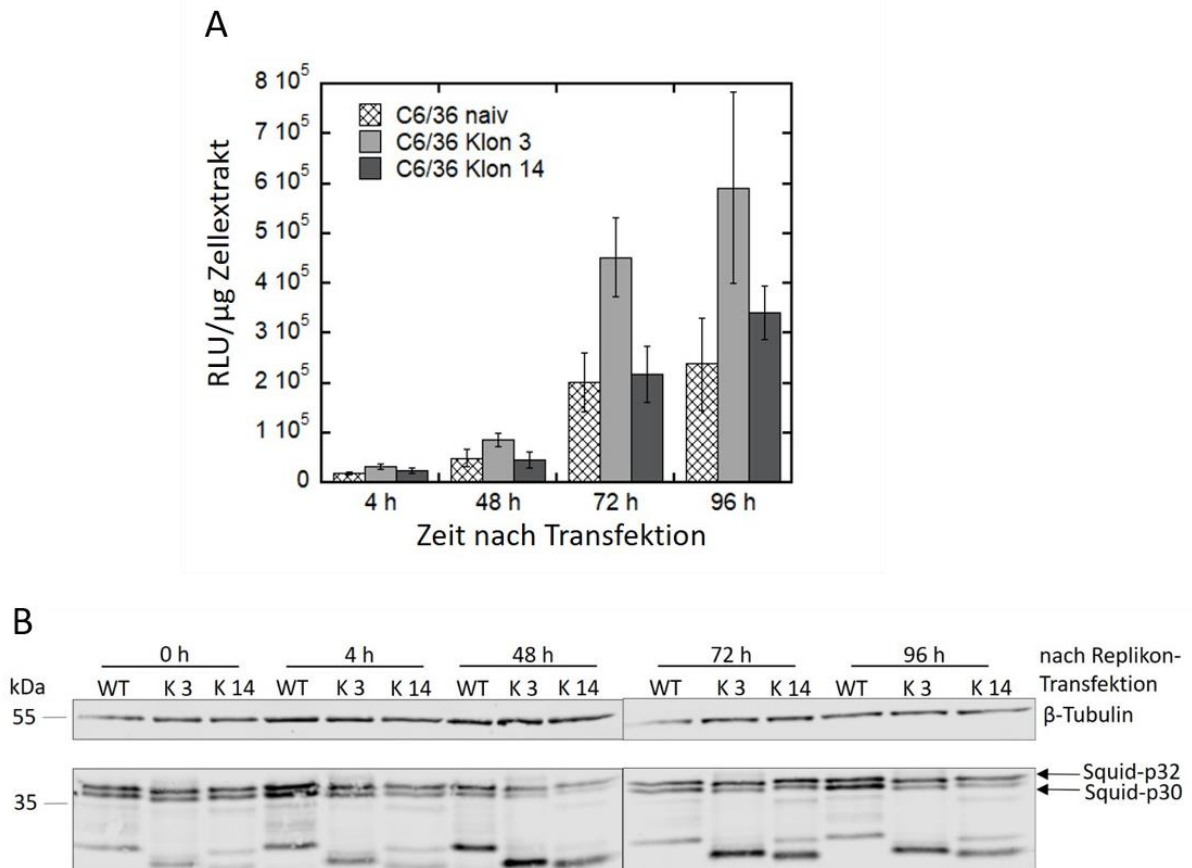
Die unterstrichenen Squid-Deletions-Mutanten wurden für weitere Experimente verwendet.

### 3.4.2. Der CRISPR/Cas9-vermittelte Gen-*knockout* der Squid-Proteine induziert in C6/36-Zellen eine Gegenregulation

Die bereits unter 3.4.1. analysierten Squid-Deletions-Mutanten der C6/36-Zellen wurden nun, wie zuvor unter 3.3.4. erläutert, mit einem Reporter-Replikon getestet. So wurde 1 µg des WNVRLuc-Replikons mittels Elektroporation in die Gen-*knockout* Klone 3 und Klon 14 transfiziert.

Die Daten zeigen, dass auch die CRISPR/Cas9-vermittelte Deletion der Squid-Gene keinen negativen Einfluss auf die virale Replikation in C6/36-Zellen hat (Abb. 28A). Bei der Verifizierung des stabilen *knockouts* mittels Western Blot Analyse musste jedoch festgestellt werden, dass vermutlich eine zelluläre Gegenregulation nach Gen-KO der Squid-Proteine in C6/36-Zellen stattgefunden hat. Zu sehen ist, dass verglichen mit Abb. 27B keine Verringerung der Squid-Proteinmenge mehr zu detektieren ist. Die Squid-p30/p32-Level der Klone 3 und 14 entsprachen dem der WT-Zellen (Abb. 28B). Dies konnte ebenfalls für Klon 11 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Um zu testen, ob diese scheinbare Gegenregulation der Depletion möglicherweise durch die Elektroporation bei der Transfektion der Replikon-RNA induziert wird, wurde zusätzlich zu den Zeitwerten nach der Transfektion ein 0 h-Zeitwert untersucht, bei dem es noch nicht zu einem Wiederanstiegen der Proteinmengen hätte kommen können. Es konnte festgestellt werden, dass die Elektroporation selbst keinen Einfluss auf das Squid-p30/p32-Level hat (Abb. 28B).

Da während des CRISPR/Cas9 Screenings von 170 Klonen nicht ein einziger homozygoter *knockout* Squid-p30/p32 Klon identifiziert werden konnte, könnte vermutet werden, dass die Proteine essentiell für die Mosquitozellen sind und ein homozygoter KO letal ist. Scheinbar haben sich die Zellen in der Kultivierungszeit zwischen dem Western-Screening und der Untersuchung der Replikon-Replikation so angepasst, dass die Squid-Level wieder anstiegen. Durch die beobachtete Gegenregulation wurde die Analyse der heterozygoten KO-Zellen nicht weiter fortgesetzt.



**Abbildung 28: Der CRISPR/Cas9-vermittelte heterozygote Gen-KO der Squid-Proteine induziert eine zelluläre Gegenregulation. (A)** Die heterozygoten Squid-p30/p32 *knockout* Zellen C6/36 Klon 3 und C6/36 Klon 14 wurden parallel zu naiven C6/36 Kontrollzellen mit 1  $\mu$ g WNVRluc-Replikon transfiziert. Die Renilla-Luziferase-Aktivität wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und die resultierenden RLUs auf 1  $\mu$ g Zellextrakt normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung eines in Dreifachbestimmung durchgeführten repräsentativen Experiments. **(B)** Western Blot zur Verifizierung des Gen-KO der Squid-Proteine. Es wurde 10  $\mu$ g Gesamtprotein der KO-Zellen in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem  $\alpha$ -p32 Antikörper (erkennt auch p30) detektiert. Als Ladekontrolle diente ein  $\beta$ -Tubulin spezifischer Antikörper. Zusätzlich zu den Zeitwerten nach der Transfektion wurde ein 0 h-Zeitwert untersucht. Die zelluläre Gegenregulation der Squid-Proteine ist im Vergleich mit Abb. 27B ersichtlich.

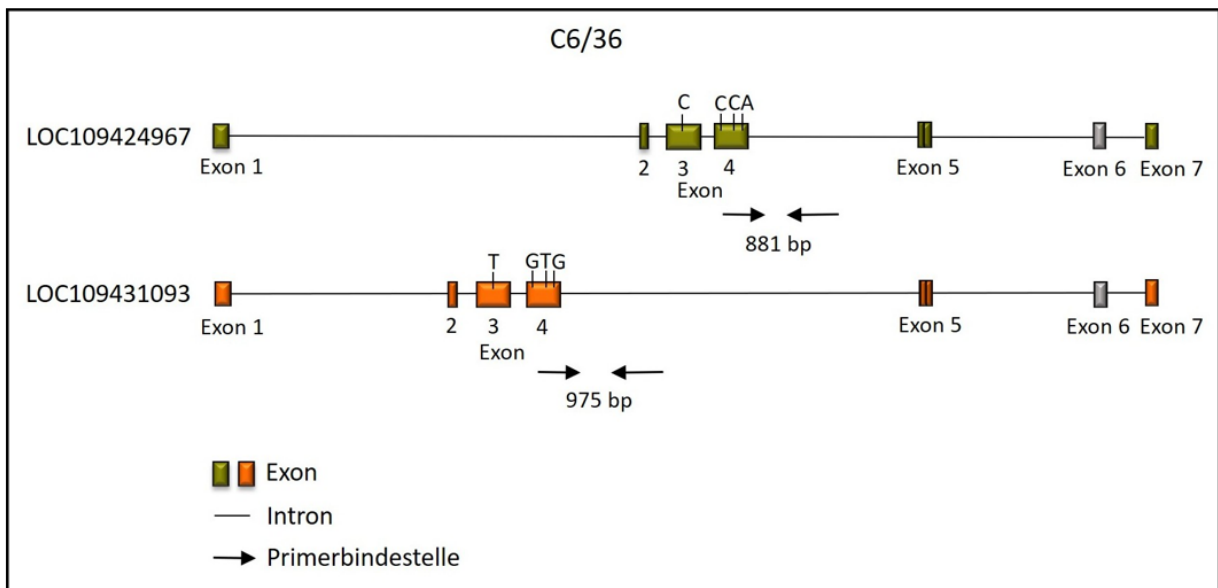
### 3.4.3. In C6/36-Zellen kodieren zwei Gene für sowohl Squid-p30, als auch Squid-p32

Squid-p30 und Squid-p32 konnten über eine BLAST-Suche (NCBI) nach Sequenz-Übereinstimmungen zu AUF1p45 in *A. albopictus* (Genomsequenzierung PRJNA357111) identifiziert werden. Die Proteine wurden bisher nicht näher charakterisiert. Die in dieser Arbeit verwendete Genomsequenzierung PRJNA357111 beruht auf genomischer DNA aus C6/36-Zellen. In der vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) bereitgestellten Datenbank konnten mit einer BLAST-Suche gegen das *A. albopictus* C6/36 Genom zwei Genloci, welche potentiell für Squid-p30 und -p32 kodieren, identifiziert werden. Dabei handelt es sich um LOC109424967 und LOC109431093. Diese Loci variieren durch Größen- und Sequenzunterschiede der Intron-Bereiche sowie durch vier Nukleotide in der kodierenden Sequenz (Abb. 29A). Um zu überprüfen, ob es sich wirklich um zwei Gene handelt und ob beide Gene aktiv sind, wurde RNA aus C6/36- und U4.4-Zellen isoliert und für cDNA-Synthese verwendet. Mittels PCR wurde das Genprodukt vervielfältigt, in den pETSUMO-Vektor kloniert und sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass in C6/36-Zellen vier verschiedene Transkriptvarianten generiert werden, von denen je zwei für Squid-p30 und zwei für Squid-p32 kodieren (Daten nicht gezeigt). In U4.4-Zellen sind zwei Transkriptvarianten identifiziert worden (Daten nicht gezeigt). So existieren in C6/36-Zellen zwei Gene und in U4.4-Zellen vermutlich nur ein Gen, welches für Squid-p30 und Squid-p32 kodiert (Abb. 29A, B). Durch PCR-Amplifikation mit Primern, die in Exon 4 und Intron 4 beider Genloci binden, konnte dieses Ergebnis bestätigt werden, da für C6/36-Zellen zwei PCR-Produkte unterschiedlicher Größe, für U4.4-Zellen jedoch nur ein PCR-Produkt auftraten (Abb. 29C). Anzumerken ist jedoch, dass am 15.07.19 eine weitere Genomsequenzierung PRJNA552090 beruhend auf genomischer DNA aus *A. albopictus* Mücken, auf NCBI veröffentlicht wurde. Diese unterscheidet sich von der in dieser Arbeit verwendeten Genomsequenzierung aus C6/36-Zellen. Bei einem *alignment* der verschiedenen genomischen Abschnitte der Loci zeigten sich für beide Loci aus C6/36-Zellen im Vergleich mit den Loci aus der Genomsequenzierung PRJNA552090 große Sequenzunterschiede in den Intron-Regionen. So ist die Primer-komplementäre Stelle in Intron 4, welche für die Amplifikation der beiden Gene in den Mosquitozellen verwendet wurde, im Locus LOC109424967 der neueren Genomsequenz PRJNA552090 nicht mehr vorhanden. Somit könnten auch in U4.4-Zellen zwei für Squid-p30 und Squid-p32 kodierende Gene existieren. Die kodierende Sequenz der Loci unterscheidet sich in der Genomsequenz aus Mosquitos nicht mehr in vier Nukleotiden, sondern nur noch in zwei.

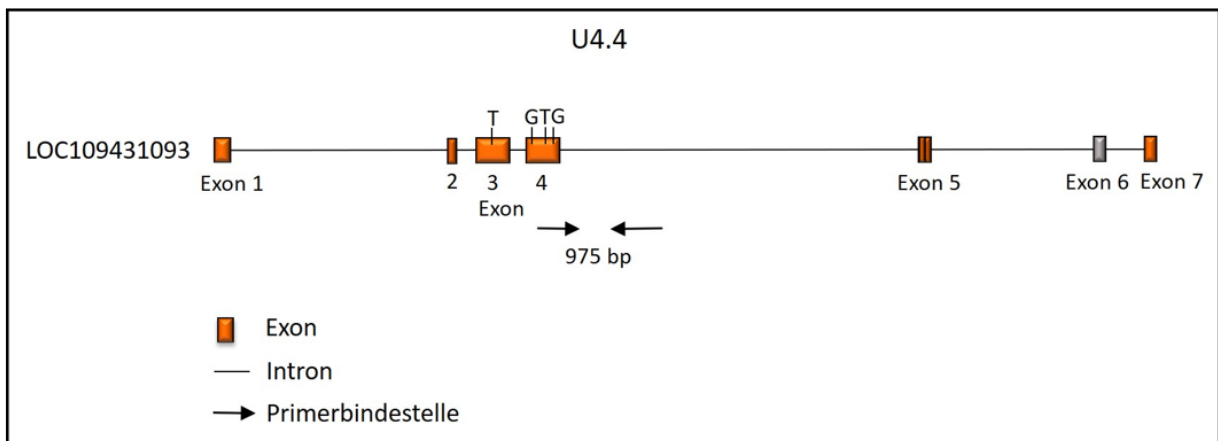


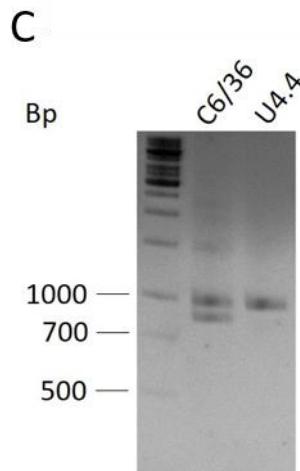
So sind die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Genomsequenzierung PRJNA357111 spezifisch für die C6/36-Zellen und die Genomsequenzierung PRJNA552090 entspricht eher der natürlich auftretenden Sequenz Asiatischer Tigermücken. Das Vorhandensein von zwei Genen anstatt einem erschwerte vermutlich zusätzlich die Generierung einer homozygoten *knockout*-Mutante in C6/36-Zellen, da so statt zwei Allel-Sequenzen kodierend für Squid-p30/p32 vier Allel-Sequenzen hätten mutiert werden müssen.

A



B





**Abbildung 29: Schematische Darstellung der Genloci der Squid-p30/p32 Gene in den Zelllinien C6/36 und U4.4.** (A) Dargestellt sind zwei Genloci der Sequenz-Annotierung PRJNA357111, welche beide für die Squid-Proteine in C6/36-Zellen kodieren. Die Genloci unterscheiden sich anhand der Sequenz und Größe der Intronbereiche und in 4 Nukleotiden der kodierenden Sequenz, welche in der Darstellung markiert sind. Welches Protein generiert wird, ist abhängig von der Selektion der 3' Spleißstelle innerhalb des Exon 5-kodierten Bereiches. Exon 6 (grau) wird bei beiden Genen kodierend für Squid-p30/p32 während des alternativen Spleißens übersprungen. (B) Dargestellt ist ein Genlocus der Sequenz-Annotierung PRJNA357111, welcher für beide Mosquito-Proteine in U4.4-Zellen kodiert. Der Rest der Abbildung entspricht den Ausführungen unter (A). (C). Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus C6/36- und U4.4-Zellen. In C6/36-Zellen konnten zwei PCR-Produkte und in U4.4-Zellen nur ein PCR-Produkt detektiert werden. Es wurde ein 1.5%iges Agarose-Gel verwendet und die Molekulargewichte des Markers sind indiziert.

## IV. Diskussion

### 4.1. Evolutionäre Entwicklung der Wirtsfaktorfunktion von AUF1p45

Viren sind aufgrund ihrer geringen Genomgröße und der damit einhergehenden begrenzten Anzahl an verfügbaren Genen abhängig von ihrem Wirt sowie von wirtseigenen zellulären Mechanismen. Zusätzlich sind von Vektoren übertragene Viren auf die Verbreitung durch den Vektorwirt angewiesen. Somit ist es für Viren erforderlich, eine persistente und nicht letale Infektion im Vektorwirt hervorzurufen, welche die Transmissionseffizienz nicht wesentlich beeinträchtigt. Trotzdem gibt es große Schwankungen in der Pathogenität verschiedener Viren. So ist die Virulenz eines Virus abhängig von der Vektorspezies, der Virusspezies und der Art der Übertragung (vertikal oder horizontal) (Lambrechts und Scott 2009). Der Viren-Hauptabwehrmechanismus in Mosquitos, welcher vermutlich stärkere Schädigungen in Mosquitos verhindert, ist das RNA-Interferenz-System (RNAi). Es wird frühzeitig innerhalb einer Infektion initiiert und begrenzt die virale Replikation, unterbindet sie aber nicht komplett (Blair 2011). Weitere beteiligte Abwehrsignalwege sind die Jak-STAT- (Januskinase-*signal transducers and activators of transcription*), Imd- (*immune deficiency*) und Toll-Signalwege (Samuel *et al.* 2018). So konnten beispielsweise Jupatanakul *et al.* (2017) zeigen, dass durch die frühzeitige Aktivierung des Jak-STAT-Signalweges in *A. aegypti* eine höhere Widerstandsfähigkeit des Vektors gegenüber DENV-Infektionen induziert wird. Um dem entgegenzusteuern haben Viren Methoden entwickelt, die der Überwindung der Abwehrmechanismen des Vektorwirts dienen. So wird ausgehend vom flaviviralen Genom eine hoch strukturierte und nicht-kodierende sfRNA (*small flaviviral RNA*) mit einer Länge von 300 - 500 Nt generiert. Diese RNAs werden infolge eines unvollständigen Abbaus der genomischen RNA durch die zelluläre Exoribonuklease XRN1 gebildet und unterdrücken teilweise den RNAi-Mechanismus (Pijlman *et al.* 2008, Schnettler *et al.* 2012, Moon *et al.* 2015).

Weitere Komponenten, die den Verlauf einer Virusinfektion positiv beeinflussen, sind virale Wirtsfaktoren. Über flavivirale Wirtsfaktoren im Mosquitowirt ist bisher nicht viel bekannt. In einem Review von Simoes *et al.* 2018 sind einige der bisher identifizierten flaviviralen Wirtsfaktoren von DENV, ZIKV und WNV in Stechmücken aufgeführt. So konnten Fu *et al.* (2015) und Jupatanakul *et al.* (2017) zeigen, dass die Depletion des *sterol carrier protein-2* das DENV-Level in *A. aegypti* Mosquitos und in Aag2-Zellen reduziert.

Ein weiterer Wirtsfaktor, die DEAD *box* ATP-dependent RNA helicase (DDX), unterstützt die Translation von viralen Proteinen in *A. aegypti* während einer DENV-Infektion (Jupatanakul *et al.* 2017). Die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) wird für die *de novo* RNA-Synthese während der viralen Replikation von DENV und ZIKV in *A. aegypti* benötigt (Kang *et al.* 2014, Anglero-Rodriguez *et al.* 2017). Jedoch ist der zugrundeliegende molekulare Mechanismus der hier aufgezählten Wirtsfaktoren noch nicht bekannt.

#### 4.1.1. Unterschiedliche Aktivitäten von Squid-p30/-p32 und AUF1p45

Da Flaviviren zwischen Insekten und Vertebraten zirkulieren, ist es naheliegend, dass mögliche Wirtsfaktoren zwischen den Spezies konserviert sind. So konnte bereits für die Exoribonuklease 3 (ERI 3) beschrieben werden, dass sowohl das humane Protein als auch das homologe Mosquito-Protein mit der DENV-2-UTR assoziieren und erforderlich für die RNA-Synthese, sowie eine effiziente virale Replikation sind (Ward *et al.* 2016). Ein weiteres Beispiel ist die *vacuolar* ATPase (vATPase) in *A. aegypti*, welche für die Absenkung des endosomalen pH-Wertes und für die Freisetzung der viralen RNA in das Zytosol bei DENV und ZIKV erforderlich ist (Kang *et al.* 2014, Savidis *et al.* 2016, Anglero-Rodriguez *et al.* 2017).

Eine ähnlich konservierte Wirtsfaktorfunktion wurde in dieser Arbeit für die AUF1p45-homologen Mosquito-Proteine Squid-p30 und Squid-p32 vermutet, da die Squid-Proteine einen sehr ähnlichen strukturellen Aufbau mit zwei zentralen RRM-Domänen besitzen. Des Weiteren enthalten die Proteine, ebenso wie das humane AUF1p45, RGG/RG- und YGG-Sequenzmotive in der C-terminalen Region (Abb. 15). In den *in vitro* Aktivitäts-Assays zeigten Squid-p30 und Squid-p32, ähnlich wie AUF1p45, RNA-Umstrukturierungsaktivitäten. So besitzen beide Proteine eine RNA-Chaperon-Aktivität, welche bei Squid-p32 etwas stärker ausgeprägt ist, und eine RNA-*annealing*-Aktivität, welche bei beiden Proteinen nahezu identisch ist. Dabei war zu beobachten, dass die Aktivität der Mosquito-Proteine im fluorimetrischen RNA-Destabilisierungs-Assay und besonders in dem RNA-*annealing*-Assay generell schwächer ausgeprägt war als beim humanen AUF1p45 Protein (Abb. 10F, 12F). Verglichen mit einer unspezifischen RNA zeigten beide Mosquito-Proteine in einem RNA-Bindungsassay eine Bindungsspezifität für AU/GU-reiche RNA. Dabei konnte für Squid-p30 eine zehnfach höhere Affinität zur AU/GU-reichen RNA als bei Squid-p32 festgestellt werden. Jedoch war auch im RNA-Bindungsassay die Affinität der Mosquito-Proteine, insbesondere zur spezifischen RNA, deutlich geringer als bei AUF1p45 (Tabelle 8). Weiterhin zeigten die Mosquito-Proteine im RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Assay (RdRp) eine starke Stimulation der (-)-Strang-RNA-Synthese des WNV.

Dabei war im Gegensatz zu den bisherigen Aktivitäts-Assays zu beobachten, dass die Mosquito-Proteine eine deutlich stärkere Stimulation der (-)-Strang-RNA-Synthese des WNV aufwiesen als AUF1p45 (Abb. 14C). Eine genaue Erklärung für diese Diskrepanz gibt es nicht. Es könnte vermutet werden, dass möglicherweise die verwendete RNA-Polymerase NS5 und AUF1p45 anders miteinander interagieren und sich beeinflussen, als NS5 und Squid-p30 und Squid-p32. Man könnte aufgrund der höheren Affinität von AUF1p45 zu AU/GU-reicher RNA vermuten, dass die Affinität zur subgenomischen RNA (sgRNA) gleichfalls höher ist, was die RNA-Synthese hemmen könnte. Dies ist aber rein spekulativ, da die Bindungsaffinitäten der Squid-Proteine zur sgRNA nicht getestet wurden.

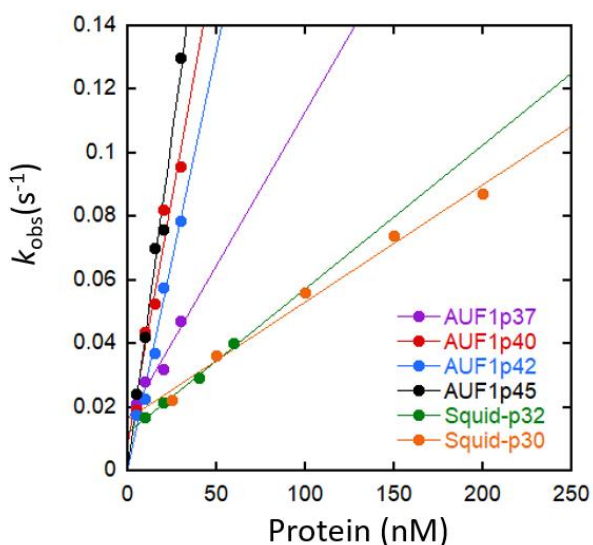
#### 4.1.2. Mögliche Ursachen für die nicht-konservierte virale Wirtsfaktorfunktion von AUF1p45

Eine Wirtsfaktorfunktion von Squid-p30 und -p32 bei der WNV-Replikation in Mosquitozellen konnte in der vorliegenden Arbeit entgegen den Erwartungen nicht identifiziert werden, da die Depletion der beiden Proteine keinen Einfluss auf die Replikation eines WNV-Replikons zeigte (Abb. 25). Ebenso war kein Effekt auf die Vermehrung eines infektiösen WNV ersichtlich (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu unterstützt AUF1p45 die Replikation des WNV in Huh7-Zellen (Friedrich *et al.* 2014).

Ein Grund für diesen Unterschied in der Funktion der homologen Proteine könnten die schwächer ausgeprägten RNA-Umstrukturierungsaktivitäten der Mosquito-Proteine sein. Insbesondere die RNA-*annealing*-Aktivität der Squid-Proteine ist deutlich schwächer als bei AUF1p45 (Abb. 12F). Eine weitere Determinante könnte die in dieser Arbeit festgestellte fehlende Methylierung der Mosquito-Proteine in den Mosquitozellen sein (Abb. 7B, D). Die Methylierung von AUF1p45 in humanen Zellen konnte als bestimmender Faktor für die RNA-Chaperon-Aktivität des Proteins identifiziert werden. So führte die Methylierung zu einer deutlichen Verstärkung der RNA-Chaperon-Aktivität (Friedrich *et al.* 2016). Da in verschiedenen Stechmückenarten bereits Arginin-Methyltransferasen nachgewiesen werden konnten, ist es wahrscheinlich, dass diese auch in den beiden verwendeten *A. albopictus*-Zelllinien existieren. So liegt in *A. aegypti* sowie den dazugehörigen Aag2-Zellen eine Arginin-Methyltransferase-Familie mit acht Vertretern vor, welche als AaArgM1-8 bezeichnet werden (Zhang *et al.* 2014). Ebenso konnte in *Anopheles gambiae* die Methyltransferase AgCARM1 (*Anopheles gambiae* coactivator associated arginine methyltransferase 1), welche homolog zu der humanen Arginin-Methyltransferase PRMT4 (auch CARM1 genannt) ist, identifiziert werden. So kann vermutet werden, dass die Möglichkeit einer Methylierung der Squid-Proteine in den Mosquitozellen prinzipiell gegeben ist, die Proteine aber unter Standardbedingungen als nicht-methyliert vorliegen.

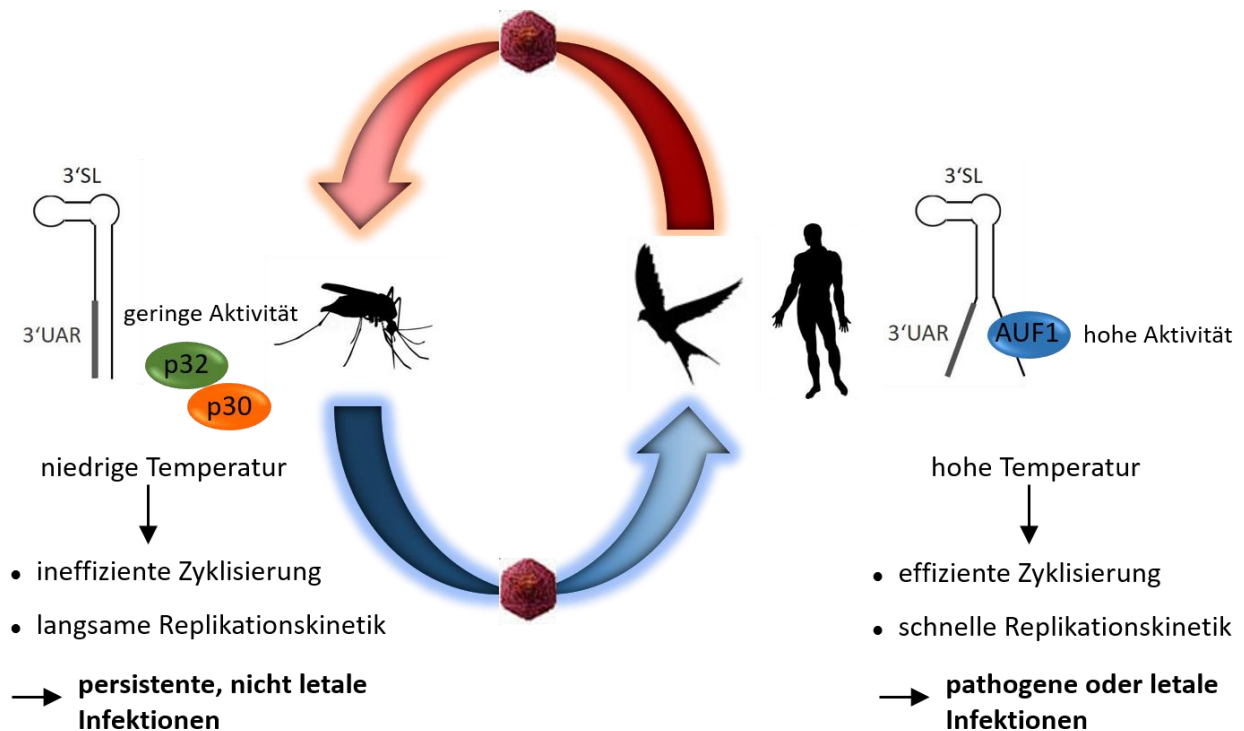
Unter bestimmten Bedingungen könnte eine Methylierung von Squid-p30 und -p32 möglicherweise induziert werden, was in dieser Arbeit allerdings nicht näher untersucht wurde. In Bezug auf die Vektorfunktion der Stechmücke im viralen Übertragungszyklus ist die Verstärkung der RNA-Chaperon-Aktivität der Mosquito-Proteine vermutlich nicht vorteilhaft für den Virus.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedliche Funktion des humanen AUF1p45 und den Mosquito-Proteinen *in cellulo* könnte die Temperaturabhängigkeit von AUF1p45 sein. Während AUF1p45 bei Erhöhung der Temperatur im fluorimetrischen RNA-Destabilisierungs-Assay eine deutliche Verbesserung der RNA-Chaperon-Aktivität zeigte, wurden die Squid-Proteine von der Temperaturerhöhung kaum beeinflusst. Da humane Zelllinien wie die Huh7-Zellen bei 37°C kultiviert werden und Mosquitozellen nur bei 28°C, könnte dies einen Einfluss auf die Wirtsfaktorfunktion der Proteine haben. Zusätzlich existieren von den AUF1-Proteinen vier Isoformen in humanen Zellen, von den Mosquito-Proteinen nur zwei in Mosquitozellen (siehe 4.3.). Da die Isoform AUF1p42 ähnlich starke RNA-Umstrukturierungsaktivitäten wie AUF1p45 aufweist, könnte dies insbesondere für die Wirtsfaktorfunktion insgesamt vorteilhaft sein. Auch die Isoformen AUF1p37 und AUF1p40 besitzen eine RNA-*annealing*-Aktivität, welche höher ist als die der Mosquito-Proteine (unveröffentlichte Daten Dr. Susann Friedrich und Lennart Säger, Abb. 30). Basierend auf diesen Ergebnissen ist es vorstellbar, dass sich die Wirtsfaktorfunktion der Proteine erst später in Wirbeltieren entwickelt hat, in welchen die Proteine höhere RNA-Umstrukturierungsaktivitäten zeigen, methyliert vorliegen, eine höhere Aktivität bei höheren Temperaturen aufweisen und mit mehreren Isoformen eine insgesamt höhere Wirtsfaktorfunktion erreichen.



**Abbildung 30: Die RNA-*annealing*-Aktivität der Mosquito-Proteine ist deutlich schwächer als die der humanen AUF1-Isoformen.** Übersicht der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Mosquito-Proteine und AUF1-Isoformen (unveröffentlichte Daten von Dr. Susann Friedrich und Lennart Säger), welche gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen und linear gefittet wurden. Dabei wurden die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Mosquito-Proteine aus Abb. 12A und 12C verwendet.

In diesem Zusammenhang konnte zudem von Meyer *et al.* (2020) ein Modell entwickelt werden, in welchem der 3'SL des WNV als sogenanntes RNA-Thermometer durch eine temperaturabhängige Flexibilität die Replikationseffizienz während des Wirtwechsels von Stechmücke zu Vogel oder Mensch moduliert (Abb. 31). RNA-Thermometer sind besonders in pathogenen Bakterien gut beschrieben. Dabei handelt es sich um RNA-Strukturen, welche auf Temperaturveränderungen unmittelbar mit einer Konformationsänderung reagieren und so die Expression von einigen Hitzeschockgenen und Virulenzfaktoren regulieren. Bei ansteigenden Temperaturen kann die Konformation der RNA von einer geschlossenen Struktur zu einer offenen Struktur wechseln und so die Effizienz der Translationsinitiation erhöhen (Kortmann und Narberhaus 2012). Stechmücken haben eine deutlich niedrigere Körpertemperatur als Wirbeltiere, da sie ektotherm sind und ihre Körpertemperatur somit abhängig ist von der Umgebungstemperatur. Da durch die niedrige Temperatur und die zuvor beschriebene schwache RNA-Chaperon-Aktivität der Mosquito-Proteine der 3'SL deutlich stabiler ist, führt dies zu einer ineffizienten Zyklisierung des WNV-Genoms und zu einer langsamen Replikationskinetik. Für den Virus hat das zum einen den Vorteil, dass durch die niedrigen Virustiter in Stechmücken zytopathische Effekte vermieden werden und es so zu persistenten, aber nicht letalen Virusinfektionen kommt. So kann der Virus effizient verbreitet werden. Zum anderen könnten es die niedrigen Virustiter dem Virus ermöglichen, vom RNAi-System der Stechmücke unentdeckt zu bleiben. In Wirbeltieren ist aufgrund der höheren Körpertemperatur und der hohen RNA-Chaperon-Aktivität der AUF1-Proteine der 3'SL deutlich flexibler. Dies führt zu einer effizienten Zyklisierung des WNV-Genoms und zu einer schnelleren Replikationskinetik. Dadurch sind die WNV-Infektionen insbesondere bei Vögeln durch hohe Virustiter und eine hohe Letalität charakterisiert (Meyer *et al.* 2020).



**Abbildung 31: Modell des 3'SL als RNA-Thermometer unter dem Einfluss der untersuchten Wirtsfaktoren während des Wirtwechsels von Stechmücke zu Vogel oder Mensch.** Da die Körpertemperatur bei Stechmücken deutlich niedriger als bei Wirbeltieren und die Aktivität der Mosquito-Proteine gering ist, ist der 3'SL stabil. Dies führt zu einer ineffizienten Zyklisierung des WNV-Genoms und einer langsamen Replikationskinetik und äußert sich in persistenten und nicht letalen Infektionen von Stechmücken. In Wirbeltieren besitzt der 3'SL durch die deutlich höhere Körpertemperatur und die hohe Aktivität von Wirtsfaktoren wie AUF1 eine größere Flexibilität. Dies resultiert in einer effizienten Zyklisierung des WNV-Genoms und einer schnelleren Replikationskinetik. Infektionen sind insbesondere bei Vögeln durch hohe Virustiter mit hoher Letalität gekennzeichnet (modifiziert nach Meyer *et al.* 2020, Grafikelemente aus Meyer 2016).

## 4.2. Der Einfluss von Proteinmotiven auf die Funktion der Squid-Proteine

Die Funktion eines Proteins wird zum großen Teil über dessen Motive und Domänen reguliert. Proteinmotive sind kurze, unstrukturierte Sequenzen, die eine charakteristische Aminosäureabfolge in Zusammenhang mit einer bestimmten Funktion aufweisen. So ist in RGG/RG-Motiven Arginin die charakteristische Aminosäure, welche positiv geladen ist und Wasserstoffbrückenbindungen sowie Interaktionen mit aromatischen Aminosäuren vermittelt (Thandapani *et al.* 2013). In einer Computeranalyse von RNA-Proteinkomplexen konnte gezeigt werden, dass verstärkt positiv geladene Aminosäurereste wie Arginin und aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin und Tyrosin in RNA-Bindestellen vorkommen und dass Van-der-Waals-Wechselwirkungen eine größere Rolle in der RNA-Proteininteraktion spielten als Wasserstoffbrückenbindungen (Jones *et al.* 2001).



Glycin spielt in der RNA-Bindung über das RGG/RG-Motiv ebenfalls eine große Rolle, da durch diese Aminosäure Flexibilität vermittelt wird, welche den Arginin-Resten ermöglicht, sich konformationell an die Form der Ziel-RNA anzupassen. Daher könnte die Anzahl und Anordnung der Glycin- und Arginin-Reste über die Affinität und Selektivität des RGG/RG-Motivs zur Ziel-RNA bestimmen (Hentze *et al.* 2018). Proteine mit RGG/RG-Motiv sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Transkription, Translation, prä-mRNA Spleißen, mRNA-Export, DNA-Schaden-Signalisierung und der Regulation von Apoptose beteiligt (Rajyaguru und Parker 2012, Thandapani *et al.* 2013). Dabei kommen RGG/RG-Motive häufig als *repeats* innerhalb von *intrinsically disordered protein regions* (IDRs) von RNA-Bindeproteinen vor und sind an der RNA-Bindung des Proteins beteiligt (Hentze *et al.* 2018). So konnte das RGG/RG-Motiv des RNA-Bindeproteins AUF1p45 von Meyer *et al.* (2019) als zentrale Determinante in der RNA-Chaperon- und RNA-*annealing*-Aktivität bestimmt werden. Mit Hilfe einer umfangreichen Mutagenese-Studie wurden dabei die Arginine innerhalb des RGG/RG-Motivs gegen Alanine substituiert (Abb. 4). So konnte festgestellt werden, dass das RGG/RG-Motiv ausschlaggebend zur RNA-Chaperon-Aktivität beiträgt. Dabei destabilisieren die Arginine die RNA-Helix vermutlich durch *stacking interactions* mit Nukleinbasen und sind so essentiell für die RNA-Chaperon-Aktivität des Proteins. Durch Methylierung wird die Hydrophobizität der Arginine erhöht, was zu einer erleichterten *stacking interaction* führen könnte (Bedford und Richard 2005) und so die von Friedrich *et al.* (2016) beobachtete Verstärkung der RNA-Chaperon-Aktivität erklären könnte (Meyer *et al.* 2019). Auch für die RNA-*annealing*-Aktivität ist das RGG/RG-Motiv wichtig. So konnte gezeigt werden, dass die positive Ladung der Arginine die RNA-*annealing*-Aktivität wahrscheinlich unterstützt, indem die elektrostatische Abstoßung zwischen zwei hybridisierenden RNAs reduziert wird. Die Energie für die RNA-Umstrukturierungsprozesse von AUF1p45 könnte durch lokale Faltung der ungeordneten C-terminalen Region bereitgestellt werden (Meyer *et al.* 2019).

Ein weiteres Proteinmotiv, welches häufig in Form von *repeats* innerhalb der IDRs von RNA-Bindeproteinen vorkommt, ist das YGG oder [G/S]Y[G/S]-Motiv. Eingebettet in einer Glycinreichen Sequenz sind Aromatische Aminosäuren wie Tyrosin besonders exponiert. Dies könnte die Wahrscheinlichkeit zur Aggregation bei der Interaktion mit ähnlichen Proteinmotiven oder Bindung von RNA erhöhen (Hentze *et al.* 2018). Die deutlich unbekannteren YGG-Motive könnten bei der Bindung von RNA einen ähnlichen Mechanismus wie RGG/RG-Motive aufweisen, da die aromatische Tyrosin-Seitenkette ebenfalls mit RNA-Basen über *stacking interactions* oder Wasserstoffbrückenbindungen interagieren könnte (Lunde *et al.* 2007, Castello *et al.* 2012).

Auch das YGG-Motiv konnte für die RNA-Chaperon-Aktivität der AUF1-Isoformen bereits als wichtige Determinante identifiziert werden. So fehlt bei den Isoformen AUF1p37 und AUF1p40 die durch Exon 7-kodierte Region, welche ein YGG-Motiv beinhaltet. Beide Proteine zeigen fast keine RNA-Chaperon-Aktivität, obwohl die Proteine ein RGG/RG-Motiv besitzen und ähnliche RNA-Bindeaffinitäten wie AUF1p42 und AUF1p45 aufweisen. Diese Diskrepanz lässt vermuten, dass das RGG/RG-Motiv allein nicht ausreichend ist für das Vermitteln einer RNA-Chaperon-Aktivität und zusätzliche Sequenzen der durch Exon 7-kodierten Region, wie das YGG-Motiv, benötigt werden (Sänger *et al.* 2020 eingereicht, Dr. Susann Friedrich und Lennart Sänger unveröffentlichte Daten). Das YGG-Motiv von *heterogeneous ribonucleoproteins* (hnRNPs) wurde zudem von Gueroussov *et al.* 2017 als Interaktionsstelle mit verschiedenen hnRNPs sowie anderen RNA-Bindeproteinen mit GY-repetitiven Sequenzen nachgewiesen. Diese Proteininteraktionen können zusätzlich zu der Bildung von Proteinkomplexen höherer Ordnung führen, welche am alternativen Spleißen der eigenen prä-mRNA beteiligt sind und so eine große regulatorische Funktion einnehmen (Gueroussov *et al.* 2017).

#### 4.2.1. Unterschiede der Aktivitäten von Squid-p30 und -p32

Beide in dieser Arbeit charakterisierten Mosquito-Proteine sind nahezu identisch und besitzen zusätzlich zu den RRM1- und RRM2-Domänen ein RGG/RG-Motiv und ein YGG-Motiv. Trotz ihrer starken Ähnlichkeit in der Aminosäurezusammensetzung (Abb. 5) und der Gesamtheit der Sekundärstrukturen (Abb. 17A) unterscheiden sich die Proteine in ihrer Aktivität. So weist Squid-p30 eine deutlich höhere RNA-Bindungsaffinität zu spezifischer und unspezifischer RNA auf als Squid-p32 (Tabelle 8). Squid-p32 zeigt dagegen eine etwas höhere RNA-Chaperon-Aktivität (Abb. 10F). Um zu ergründen, worauf diese Unterschiede zurückzuführen sind, wurde der durch Exon 5 kodierte-Bereich, welcher bei Squid-p30 aufgrund einer alternativen Selektion der 3' Spleißstelle um 20 Aminosäuren kürzer ist als bei Squid-p32, näher untersucht. Diese zusätzlichen 20 Aminosäuren verlängern bei Squid-p32 das zuvor erwähnte YGG-Motiv. Besonders interessant sind dabei zwei Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs von Squid-p32. Tryptophan unterscheidet sich aufgrund seines heteroaromatischen Ringsystems stark von allen anderen aromatischen Aminosäuren. Tryptophan wird unter anderem innerhalb der Bindestellen von einigen Proteinen wie Lysozym gefunden, wo es Kohlenhydratmoleküle durch *stacking interaction* und Wasserstoffbrückenbindungen erkennt (Maenaka *et al.* 1995). Auch Ellis *et al.* (2007) vermuteten, dass die aromatische Aminosäure Tryptophan in RNA-Bindeproteinen über *stacking interactions* mit Nukleinsäuren interagiert.

Des Weiteren ist Tryptophan ein bevorzugter Bestandteil von RNA-Bindestellen und hat eine Präferenz für die Bindung von Purin-Basen wie Guanin und in einem geringeren Umfang Adenin (Ellis *et al.* 2007).

Schon bei den besser charakterisierten RGG/RG-Motiven konnte festgestellt werden, dass häufig aromatische Aminosäuren innerhalb dieser Motive auftreten, welche zur *stacking interaction* mit Nukleinbasen beitragen könnten (Kiledjian und Dreyfuss 1992). Eine ähnliche Rolle könnten die Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs einnehmen.

#### 4.2.2. Der Einfluss der aromatischen Aminosäuren des YGG-Motivs auf die RNA-Bindung und RNA-RNA-Interaktion

Um den Einfluss der zwei Tryptophane auf die Aktivität von Squid-p32 genauer zu untersuchen, wurden diese in der vorliegenden Arbeit durch Alanine substituiert und die resultierenden Squid-p32-Varianten auf ihre RNA-Bindungsaffinität getestet. Dabei war zu beobachten, dass die Squid-p32-Varianten eine deutlich erhöhte RNA-Bindungsaffinität verglichen zum Wildtyp-Protein (WT) aufwiesen (Tabelle 9). Dieser Effekt war insbesondere bei der Bindung von AU/GU-reicher RNA zu beobachten und unabhängig von der Anzahl oder Position der ausgetauschten Tryptophane. Die dabei resultierenden Dissoziationskonstanten glichen stark denen von Squid-p30 (Tabelle 9). Bei der Bindung der unspezifischen ssRNA war für die Squid-p32-Varianten ebenfalls eine Verbesserung zu beobachten, welche allerdings schwächer ausgeprägt war. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs die RNA-Bindung von Squid-p32 verschlechtern. Dies ist überraschend, da aromatische Aminosäuren mit Nukleotiden der RNA durch *stacking interactions* interagieren können (Kiledjian und Dreyfuss 1992, Baker und Grant 2007) und aus den zuvor beschriebenen Gründen eher eine Verbesserung der Interaktionen erwartet wurde. Somit konnte gezeigt werden, dass die Tryptophane die RNA-Bindung von Squid-p32 sequenzspezifisch regulieren.

In den fluorimetrischen RNA-RNA-Interaktionsassays konnte hingegen ein partieller Verlust der RNA-Chaperon- und RNA-*annealing*-Aktivität der Squid-p32-Varianten detektiert werden. Dabei war die Anzahl und Position der ausgetauschten Tryptophane nicht ausschlaggebend und es war kein additiver Effekt zu beobachten. Ähnliche Ergebnisse konnten von Sängler *et al.* (2020, eingereicht) für AUF1p45-Varianten gezeigt werden. In der Studie wurden drei Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs von AUF1p45 gegen Alanin substituiert. Im Gegensatz zu der Aminosäuresubstitution in Squid-p32 zeigte in dieser Publikation der Einzelaustausch von Tryptophan kaum einen Einfluss auf die RNA-Chaperon-Aktivität. Erst der Austausch aller Tryptophane führte zu einem deutlichen Aktivitätsverlust des Proteins.

Dieser war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei einer AUF1p45-Variante, bei welcher alle Tyrosine innerhalb des YGG-Motivs ausgetauscht wurden. Diese Tyrosin-Substitutionen resultierten in einer kaum mehr detektierbaren RNA-Chaperon-Aktivität (Sänger *et al.* 2020, eingereicht). So kann vermutet werden, dass die RNA-Umstrukturierungsaktivität der Squid-p32-Varianten zum Teil noch gegeben ist, da von den aromatischen Aminosäuren nur die Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs ausgetauscht wurden und die Tyrosine immer noch vorhanden sind. Der Aktivitätsverlust der Squid-p32-Varianten lässt sich dabei so erklären, dass die Tryptophane und Tyrosine als aromatische Aminosäuren über *stacking interactions*, ähnlich wie für die Arginine des RGG/RG-Motiv postuliert, die Destabilisierung der RNA fördern können und so ebenfalls zur RNA-Chaperon-Aktivität beitragen (Meyer *et al.* 2019). Eine weitere Möglichkeit wie Squid-p32 die RNA-RNA-Interaktion stimulieren könnte, ist eine mögliche RNA-induzierte Oligomerisierung des Proteins. So konnte bereits von Zucconi *et al.* (2010) die durch Exon 7-kodierte Region von AUF1p42 und AUF1p45, welche ein YGG-Motiv beinhaltet, in Verbindung mit RNA-induzierter Protein-Oligomerisierung gebracht werden. In diesem Zusammenhang konnten ebenso Mannen *et al.* (2016) eine AUF1-Homodimerisierung in *nuclear bodies* zeigen. Dabei waren wieder nur die Isoformen AUF1p42 und AUF1p45 mit der Exon 7-kodierten Region betroffen. Eine durch das YGG-Motiv induzierte Protein-Oligomerisierung von Squid-p32 würde zu einer erhöhten lokalen Proteinkonzentration führen und könnte so die RNA-Chaperon-Aktivität verstärken. Ebenso könnte eine konzentrationsabhängige Oligomerisierung vorliegen, welche ein in der Literatur gut beschriebener, regulatorischer Faktor bei der Protein-Oligomerisierung ist (Kumari und Yadav 2019). Ein repräsentatives Beispiel für eine konzentrationsabhängige Oligomerisierung eines Proteins ist Serumalbumin. Das Oligomer wird durch reversible Homo-Oligomerisierung bei höheren Konzentrationen von Serumalbumin gebildet und kann durch Verdünnung wieder in einen monomeren Proteinzustand überführt werden. Dabei wird aber vermutet, dass der Oligomierzustand des Serumalbumins physiologisch inaktiv ist (Bhattacharya *et al.* 2014). Ein weiteres Beispiel ist das Typ I Anti-Frost-Protein (AFP), welches gebildet wird um Organismen in eisbelasteten Umgebungen vor Gefrierschäden zu schützen. Durch die konzentrationsabhängige Oligomerisierung steigt mit Erhöhung der AFP-Konzentration ebenfalls die Proteinaktivität sowie die Fähigkeit die Oberfläche von Eiskristallen zu binden und ein Zerspringen dieser zu verursachen (Mahatabuddin *et al.* 2017). Eine Tendenz zur Oligomerisierung konnte für Squid-p32 schon während der Proteinreinigung beobachtet werden.

So konnte bei der Heparin-Affinitätschromatographie die Elution zweier unterschiedlicher Proteinspezies beobachtet werden, bei der die stabiler an die Matrix gebundene Spezies vermutlich ein Squid-p32-Oligomer darstellt. Dagegen zeigten Squid-p30 und die Squid-p32-Variante Squid-p32<sub>W261,264A</sub>, welche beide keine Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs besitzen, kein Oligomerisierungsverhalten während des Proteinreinigungsprozesses (siehe 3.2.1.).

Um eine RNA-induzierte Oligomerisierung der Squid-Proteine zu untersuchen, könnten Methoden wie native Massenspektrometrie oder nativer elektrophoretischer Shiftassay genutzt werden.

Die zuvor festgestellte verbesserte RNA-Bindung der Squid-p32-Varianten korrelierte nicht mit einer höheren Aktivität in den RNA-RNA-Interaktionsassays. Dies ist auch der Fall bei Squid-p30, welches trotz einer höheren RNA-Bindeaffinität eine geringere RNA-Chaperon-Aktivität als Squid-p32 aufweist. Mayer *et al.* (2007) konnten mit einer Mutationsanalyse des Proteins StpA zeigen, dass eine verminderte RNA-Bindung einer Protein-Variante die RNA-Chaperon-Aktivität des Proteins verstärkte. Demzufolge ist es vorstellbar, dass eine zu starke Bindung eines RNA-Chaperons an die Ziel-RNA nicht unbedingt von Vorteil ist, da nach erfolgter Umstrukturierung der RNA die RNA-Proteinbindung wieder gelöst werden muss, um die nun korrekt gefaltete RNA wieder freizusetzen (Mayer *et al.* 2007). Woodson (2010) beschrieb mit Hilfe eines thermodynamischen Modells, dass die Stärke der Bindung eines RNA-Chaperons an eine ungefaltete oder teilweise gefaltete RNA mit der zur Verfügung stehenden Entfaltungsentnergie korreliert. Ist die RNA-Bindung des Proteins dabei allerdings zu stark, kann die RNA nicht neu gefaltet werden. Die korrekt gefaltete RNA muss thermodynamisch stabiler bleiben, als der RNA-Chaperon-Komplex. Dadurch müssen RNA-Chaperone schnell wieder von der RNA dissoziieren, um die Denaturierung von funktionellen Molekülen zu verhindern und eine schnelle Rückfaltungskinetik zu gewährleisten (Woodson 2010).

Ein weiteres Proteinmotiv innerhalb der 20 Aminosäuren, welches nur bei Squid-p32 zu finden ist, konnte mit Hilfe der Datenbank *The Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins* (<http://elm.eu.org>) identifiziert werden. Die Aminosäuresequenz YDYSHYG ist ein potentiell Ziel der zwischen verschiedenen Spezies konservierten Proteinkinase PLK1 (*polo-like kinase 1*), welche Serin- und Threoninreste phosphoryliert (Lee *et al.* 2014). Schon für AUF1p40 deuteten Daten darauf hin, dass die Phosphorylierung des Proteins den ARE-vermittelten (*AU-rich elements*) mRNA-Abbau durch die Umstrukturierung von lokalen RNA-Strukturen reguliert (Wilson *et al.* 2003a). So beeinflusst die Phosphorylierung die ARE-Bindungsaffinität, inhibiert den Strukturwechsel der ARE-Substrate in eine kondensierte RNA-Struktur und beeinflusst die Struktur von AUF1p40-ARE-Ribonucleoprotein-Komplexen (Wilson *et al.* 2003a).

Für ein weiteres RNA-Bindeprotein *nuclear factor 90* (NF90) ist beschrieben, dass eine Phosphorylierung dessen RNA-Bindungsaffinität stark vermindert und einen großen Einfluss auf die Konformation des Proteins hat (Schmidt *et al.* 2016).

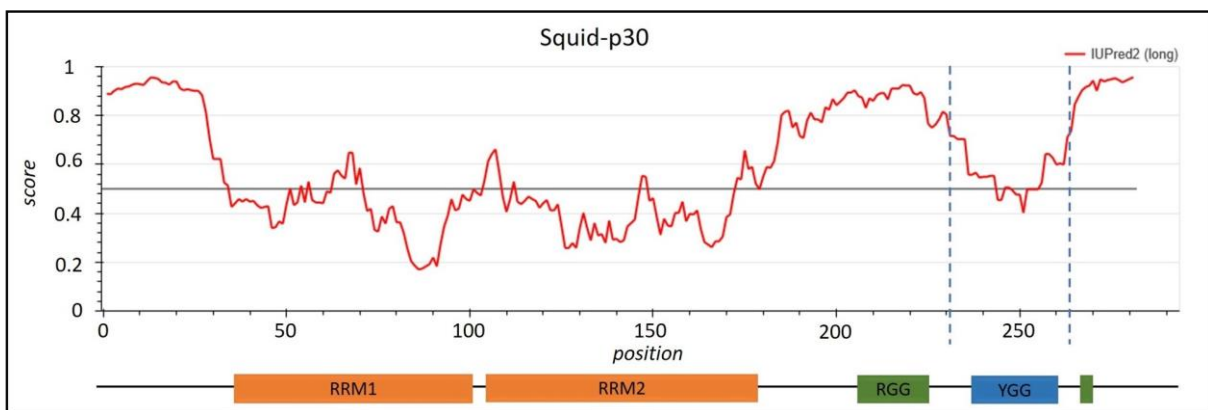
So ist gut vorstellbar, dass eine Phosphorylierung von zellulärem Squid-p32 ebenfalls funktionelle Unterschiede zwischen den Proteinen in Mosquitozellen induzieren könnte. Um eine Phosphorylierung zu untersuchen, könnte immunpräzipitiertes Squid-Protein aus Mosquitozellen mittels Massenspektrometrie analysiert werden.

#### 4.2.3. Möglicher Einfluss der Sekundärstruktur auf Aktivitätsunterschiede zwischen den Squid-Proteinen

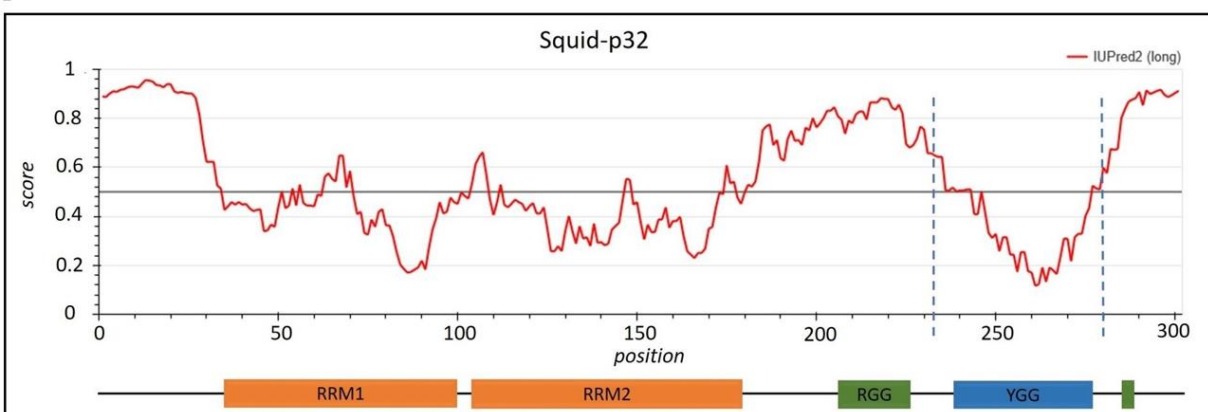
RNA-Chaperone besitzen häufig einen hohen Anteil an IDRs, welche vermutlich essentiell für die Funktion der Proteine sind (Rajkowitsch *et al.* 2007). IDRs beinhalten, mit Ausnahme von Tyrosin, wenige große, hydrophobe Aminosäuren und besitzen viele kleine, polare und/oder geladene Aminosäuren wie Glycin, Serin, Arginin, Lysin, Glutamin, Glutaminsäure und Asparaginsäure (Rajkowitsch *et al.* 2007, Hentze *et al.* 2018). IDRs könnten außerdem einen evolutionär flexiblen Bestandteil von RNA-Bindeproteinen darstellen, die sich mit steigender Komplexität der eukaryotischen Transkriptome mit entwickelt haben. Ein Hinweis dafür ist eine Zunahme in der Anzahl von Arginin und Lysin *repeats* in IDRs von ausgewählten RNA-Bindeproteinen im Menschen, verglichen mit den homologen RNA-Bindeproteinen in Hefe. Dagegen blieb die Anzahl und Identität der globulären Domänen in diesen Proteinen gleich (Beckmann *et al.* 2015, Hentze *et al.* 2018). Basierend auf dem Entropie-Transfer-Modell können diese unstrukturierten Bereiche der RNA-Chaperone bei der Bindung einer Ziel-RNA zu einer geordneten Struktur übergehen und dabei die benötigte Energie für den RNA-Umstrukturierungsprozess bereitstellen (Tompa und Csermely 2004, Rajkowitsch *et al.* 2007). Auch die Mosquito-Proteine zeigen in ihrer Sekundärstruktur *random-coil*-Strukturen und sind in der Gesamtheit ihrer Sekundärstrukturelemente sehr ähnlich. Jedoch konnte mit Hilfe von verschiedenen Vorhersageprogrammen wie *Predictor of Natural Disordered Regions* (PONDR) und *Prediction of Intrinsically Unstructured Proteins* (IUPred2) festgestellt werden, dass sich die Proteine vermutlich innerhalb der C-terminalen Region im Anteil an ungeordneten Strukturen unterscheiden (Abb. 32A, B). So weist Squid-p32 im Bereich des YGG-Motivs durch die zusätzlichen 20 Aminosäuren einen Bereich von insgesamt von 43 Aminosäuren auf, welcher strukturierter vorliegt als bei Squid-p30 (Abb. 32B, PONDR). Bei Squid-p30 ist dieser Bereich nur 9 Aminosäuren lang und vermutlich unstrukturiert (Abb. 32, PONDR).

So liegt der *score*, welcher die Wahrscheinlichkeit angibt, dass der jeweilige Aminosäurerest Teil einer unstrukturierten Region ist, bei Squid-p30 in diesem Bereich bei ca. 0.5 und bei Squid-p32 bei 0.2. Dabei entsprechen höhere Werte einer höheren Wahrscheinlichkeit auf unstrukturierte Bereiche (1 entspricht dem höchsten Wert). Durch diesen größeren Bereich an unstrukturierten Regionen könnte die stärkere RNA-Bindeaffinität von Squid-p30 im Vergleich zu Squid-p32 verursacht werden, da unstrukturierte Regionen zur RNA-Bindung beitragen können (Jarvelin *et al.* 2016, Hentze *et al.* 2018). Die etwas verminderte RNA-Chaperon-Aktivität von Squid-p30 verglichen mit Squid-p32 könnte in dem Zusammenhang, wie bereits unter 4.2.2. beschrieben, mit einer zu starken Bindung von Squid-p30 an die Ziel-RNA erklärt werden. Grundsätzlich erlaubt das bloße Vorhandensein von IDRs aber keine Vorhersage von RNA-Chaperon-Aktivität, da diese ein komplexes Zusammenspiel aus RNA-Bindung und RNA-Umstrukturierungsaktivitäten umfasst.

A



B



**Abbildung 32: Vergleich der unstrukturierten Regionen von Squid-p30 und Squid-p32.**

(A) Dargestellt sind die vorhergesagten unstrukturierten Bereiche in Squid-p30. Erstellte wurden diese mit dem Programm IUPred2 basierend auf einem biophysikalischen Modell (Dosztanyi et al. 2005). Der score gibt für jeden Aminosäurerest eine Zahl zwischen 0 und 1 an, welche der Wahrscheinlichkeit entspricht, dass der jeweilige Rest Teil einer unstrukturierten Region ist. Dabei entsprechen höhere Werte einer höheren Wahrscheinlichkeit auf unstrukturierte Bereiche. Die Analyse wurde mit dem Vorhersage-Typ *long disorder*, welcher für die Vorhersage von unstrukturierten Bereichen von mindestens 30 aufeinander folgenden Aminosäureresten optimiert ist, durchgeführt (IUPred2 (long)). Mit blau gestrichelten Linien ist der Bereich dargestellt, welcher sich stark von Squid-p32 unterscheidet. Im unteren Teil der Grafik sind schematisch die bekannten Proteindomänen RRM1 und RRM2 (RNA *recognition motifs*) und die Proteinmotive RGG/RG und YGG dargestellt. (B) Dargestellt sind die vorhergesagten unstrukturierten Bereiche in Squid-p32. Alle weiteren Grafikbestandteile und Analysen entsprechen den Ausführungen unter (A).

### 4.3. Mögliche Genduplikation des Squid-Gens in *A. albopictus*

Die Asiatische Tigermücke (*A. albopictus*) gehört zu den erfolgreichsten invasiven Stechmückenarten weltweit (Lounibos 2002, Benedict et al. 2007). Dieser Erfolg spiegelt sich auch im Genom der Asiatischen Tigermücke wider, welches 1343 Mb umfasst und damit das bisher größte entschlüsselte Genom einer Stechmückenart ist. Es ist damit um ein Vielfaches größer als die Genome verwandter Stechmückenarten wie der südlichen Hausmücke (*Culex quinquefasciatus*) mit 324 Mb und der Stechmückenart *A. gambiae* mit 62 Mb. Auch verglichen mit dem Genom einer Stechmückenart der gleichen Gattung wie der Gelbfiebermücke (*A. aegypti*), deren Genom 988 Mb umfasst, ist das Genom der Asiatischen Tigermücke deutlich größer. Ein Teil dieser Genomgröße ist auf repetitive DNA-Sequenzen zurückzuführen (Chen et al. 2015). Es wird vermutet, dass das größere Gen-Repertoire, welches beteiligt ist an Insektizidresistenz, Diapause, Geschlechtsfestlegung, Immunität und Olfaktion, zu der großen Plastizität und Anpassungsfähigkeit der invasiven Spezies beiträgt (Chen et al. 2015).

In dem Zusammenhang ist auch bei der Anzahl der Genloci der Mosquito-Proteine Squid-p32 und Squid-p30 ein Unterschied zwischen den *Aedes*-Spezies zu beobachten. So existieren in der Genomsequenzierung der *A. albopictus* Mücken (PRJNA552090, NCBI) und der Genomsequenzierung der C6/36-Zellen (*A. albopictus*, PRJNA357111, NCBI) zwei Genloci, die jeweils für Squid-p30 und Squid-p32 kodieren (Abb. 29), während in der Genomsequenzierung von *A. aegypti* (PRJNA392114, NCBI) nur ein Genlocus (LOC5579810) kodierend für beide Squid-Proteine existiert. So ist es wahrscheinlich, dass in der Asiatischen Tigermücke eine Genduplikation des Squid-Gens stattgefunden hat. Genduplikation ist ein wesentlicher Mechanismus in der Evolution von verschiedenen Spezies.



Dabei kann eine Duplikation eines Genes vorteilhaft für den Organismus sein, da so zusätzliche Mengen an RNA und Protein bereitgestellt werden können. Abgesehen von diesem Vorteil ist es unwahrscheinlich, dass zwei Gene mit der gleichen Funktion im Genom stabil vorhanden sind. So wird in der theoretischen Populationsgenetik angenommen, dass zwei ähnliche Gene im Genom stabil vorhanden sein können, wenn sie sich in einigen funktionellen Aspekten unterscheiden. Genduplikation stellt neues Genmaterial für Mutation und Selektion zur Verfügung, welches dann zu spezialisierten oder neuen Funktionen von Genen führen kann und dient somit der Plastizität eines Genoms oder einer Spezies, sich an zu verändernde Umgebungen anzupassen (Zhang und Cheng 2003). Auch die Vielfalt der hnRNP-Genfamilie im Menschen ist vermutlich durch zahlreiche Genduplikationsereignisse entstanden (Busch und Hertel 2012). Da die zelluläre Funktion der Squid-Gene und -Proteine unbekannt ist, kann keine Aussage zu einer veränderten Funktion der duplizierten Gene getroffen werden. Da die Aminosäureanzahl und -sequenz der Squid-Proteine durch die Genduplikation nicht verändert wurde, spricht dies für einen Vorteil im Vorhandensein einer größeren RNA- und Proteinmenge.

Für die homologen Squid-Proteine aus *D. melanogaster* (Squid-S, Squid-A und Squid-B) dagegen konnten schon vor teilweise über 20 Jahren detaillierte zelluläre Funktionen aufgeklärt werden (siehe 1.9). So sind Squid-S und Squid-A im Zusammenspiel essentiell für die Ausbildung der dorsoventralen Achse während der Oogenese, indem sie die Lokalisierung und Translation von *grk*-mRNA regulieren (Norvell *et al.* 1999). Das als Ligand fungierende Gurken-Protein (Grk, TGF $\alpha$ -Homolog) aktiviert den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (Egfr) (Neuman-Silberberg und Schupbach 1993) und induziert damit eine dorsale Differenzierung der Follikelzellen. Da Grk die Polarität des Eis und so auch die des Embryos definiert, muss das Grk-Signal räumlich zu der zukünftigen dorsalen Seite begrenzt werden. Dies wird durch die strenge Lokalisierung der *grk*-mRNA im dorsoanterioren Pol der Oozyte erreicht (Nilson und Schupbach 1999). Squid-Mutationen führen zu einer Fehllokalisierung von *grk*-RNA, was eine Entstehung von stark dorsalisierten Eiern und Embryonen bewirkt (Kelley 1993, Neuman-Silberberg und Schupbach 1993).

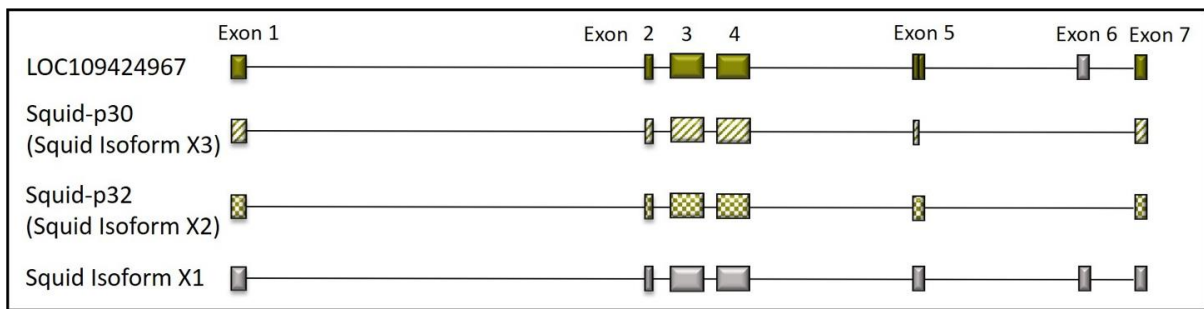
Eine ähnlich wichtige Funktion der Squid-Proteine in der Ontogenese ist vorstellbar, da innerhalb des Screenings des CRISPR/Cas9-vermittelten Gen-*knockouts* von Squid-p30 und Squid-p32 in Mosquitozellen kein einziger homozygoter KO detektiert werden konnte. Somit wurde vermutet, dass ein homozygoter KO der Squid-Proteine letal für die Mosquitozellen ist und die Proteine eine essentielle Funktion besitzen. Zusätzlich konnte bei heterozygoten Squid-p30- und Squid-p32-KO-Zellen eine zelluläre Gegenregulation beobachtet werden, welche diese Vermutung unterstützt.

#### 4.3.1. Möglicherweise existiert ein größeres Inventar von Squid-Isoformen

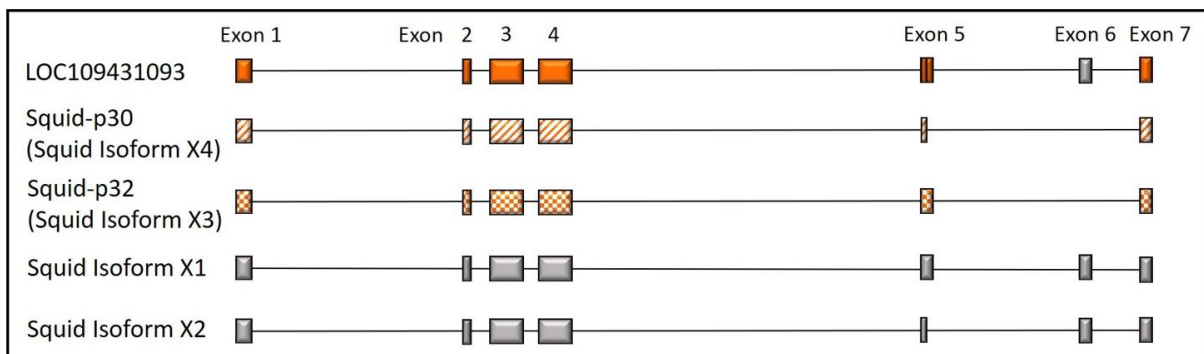
Bei der BLAST-Suche (NCBI) nach Sequenzübereinstimmungen zu AUF1p45 in *A. albopictus* (Genomsequenzierung PRJNA357111) konnten neben Squid-p30 und Squid-p32 noch weitere potentielle Squid-Isoformen identifiziert werden. Dabei sind bei LOC109424967 potentiell drei Isoformen annotiert und bei LOC109431093 sogar vier Isoformen (Abb. 33). Beide Squid-Gene besitzen insgesamt sieben Exons, wobei Exon 6 beim alternativen Spleißen der prä-mRNA beider Squid-Proteine übersprungen wird (Abb. 29). So unterscheiden sich die potentiellen Isoformen Squid X1 (326 AA) und Squid X2 (306 AA) von Squid-p30 und Squid-p32 in der Anwesenheit von Exon 6, welches für weitere 25 Aminosäuren kodiert (Abb. 33).

Diese zusätzlichen 25 Aminosäuren (DDYYGGYNDGYGNGGGRPGGPRGGK) würden das RGG/RG- und YGG-Motiv von Squid-p30 und Squid-p32 verlängern. Dadurch könnten die potentiellen Isoformen Squid X1 und Squid X2 höhere RNA-Umstrukturierungsaktivitäten als Squid-p30 und Squid-p32 aufweisen. In den Mosquitozellen C6/36 und U4.4 konnten jeweils nur zwei Squid-Isoformen mittels Western Blot detektiert werden (Abb. 20). Weiterhin konnte mit Analyse der Transkriptvarianten in den Mosquitozellen ebenfalls keine RNA, welche zusätzlich für Squid X1 und Squid X2 kodieren, identifiziert werden. Daher ist es vorstellbar, dass die Synthese der weiteren theoretischen Isoformen möglicherweise nur unter bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel bei einer Virusinfektion, induziert wird oder dass die Isoformen in den Zellen nicht existieren. Auch in der aktuelleren Genomsequenzierung PRJNA552090 (NCBI), welche auf genomischer DNA aus *A. albopictus* Mücken beruht, konnten ebenfalls zusätzliche potentielle Squid-Isoformen identifiziert werden. Dabei handelt es sich bei beiden Genloci ebenso um die in Abbildung 33B dargestellten Squid-Isoformen X1 und X2 sowie eine weitere Squid-Isoform X4 (289 AA). Somit ist dies nicht nur ein C6/36 spezifisches Phänomen.

A



B



**Abbildung 33: Schematische Darstellung der potentiellen Squid-Isoformen. (A)** Dargestellt ist der Genlocus LOC109424967 der Genomsequenzierung PRJNA357111, welcher für die Squid-Isoformen p30 und p32 und zusätzlich für die potentielle Isoform X1 kodiert. Squid X1 unterscheidet sich von Squid-p32 (bei NCBI Squid Isoform X2 genannt) durch die von Exon 6-kodierten 25 Aminosäuren. Exon 6 wird bei Squid-p30 und Squid-p32 beim alternativen Spleißen der prä-mRNA übersprungen. **(B)** Dargestellt ist der Genlocus LOC109431093 der Genomsequenzierung PRJNA357111, welcher für die Squid-Isoformen p30 und p32 und zusätzlich für die potentiellen Isoformen X1 und X2 kodiert. Die Squid-Isoformen X1 und X2 unterscheiden sich von Squid-p30 (bei NCBI Squid Isoform X4 genannt) und Squid-p32 (bei NCBI Squid Isoform X3 genannt) durch die von Exon 6-kodierten 25 Aminosäuren. Exon 6 wird bei Squid-p30 und Squid-p32 beim alternativen Spleißen der prä-mRNA übersprungen.

#### 4.4. AUF1-homologe Proteine in Vögeln

Vor dem Hintergrund der Untersuchung AUF1-homologer Mosquito-Proteine auf eine Wirtsfaktorfunktion und dem RNA-Thermometer Modell für den 3'SL des WNV von Meyer *et al.* (2020) stellt sich die Frage, ob in Vögeln ebenso Wirtsfaktoren wie im Menschen existieren. Da Vögel die höchsten Virustiter erreichen und so den Bestand des Virus in der Umwelt gewährleisten, ist dies gut vorstellbar.

Übertragungsrelevante Vogelarten sind beispielsweise der Blauhäher (*Cyanocitta cristata*), der Hausgimpel (*Carpodacus mexicanus*), die Amerikanerkrähe (*Corvus brachyrhynchos*), die Purpurgrackel (*Quiscalus quiscula*), die Wanderdrossel (*Turdus migratorius*) und der Haussperling (*Passer domesticus*).

Diese Vogelarten tragen vermutlich am meisten zur viralen Vermehrung und Übertragung des WNV auf Mosquitos bei (Komar *et al.* 2003, Hamer *et al.* 2009). Vogelarten der Ordnungen Sperlingsvögel (*Passeriformes*) und Regenpfeiferartige (*Charadriiformes*) sind besonders Virus-Reservoir-kompetent. Außerdem ernähren sich Mücken des Artenkomplex *Culex pipiens* bevorzugt von Sperlingsvögeln (Gomes *et al.* 2013, Hamer *et al.* 2009). Eine BLAST-Suche (NCBI) nach Sequenzübereinstimmungen zu AUF1p45 innerhalb der Klasse Vögel zeigte das homologe Protein *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0* (hnRNPD0) in einer Vielzahl von verschiedenen Vogelarten. Darunter einige Vogelarten der Ordnung Sperlingsvögel wie die Amerikanerkrähe und die Geradschnabelkrähe (*Corvus moneduloides*). Ebenso wurde das Protein in Vogelarten der Ordnung Regenpfeiferartige wie dem Keilschwanz-Regenpfeifer (*Charadrius vociferus*) gefunden (NCBI). Vermutlich könnte man homologe Proteine in mehr übertragungsrelevanten Vogelarten identifizieren. Von den oben genannten Vogelarten sind jedoch bisher nur die Genome der Amerikanerkrähe und des Haussperlings sequenziert wurden (NCBI). Die AUF1-homologen Vogel-Proteine besitzen, wie die Squid-Proteine und das humane AUF1p45 zwei RRM-Domänen, ein RGG/RG- und ein YGG-Motiv. Des Weiteren weisen die homologen Vogel-Proteine ab den RRM-Domänen eine nahezu perfekte Identität in der Aminosäuresequenz zu AUF1p45 auf (Abb. 34).

Bei Betrachtung des homologen hnRNPD0 in verschiedenen Vogelarten ist auffällig, dass im Gegensatz zu den humanen AUF1-Isoformen in allen homologen Vogel-Isoformen das YGG-Motiv vorhanden ist. So konnte bereits von Gueroussov *et al.* (2017) gezeigt werden, dass anders als bei den humanen AUF1-Isoformen, bei Vögeln das alternative Spleißen des prä-mRNA-Transkripts nicht die kleineren Isoformen AUF1p37 und AUF1p40, welchen die durch Exon 7-kodierte Region fehlt, generiert. Dies könnte eine Erklärung für die sehr hohen Virustitern bei Vögeln sein, da ausschließlich AUF1-Isoformen mit YGG-Motiv, welche die höchsten RNA-Umstrukturierungsaktivitäten aufweisen (Sänger *et al.* 2020, eingereicht), vorhanden sind. Weiterhin gibt es zwischen verschiedenen Vogelarten große Unterschiede in der Infektionsanfälligkeit für das WNV. So zeigen, wie bereits erwähnt, Sperlingsvögel eine hohe Virämie und Mortalitätsrate, wogegen Arten der Ordnung Hühnervögel (*Galliformes*) nur eine sehr geringe Virämie und keine Morbidität oder Mortalität aufweisen (Duggal *et al.* 2019). Es wird vermutet, dass der Verlauf einer Infektion von der angeborenen Immunantwort beeinflusst ist, welche bei Vögeln im Zusammenhang mit WNV-Infektionen kaum erforscht ist (Duggal *et al.* 2019).

Auch hier könnte die Infektionsanfälligkeit eines Vogels für das WNV mit einem unterschiedlichen Vorkommen oder dem Expressionsmuster der AUF1-homologen Proteine korrelieren. Um dies zu untersuchen, könnte man die hnRNPD0-Expression in verschiedenen Vogelarten mit unterschiedlicher WNV-Anfälligkeit bei infizierten und nicht-infizierten Vögeln untersuchen. Generell ist über Wirtsfaktoren im Vogelwirt bisher noch weniger bekannt als im Mosquito-Vektor. Die Untersuchung dieser könnte weitere Einblicke in Übertragungs- und Vermehrungsstrategien von Flaviviren liefern.

AUF1p45	MSEEQFGGDGAAAAATAAVGGSAGEQEGAMVAATQGAAAAAGSGAGTGGGTASGGTEGGS	60
hnRNPD0 1	MSDQQFALDSAAVAAGAGDG-----AAEPAEQ---PEGQAGAGSTDGGGGGGGGGG	49
hnRNPD0 2	-----	0
hnRNPD0 3	-----	0
AUF1p45	AESEGAkidaskNEEDEGHsNS---SPRHSEATAQREEWKMFIGGLSWDttKkDLkDYF	117
hnRNPD0 1	IESEGAkidaskNEEDE-----GKMFIGGLSWDttKkDLkDYF	87
hnRNPD0 2	-----ESLYLSWPESFKQAVKNCRPV---KMFIGGLSWDttKkDLkDYF	41
hnRNPD0 3	-----LIWPGSFKHVLKKCRPVRVgKMFIGGLSWDttKkDLkDYF	40
	*****	
AUF1p45	SKfGEVVDCTLkLDPITGRSRGfGFVLFkESEsVDKvMDQkEHkLNGkVI DPKRAKAMKT	177
hnRNPD0 1	SKfGEVVDCTLkLDPITGRSRGfGFVLFkESEsVDKvMDQkEHkLNGkVI DPKRAKAMKT	147
hnRNPD0 2	SKfGEVVDCTLkLDPITGRSRGfGFVLFkESEsVDKvMDQkEHkLNGkVI DPKRAKAMKT	101
hnRNPD0 3	SKfGEVVDCTLkLDPITGRSRGfGFVLFkESEsVDKvMDQkEHkLNGkVI DPKRAKAMKT	100
	*****	
AUF1p45	KEPvKKIFVgGLSPDTPEEKIREYfGGfGEVESIElPMDNkTNkRRGfCFITfKEEePVk	237
hnRNPD0 1	KEPvKKIFVgGLSPDTPEEKIREYfGGfGEVESIElPMDNkTNkRRGfCFITfKEEePVk	207
hnRNPD0 2	KEPvKKIFVgGLSPDTPEEKIREYfGGfGEVESIElPMDNkTNkRRGfCFITfKEEePVk	161
hnRNPD0 3	KEPvKKIFVgGLSPDTPEEKIREYfGGfGEVESIElPMDNkTNkRRGfCFITfKEEePVk	160
	*****	
AUF1p45	KIMEkKYHNvGLSkCEIKVAMSKEQYQQQQWGSrGGfVGRARgRGGGpSQNWNQGYsNY	297
hnRNPD0 1	KIMEkKYHNvGLSkCEIKVAMSKEQYQQQQWGSrGGfVGRARgRGGGpSQNWNQGYsNY	267
hnRNPD0 2	KIMEkKYHNvGLSkCEIKVAMSKEQYQQQQWGSrGGfVGRARgRGGGpSQNWNQGYsNY	221
hnRNPD0 3	KIMEkKYHNvGLSkCEIKVAMSKEQYQQQQWGSrGGfVGRARgRGGGpSQNWNQGYsNY	220
	*****	
AUF1p45	WNQgYGNyGyNSQgYgGyGgYdYtGyNNyYgYgDySNQqSGYgKvSRrGGHqNSyKpY	355
hnRNPD0 1	WNQgYGNyGyNSQgYgGyGgYdYtGyNNyYgYgDySNQqSGYgKvSRrGGHqNSyKpY	325
hnRNPD0 2	WNQgYGNyGyNSQgYgGyGgYdYtGyNNyYgYgDySNQqSGYgKvSRrGGHqNSyKpY	279
hnRNPD0 3	WNQgYGNyGyNSQgYgGyGgYdYtGyNNyYgYgDySNQqSGYgKvSRrGGHqNSyKpY	278
	*****	

**Abbildung 34: AUF1-homologe Vogel-Proteine verschiedener Vogelarten besitzen ab den RRM-Domänen eine nahezu identische Aminosäuresequenz zu AUF1p45.** Dargestellt ist ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von AUF1p45, hnRNPD0 der Geradschnabelkrähe (hnRNPD0 1), hnRNPD0 der Amerikanerkrähe (hnRNPD0 2) und hnRNPD0 des Keilschwanz-Regenpfeifers (hnRNPD0 3). Die RRM-Domänen sind in Grün, das RGG/RG-Motiv ist in Blau und das YGG-Motiv ist in Beige markiert. Das *alignment* wurde mit dem Programm Clustal Omega erstellt. Der Stern steht für identische Aminosäuren und ein einzelner Punkt steht für geringe Ähnlichkeit der chemischen Eigenschaften der verglichenen Aminosäuren.

## 4.5. Ausblick

Die Aktivitätsunterschiede der Mosquito-Proteine Squid-p30 und Squid-p32 konnten in dieser Arbeit in Bezug auf die RNA-Bindungsaffinität und die RNA-Chaperon-Aktivität analysiert werden. Bisher wurden aber keine Interaktionsanalysen der Proteine *in vitro* oder *in cellulo* durchgeführt. So könnte mit Hilfe eines *protein-fragment complementation assays* (PCA) oder *pull-down assays* untersucht werden, ob die Squid-Proteine in Mosquitozellen miteinander interagieren und möglicherweise Proteinkomplexe bilden. Ein erster Hinweis auf eine gegenseitige Regulierung konnte durch den Versuch, spezifisch Squid-p30 oder Squid-p32 siRNA-vermittelt zu depletieren, gewonnen werden. So führte der Versuch, ausschließlich Squid-p32 zu depletieren, ebenfalls zu einer Herunterregulierung von Squid-p30, obwohl die verwendete siRNA-Sequenz in Squid-p30 nicht vorhanden war (Daten nicht gezeigt). In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant, eine mögliche Homo-Oligomerisierung von Squid-p32, welche zum Teil bei der Proteinreinigung beobachtet werden konnte, näher zu untersuchen. Die RNA-induzierte Protein-Oligomerisierung stellt eine Möglichkeit dar, warum Squid-p32 eine höhere RNA-Chaperon-Aktivität aufweist als Squid-p30 und könnte beispielsweise mit Hilfe von nativer Massenspektrometrie untersucht werden.

Es konnte mit Hilfe der Mutationsanalyse der Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs von Squid-p32 identifiziert werden, dass der Austausch der Tryptophane zu Alanin die RNA-Bindung des Proteins verbesserte, aber die RNA-Chaperon- und RNA-*annealing*-Aktivität verschlechterte. Nun wäre es naheliegend, ebenso die Tyrosine innerhalb des YGG-Motivs von Squid-p32 auszutauschen, um zu sehen, ob dadurch die RNA-Umstrukturierungsaktivität der Squid-p32-Varianten komplett verloren geht.

Ebenso wäre es interessant, die unter 4.4. dargestellten AUF1-homologen Vogel-Proteine hnRNPDO rekombinant zu synthetisieren, zu reinigen und in den bereits etablierten *in vitro* Analysen auf ihre RNA-Bindung, RNA-Chaperon-Aktivität und RNA-*annealing*-Aktivität zu testen. Die virale Wirtsfaktorfunktion dieser Proteine könnte in einer Vogel-Zelllinie über *knockdown* Experimente mit anschließender Transfektion eines WNV-Replikons untersucht werden. Dies könnte die bisherigen Kenntnisse über die molekularen Mechanismen, welche es dem WNV ermöglichen den Wirtswechsel von Stechmücke zu Vogel oder Mensch zu regulieren erweitern, sowie Erklärungen für die unterschiedliche Anfälligkeit verschiedener Vogelarten für das WNV liefern.

## V. Zusammenfassung

Viren besitzen keinen eigenen Stoffwechsel und sind aufgrund ihrer geringen Genomgröße abhängig von den zellulären Mechanismen einer Wirtszelle. So nutzen Viren in verschiedenen Phasen ihres viralen Lebenszyklus zahlreiche zelluläre Proteine als Wirtsfaktoren. Einer dieser Wirtsfaktoren ist das humane RNA-Bindeprotein AUF1p45, welches mit Hilfe von zwei RNA-Umstrukturierungsaktivitäten die Genomzyklisierung und Replikation des West-Nil-Virus (WNV) und weiterer Flaviviren unterstützt. Das WNV ist ein von Stechmücken übertragenes und weit verbreitetes (+)-Strang-RNA-Virus der Familie *Flaviviridae*. Da es naheliegend ist, dass Spezies, welche im Übertragungszyklus involviert sind, konservierte Wirtsfaktoren besitzen, war es von Interesse, zwei AUF1p45-homologe Mosquito-Proteine Squid-p30 und Squid-p32 zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Squid-Proteine *in vitro* charakterisiert und Unterschiede in der Aktivität der Proteine sowie deren Ursache identifiziert werden. Des Weiteren wurden Zellkulturexperimente durchgeführt, um den Einfluss der Squid-Proteine auf die WNV-Replikation zu analysieren.

1. Die Squid-Proteine konnten erfolgreich rekombinant in *E. coli* synthetisiert und analog zu dem Reinigungsprotokoll von AUF1p45 gereinigt werden. Ebenso konnte das Molekulargewicht der Squid-Proteine mittels analytischer Ultrazentrifugation analysiert werden. Beide Squid-Proteine liegen ebenso wie das humane AUF1 als Monomer vor.
2. In einem *in vitro* Methylierungsassay konnte mit Hilfe der humanen Methyltransferase PRMT1 gezeigt werden, dass immunpräzipitiertes FLAG-Squid-p30 und FLAG-Squid-p32, isoliert aus zwei verschiedenen *A. albopictus*-Zelllinien (C6/36-Zellen und U4.4-Zellen), nicht-methyliert ist.
3. In einem RNA-Bindungs-Assay konnte bestimmt werden, dass beide Squid-Proteine eine RNA-Bindesepezifität für AU/GU-reiche RNA, verglichen mit einer unspezifischen RNA, aufweisen. Dabei konnte für Squid-p30 eine zehnfach höhere RNA-Bindeaffinität zur AU/GU-reichen RNA als bei Squid-p32 festgestellt werden. Generell sind die Substratspezifität sowie die Bindungsaffinität bei den Squid-Proteinen aber geringer ausgeprägt als bei AUF1p45.
4. Die Squid-Proteine zeigten in den fluorimetrischen RNA-RNA-Interaktionsassays eine RNA-Chaperon-Aktivität, welche bei Squid-p32 etwas stärker ausgeprägt ist, und eine schwache RNA-*annealing*-Aktivität, welche bei beiden Proteinen nahezu identisch ist. Die zwei RNA-

Umstrukturierungsaktivitäten sind deutlich schwächer ausgeprägt als die des humanen Wirtsfaktors AUF1p45. Ebenso konnte festgestellt werden, dass diese RNA-Umstrukturierungsaktivitäten der Squid-Proteine nicht temperaturabhängig sind. So zeigte die Erhöhung der Temperatur keinen bzw. kaum einen Effekt auf die RNA-Chaperon- und RNA-*annealing*-Aktivität der Squid-Proteine, im Gegensatz zu AUF1p45.

5. Die Squid-Proteine stimulieren in einem RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Assay, welcher den ersten Replikationsschritt des WNV rekonstituiert, die (-)-Strang-RNA-Synthese des WNV sehr stark. Verglichen mit AUF1p45 konnte im Kontrast zu den bisher ermittelten Aktivitäten der Squid-Proteine eine deutlich stärkere Stimulation der (-)-Strang-RNA-Synthese festgestellt werden. Squid-p30 zeigte zudem eine größere Verstärkung der (-)-Strang-RNA-Synthese als Squid-p32.
6. Squid-p32 unterscheidet sich von Squid-p30 durch 20 zusätzliche Aminosäuren, welche ein YGG-Motiv verlängern. Innerhalb des YGG-Motivs befinden sich zwei Tryptophane. Um die Bedeutung dieser Tryptophane auf die Aktivität von Squid-p32 zu untersuchen, wurde eine Mutationsanalyse durchgeführt.
  - a. Die Squid-p32-Varianten Squid-p32<sub>W261A</sub>, Squid-p32<sub>W264A</sub> und Squid-p32<sub>W261,264A</sub> konnten erfolgreich rekombinant in *E. coli* synthetisiert und analog zu dem Reinigungsprotokoll von AUF1p45 gereinigt werden.
  - b. Die Fern-UV-CD-Spektren der Squid-p32-Varianten konnten bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass die Proteine eine strukturelle Integrität besitzen und sich der Sekundärstrukturgehalt aufgrund des Aminosäureaustauschs nicht schwerwiegend verändert hat.
  - c. In einem RNA-Bindungs-Assay konnte gezeigt werden, dass die Squid-p32-Varianten eine zehnfach höhere RNA-Bindeaffinität zu AU/GU-reicher RNA aufwiesen, als das WT-Protein. Die RNA-Bindeaffinität zur unspezifischen RNA ist bei den Squid-p32-Varianten ebenfalls leicht erhöht. Der Austausch der Tryptophane führte somit zu einer stärkeren Bindung an spezifische und unspezifische RNA. Im Gegensatz dazu konnte in den fluorimetrischen RNA-RNA-Interaktionsassays eine beeinträchtigte RNA-Chaperon- und RNA-*annealing*-Aktivität der Squid-p32-Varianten festgestellt werden. So leisten die Tryptophane innerhalb des YGG-Motivs einen wichtigen Beitrag zur RNA-Umstrukturierungsaktivität von Squid-p32.



7. Es konnte eine RNAi-vermittelte Depletion der Squid-Proteine in zwei *A. albopictus*-Zelllinien (C6/36 und U4.4) etabliert werden. Diese Depletion hatte aber in keiner der beiden Zelllinien, bei erhöhter oder normaler Kultivierungstemperatur, einen negativen Effekt auf die Replikation eines WNV<sub>R</sub>luc-Replikons.
8. Es konnte ein CRISPR/Cas9-vermittelter heterozygoter Gen-*knockout* der Squid-Proteine in C6/36-Zellen generiert werden. Dieser induzierte vermutlich eine zelluläre Hochregulierung der Squid-Proteine in C6/36-Zellen, weswegen die Analyse der heterozygoten KO-Zellen nicht weiter fortgesetzt wurde.
9. Mit einer BLAST-Suche gegen das *A. albopictus* Genom konnten zwei Genloci identifiziert werden, welche potentiell für Squid-p30 und Squid-p32 kodieren. Die Existenz von zwei Squid-Genen in C6/36-Zellen konnte experimentell auf RNA- und DNA-Ebene bestätigt werden. So kodieren in C6/36-Zellen zwei Gene jeweils für Squid-p30 und Squid-p32, im Gegensatz zu den humanen AUF1-Proteinen, welche alle durch ein Gen kodiert werden.
10. Es konnte auf Basis der in dieser Arbeit generierten Daten ein RNA-Thermometer-Modell entwickelt werden, in welchem der 3'SL des WNV durch eine temperaturabhängige Flexibilität die Replikationseffizienz während des Wirtwechsels von Stechmücke zu Vogel oder Mensch moduliert. Innerhalb dieses Modells hat sich die Wirtsfaktorfunktion von AUF1p45 vermutlich erst in Vertebraten entwickelt, in welchen die Proteine höhere RNA-Umstrukturierungsaktivitäten zeigen, methyliert vorliegen, eine höhere Aktivität bei höheren Temperaturen aufweisen und mit mehreren Isoformen eine insgesamt höhere Wirtsfaktorfunktion erreichen.

## VI. Literaturverzeichnis

- Agis-Juarez R. A., Galvan I., Medina F., Daikoku T., Padmanabhan R., Ludert J. E. und del Angel R. M.** 2009. 'Polypyrimidine tract-binding protein is relocated to the cytoplasm and is required during dengue virus infection in vero cells'. *Journal of General Virology*, 90: 2893-2901.
- Ahlquist P., Noueiry A. O., Lee W. M., Kushner D. B. und Dye B. T.** 2003. 'Host factors in positive-strand RNA virus genome replication'. *Journal of Virology*, 77(15): 8181-8186.
- Akiner M. M., Ozturk M., Baser A. B., Gunay F., Hacıoglu S., Brinkmann A., Emanet N., Alten B., Ozkul A., Nitsche A., et al.** 2019. 'Arboviral screening of invasive *Aedes* species in northeastern Turkey: West Nile virus circulation and detection of insect-only viruses'. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 13(5): e0007334.
- Alvarez D. E., Ezcurra A. L. D., Fucito S. und Gamarnik A. V.** 2005a. 'Role of RNA structures present at the 3' UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication'. *Virology*, 339(2): 200-212.
- Alvarez D. E., Filomatori C. V. und Gamarnik A. V.** 2008. 'Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3' UTRs'. *Virology*, 375(1): 223-235.
- Alvarez D. E., Lodeiro M. F., Luduena S. J., Pietrasanta L. I. und Gamarnik A. V.** 2005b. 'Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome'. *Journal of Virology*, 79(11): 6631-6643.
- Anglero-Rodriguez Y. I., MacLeod H. J., Kang S., Carlson J. S., Jupatanakul N. und Dimopoulos G.** 2017. '*Aedes aegypti* molecular responses to Zika Virus: modulation of infection by the Toll and Jak/Stat immune pathways and virus host factors'. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2050.
- Anwar A., Leong K. M., Ng M. L., Chu J. J. H. und Garcia-Blanco M. A.** 2009. 'The polypyrimidine tract-binding protein is required for efficient dengue virus propagation and associates with the viral replication machinery'. *Journal of Biological Chemistry*, 284(25): 17021-17029.
- Arao Y., Kuriyama R., Kayama F. und Kato S.** 2000. 'A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D'. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 380(2): 228-236.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Sedman J. G., Smith J. A. und Struhl K.** 1993. 'Current protocols in molecular biology'.
- Baker C. M. und Grant G. H.** 2007. 'Role of aromatic amino acids in protein-nucleic acid recognition'. *Biopolymers*, 85(5-6): 456-470.
- Bartel D. P.** 2004. 'MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function'. *Cell*, 116(2): 281-297.
- Bassett A. R., Tibbit C., Ponting C. P. und Liu J. L.** 2014. 'Mutagenesis and homologous recombination in *Drosophila* cell lines using CRISPR/Cas9'. *Biology Open*, 3(1): 42-49.
- Beckmann B. M., Horos R., Fischer B., Castello A., Eichelbaum K., Alleaume A. M., Schwarzl T., Curk T., Foehr S., Huber W., et al.** 2015. 'The RNA-binding proteomes from yeast to man harbour conserved enigmRBPs'. *Nature Communications*, 6: 10127.
- Bedford M. T. und Richard S.** 2005. 'Arginine methylation an emerging regulator of protein function'. *Molecular Cell*, 18(3): 263-272.
- Behrens S.-E., Tomei L. und De Francesco R.** 1996. 'Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus'. *The EMBO Journal*, 15(1): 12-22.
- Benedict M. Q., Levine R. S., Hawley W. A. und Lounibos L. P.** 2007. 'Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*'. *Vector Borne Zoonotic Disease*, 7(1): 76-85.
- Berthet F. X., Zeller H. G., Drouet M. T., Rauzier J., Digoutte J. P. und Deubel V.** 1997. 'Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses'. *Journal of General Virology*, 78: 2293-2297.
- Bhattacharya A., Prajapati R., Chatterjee S. und Mukherjee T. K.** 2014. 'Concentration-dependent reversible self-oligomerization of serum albumins through intermolecular beta-sheet formation'. *Langmuir*, 30(49): 14894-14904.

- Bhullar D., Jalodia R., Kalia M. und Vрати S.** 2014. 'Cytoplasmic translocation of polypyrimidine tract-binding protein and its binding to viral RNA during Japanese encephalitis virus infection inhibits virus replication'. *PLoS One*, 9(12): e114931.
- Blackwell J. L. und Brinton M. A.** 1997. 'Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 3' stem-loop region of West Nile virus genomic RNA'. *Journal of Virology*, 71(9): 6433-6444.
- Blair C. D.** 2011. 'Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission'. *Future Microbiology*, 6(3): 265-277.
- Brackney D. E., Scott J. C., Sagawa F., Woodward J. E., Miller N. A., Schilkey F. D., Mudge J., Wilusz J., Olson K. E., Blair C. D., et al.** 2010. 'C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response'. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(10): e856.
- Bradford M. M.** 1976. 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding'. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brinton M. A.** 2002. 'The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere'. *Annual Review of Microbiology*, 56: 371-402.
- Brinton M. A. und Dispoto J. H.** 1988. 'Sequence and secondary structure-analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA'. *Virology*, 162(2): 290-299.
- Brinton M. A., Fernandez A. V. und Dispoto J. H.** 1986. 'The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure'. *Virology*, 153(1): 113-121.
- Busch A. und Hertel K. J.** 2012. 'Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors'. *Wiley Interdisciplinary Reviews-RNA*, 3(1): 1-12.
- Cahour A., Pletnev A., Vazeillefalcoz M., Rosen L. und Lai C. J.** 1995. 'Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome'. *Virology*, 207(1): 68-76.
- Castello A., Fischer B., Eichelbaum K., Horos R., Beckmann B. M., Strein C., Davey N. E., Humphreys D. T., Preiss T., Steinmetz L. M., et al.** 2012. 'Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins'. *Cell*, 149(6): 1393-1406.
- Chang T. C., Yamashita A., Chen C. Y., Yamashita Y., Zhu W., Durdan S., Kahvejian A., Sonenberg N. und Shyu A. B.** 2004. 'UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant'. *Genes Development*, 18(16): 2010-2023.
- Chavali P. L., Stojic L., Meredith L. W., Joseph N., Nahorski M. S., Sanford T. J., Sweeney T. R., Krishna B. A., Hosmillo M., Firth A. E., et al.** 2017. 'Neurodevelopmental protein Musashi-1 interacts with the Zika genome and promotes viral replication'. *Science*, 357(6346): 83-88.
- Chen C. J., Kuo M. D., Chien L. J., Hsu S. L., Wang Y. M. und Lin J. H.** 1997. 'RNA-protein interactions: Involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA'. *Journal of Virology*, 71(5): 3466-3473.
- Chen X. G., Jiang X. T., Gu J. B., Xu M., Wu Y., Deng Y. H., Zhang C., Bonizzoni M., Dermauw W., Vontas J., et al.** 2015. 'Genome sequence of the Asian Tiger mosquito, *Aedes albopictus*, reveals insights into its biology, genetics, and evolution'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(44): 5907-5915.
- Cui T., Sugrue R. J., Xu Q., Lee A. K., Chan Y. C. und Fu J.** 1998. 'Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein'. *Virology*, 246(2): 409-417.
- Davis W. G., Basu M., Elrod E. J., Germann M. W. und Brinton M. A.** 2013. 'Identification of cis-acting nucleotides and a structural feature in West Nile virus 3'-terminus RNA that facilitate viral minus strand RNA synthesis'. *Journal of Virology*, 87(13): 7622-7636.
- Davis W. G., Blackwell J. L., Shi P. Y. und Brinton M. A.** 2007. 'Interaction between the cellular protein eEF1A and the 3'-terminal stem-loop of West Nile virus genomic RNA facilitates viral minus-strand RNA synthesis'. *Journal of Virology*, 81(18): 10172-10187.
- Dechtawewat T., Songprakhon P., Limjindaporn T., Puttikhunt C., Kasinrerk W., Saitornuang S., Yenchitsomanus P. T. und Noisakran S.** 2015. 'Role of human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 in dengue virus replication'. *Virology Journal*, 12: 14.

- DeMaria C. T. und Brewer G.** 1996. 'AUF1 binding affinity to A+U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation'. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(21): 12179-12184.
- Dong H. P., Zhang B. und Shi P. Y.** 2008. 'Terminal structures of West Nile virus genomic RNA and their interactions with viral NS5 protein'. *Virology*, 381(1): 123-135.
- Dosztanyi Z., Csizmok V., Tompa P. und Simon I.** 2005. 'The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins'. *Journal of Molecular Biology*, 347(4): 827-839.
- Duggal N. K., Langwig K. E., Ebel G. D. und Brault A. C.** 2019. 'On the fly: interactions between birds, mosquitoes, and environment that have molded West Nile virus genomic structure over two decades'. *Journal of Medical Entomology*, 56(6): 1467-1474.
- Ellis J. J., Broom M. und Jones S.** 2007. 'Protein-RNA interactions: structural analysis and functional classes'. *Proteins*, 66(4): 903-911.
- Elshuber S., Allison S. L., Heinz F. X. und Mandl C. W.** 2003. 'Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus'. *Journal of General Virology*, 84(1): 183-191.
- Emara M. M. und Brinton M. A.** 2007. 'Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21): 9041-9046.
- Enokizono Y., Konishi Y., Nagata K., Ouhashi K., Uesugi S., Ishikawa F. und Katahira M.** 2005. 'Structure of hnRNP D complexed with single-stranded telomere DNA and unfolding of the quadruplex by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D'. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19): 18862-18870.
- Farajollahi A., Fonseca D. M., Kramer L. D. und Kilpatrick A. M.** 2011. "'Bird biting" mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology'. *Infection Genetics and Evolution*, 11(7): 1577-1585.
- Fernandez-Sanles A., Rios-Marco P., Romero-Lopez C. und Berzal-Herranz A.** 2017. 'Functional information stored in the conserved structural RNA domains of flavivirus genomes'. *Frontiers in Microbiology*, 8: 546.
- Filomatori C. V., Iglesias N. G., Villordo S. M., Alvarez D. E. und Gamarnik A. V.** 2011. 'RNA sequences and structures required for the recruitment and activity of the dengue virus polymerase'. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(9): 6929-6939.
- Filomatori C. V., Lodeiro M. F., Alvarez D. E., Samsa M. M., Pietrasanta L. und Gamarnik A. V.** 2006. 'A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome'. *Genes and Development*, 20(16): 2238-2249.
- Friebe P. und Harris E.** 2010. 'Interplay of RNA elements in the dengue virus 5' and 3' ends required for viral RNA replication'. *Journal of Virology*, 84(12): 6103-6118.
- Friebe P., Shi P. Y. und Harris E.** 2011. 'The 5' and 3' downstream AUG region elements are required for mosquito-borne flavivirus RNA replication'. *Journal of Virology*, 85(4): 1900-1905.
- Friedrich S., Engelmann S., Schmidt T., Szczepankiewicz G., Bergs S., Liebert U. G., Kummerer B. M., Golbik R. P. und Behrens S.-E.** 2018. 'The host factor AUF1p45 supports flavivirus propagation by triggering the RNA switch required for viral genome cyclization'. *Journal of Virology*, 92(6).
- Friedrich S., Schmidt T., Geissler R., Lilie H., Chabierski S., Ulbert S., Liebert U. G., Golbik R. P. und Behrens S.-E.** 2014. 'AUF1 p45 promotes West Nile virus replication by an RNA chaperone activity that supports cyclization of the viral genome'. *Journal of Virology*, 88(19): 11586-11599.
- Friedrich S., Schmidt T., Schierhorn A., Lilie H., Szczepankiewicz G., Bergs S., Liebert U. G., Golbik R. P. und Behrens S.-E.** 2016. 'Arginine methylation enhances the RNA chaperone activity of the West Nile virus host factor AUF1 p45'. *RNA*, 22(10): 1574-1591.
- Fu Q., Inankur B., Yin J., Striker R. und Lan Q.** 2015. 'Sterol carrier protein 2, a critical host factor for dengue virus infection, alters the cholesterol distribution in mosquito Aag2 cells'. *Journal of Medical Entomology*, 52(5): 1124-1134.

- Gomes B., Sousa C. A., Vicente J. L., Pinho L., Calderon I., Arez E., Almeida A. P., Donnelly M. J. und Pinto J. 2013. 'Feeding patterns of molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in a region of high hybridization'. *Parasites and Vectors*, 6: 93.
- Gratacos F. M. und Brewer G. 2010. 'The role of AUF1 in regulated mRNA decay'. *Wiley Interdisciplinary Reviews-RNA*, 1(3): 457-473.
- Greenfield N. J. 2006. 'Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions'. *Nature Protocols*, 1(6): 2527-2535.
- Guerossov S., Weatheritt R. J., O'Hanlon D., Lin Z. Y., Narula A., Gingras A. C. und Blencowe B. J. 2017. 'Regulatory expansion in mammals of multivalent hnRNP assemblies that globally control alternative splicing'. *Cell*, 170(2): 324.
- Hahn C. S., Hahn Y. S., Rice C. M., Lee E., Dalgarno L., Strauss E. G. und Strauss J. H. 1987. 'Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences'. *Journal of Molecular Biology*, 198(1): 33-41.
- Hamer G. L., Kitron U. D., Goldberg T. L., Brawn J. D., Loss S. R., Ruiz M. O., Hayes D. B. und Walker E. D. 2009. 'Host selection by *Culex pipiens* mosquitoes and West Nile virus amplification'. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 80(2): 268-278.
- Hentze M. W., Castello A., Schwarzl T. und Preiss T. 2018. 'A brave new world of RNA-binding proteins'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(5): 327-341.
- Igarashi A. 1978. 'Isolation of a singhs *Aedes Albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses'. *Journal of General Virology*, 40: 531-544.
- Jarvelin A. I., Noerenberg M., Davis I. und Castello A. 2016. 'The new (dis)order in RNA regulation'. *Cell Communication and Signaling*, 14: 9.
- Jones S., Daley D. T., Luscombe N. M., Berman H. M. und Thornton J. M. 2001. 'Protein-RNA interactions: a structural analysis'. *Nucleic Acids Research*, 29(4): 943-954.
- Jupatanakul N., Sim S., Anglero-Rodriguez Y. I., Souza-Neto J., Das S., Poti K. E., Rossi S. L., Bergren N., Vasilakis N. und Dimopoulos G. 2017. 'Engineered *Aedes aegypti* JAK/STAT pathway-mediated immunity to dengue virus'. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(1): e0005187.
- Kajita Y., Nakayama J., Aizawa M. und Ishikawa F. 1995. 'The UUAG-specific RNA binding protein, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 - common modular structure and binding properties of the 2xRBD-gly family'. *Journal of Biological Chemistry*, 270(38): 22167-22175.
- Kang S., Shields A. R., Jupatanakul N. und Dimopoulos G. 2014. 'Suppressing dengue-2 infection by chemical inhibition of *Aedes aegypti* host factors'. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(8): e3084.
- Katahira M., Miyanoiri Y., Enokizono Y., Matsuda G., Nagata T., Ishikawa F. und Uesugi S. 2001. 'Structure of the C-terminal RNA-binding domain of hnRNP D0 (AUF1), its interactions with RNA and DNA, and change in backbone dynamics upon complex formation with DNA'. *Journal of Molecular Biology*, 311(5): 973-988.
- Kelley R. L. 1993. 'Initial organization of the *Drosophila* dorsoventral axis depends on an RNA-binding protein encoded by the squid gene'. *Genes & Development*, 7(6): 948-960.
- Khromykh A. A., Meka H., Guyatt K. J. und Westaway E. G. 2001. 'Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication'. *Journal of Virology*, 75(14): 6719-6728.
- Khromykh A. A. und Westaway E. G. 1997. 'Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications'. *Journal of Virology*, 71(2): 1497-1505.
- Kiledjian M. und Dreyfuss G. 1992. 'Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box'. *EMBO Journal*, 11(7): 2655-2664.
- Kilpatrick A. M. 2011. 'Globalization, land use and the invasion of West Nile virus'. *Science*, 334(6054): 323-327.
- Komar N., Langevin S., Hinten S., Nemeth N., Edwards E., Hettler D., Davis B., Bowen R. und Bunning M. 2003. 'Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus'. *Emerging Infectious Diseases*, 9(3): 311-322.

- Kortmann J. und Narberhaus F.** 2012. 'Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches'. *Nature Review Microbiology*, 10(4): 255-265.
- Kraemer M. U. G., Reiner R. C., Brady O. J., Messina J. P., Gilbert M., Pigott D. M., Yi D. D., Johnson K., Earl L., Marczak L. B., et al.** 2019. 'Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*'. *Nature Microbiology*, 4(5): 854–863.
- Kramer L. D., Li J. und Shi P. Y.** 2007. 'West Nile virus'. *Lancet Neurology*, 6(2): 171-181.
- Kramer L. D., Styer L. M. und Ebel G. D.** 2008. 'A global perspective on the epidemiology of West Nile virus'. *Annual Review of Entomology*, 53: 61-81.
- Kumari N. und Yadav S.** 2019. 'Modulation of protein oligomerization: an overview'. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 149: 99-113.
- Lambrechts L. und Scott T. W.** 2009. 'Mode of transmission and the evolution of arbovirus virulence in mosquito vectors'. *Proceedings of the royal society Biological Science*, 276(1660): 1369-1378.
- Lanciotti R. S., Ebel G. D., Deubel V., Kerst A. J., Murri S., Meyer R., Bowen M., McKinney N., Morrill W. E., Crabtree M. B., et al.** 2002. 'Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East'. *Virology*, 298(1): 96-105.
- Lee S. Y., Jang C. und Lee K. A.** 2014. 'Polo-like kinases (plks), a key regulator of cell cycle and new potential target for cancer therapy'. *Development and Reproduction*, 18(1): 65-71.
- Leggewie M., Badusche M., Rudolf M., Jansen S., Borstler J., Krumkamp R., Huber K., Kruger A., Schmidt-Chanasit J., Tannich E., et al.** 2016. '*Culex pipiens* and *Culex torrentium* populations from Central Europe are susceptible to West Nile virus infection'. *One Health*, 2: 88-94.
- Li D. S., Wei T., Abbott C. M. und Harrich D.** 2013. 'The unexpected roles of eukaryotic translation elongation factors in RNA virus replication and pathogenesis'. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2): 253-266.
- Li W., Li Y., Kedersha N., Anderson P., Emara M., Swiderek K. M., Moreno G. T. und Brinton M. A.** 2002. 'Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication'. *Journal of Virology*, 76(23): 11989-12000.
- Lindenbach B. D., Thiel H. J. und Rice C. M.** 2007. '*Flaviviridae*: the viruses and their replication'. in *Fields Virology* (ed. D. M. Knipe und P. M. Howley), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Lo M. K., Tilgner M., Bernard K. A. und Shi P. Y.** 2003. 'Functional analysis of mosquito-borne flavivirus conserved sequence elements within 3' untranslated region of West Nile virus by use of a reporting replicon that differentiates between viral translation and RNA replication'. *Journal of Virology*, 77(18): 10004-10014.
- Lounibos L. P.** 2002. 'Invasions by insect vectors of human disease'. *Annual Review of Entomology*, 47: 233-266.
- Lunde B. M., Moore C. und Varani G.** 2007. 'RNA-binding proteins: modular design for efficient function'. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 8(6): 479-490.
- Mackenzie J.** 2005. 'Wrapping things up about virus RNA replication'. *Traffic*, 6(11): 967-977.
- Mackenzie J. M., Jones M. K. und Westaway E. G.** 1999. 'Markers for trans-golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells'. *Journal of Virology*, 73(11): 9555-9567.
- Maenaka K., Matsushima M., Song H., Sunada F., Watanabe K. und Kumagai I.** 1995. 'Dissection of protein-carbohydrate interactions in mutant hen egg-white lysozyme complexes and their hydrolytic activity'. *Journal of Molecular Biology*, 247(2): 281-293.
- Mahatabuddin S., Hanada Y., Nishimiya Y., Miura A., Kondo H., Davies P. L. und Tsuda S.** 2017. 'Concentration-dependent oligomerization of an alpha-helical antifreeze polypeptide makes it hyperactive'. *Scientific Reports*, 7: 42501.
- Mannen T., Yamashita S., Tomita K., Goshima N. und Hirose T.** 2016. 'The Sam68 nuclear body is composed of two RNase-sensitive substructures joined by the adaptor HNRNPL'. *Journal of Cell Biology*, 214(1): 45-59.

- Mayer O., Rajkowitsch L., Lorenz C., Konrat R. und Schroeder R.** 2007. 'RNA chaperone activity and RNA-binding properties of the *E. coli* protein StpA'. *Nucleic Acids Research*, 35(4): 1257-1269.
- Mazeaud C., Freppel W. und Chatel-Chaix L.** 2018. 'The multiples fates of the flavivirus RNA genome during pathogenesis'. *Frontiers in Genetics*, 9: 595.
- McBride A. E. und Silver P. A.** 2001. 'State of the arg: protein methylation at arginine comes of age'. *Cell*, 106(1): 5-8.
- Men R. H., Bray M., Clark D., Chanock R. M. und Lai C. J.** 1996. 'Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: Analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys'. *Journal of Virology*, 70(6): 3930-3937.
- Meyer A.** 2016. 'Masterarbeit: Untersuchungen zur Funktion des Wirtsfaktors AUF1 und AUF1-homologer Mosquito-Proteine in der RNA-Replikation von Flaviviren'.
- Meyer A., Freier M., Schmidt T., Rostowski K., Zwoch J., Lilie H., Behrens S.-E. und Friedrich S.** 2020. 'An RNA thermometer activity of the West Nile virus genomic 3'-terminal stem-loop element modulates viral replication efficiency during host switching'. *Viruses*, 12: 104.
- Meyer A., Golbik R. P., Sanger L., Schmidt T., Behrens S.-E. und Friedrich S.** 2019. 'The RGG/RG motif of AUF1 isoform p45 is a key modulator of the protein's RNA chaperone and RNA annealing activities'. *RNA Biology*, 16(7): 960-971.
- Modi A. A. und Liang T. J.** 2008. 'Hepatitis C: a clinical review'. *Oral Diseases*, 14(1): 10-14.
- Moon S. L., Dodd B. J. T., Brackney D. E., Wilusz C. J., Ebel G. D. und Wilusz J.** 2015. 'Flavivirus sfRNA suppresses antiviral RNA interference in cultured cells and mosquitoes and directly interacts with the RNAi machinery'. *Virology*, 485: 322-329.
- Morazzani E. M., Wiley M. R., Murreddu M. G., Adelman Z. N. und Myles K. M.** 2012. 'Production of virus-derived ping-pong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito soma'. *PLoS Pathogens*, 8(1): e1002470.
- Mukhopadhyay S., Kim B. S., Chipman P. R., Rossmann M. G. und Kuhn R. J.** 2003. 'Structure of West Nile virus'. *Science*, 302(5643): 248.
- Mukhopadhyay S., Kuhn R. J. und Rossmann M. G.** 2005. 'A structural perspective of the flavivirus life cycle'. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1): 13-22.
- Munoz J., Eritja R., Alcaide M., Montalvo T., Soriguer R. C. und Figuerola J.** 2011. 'Host-feeding patterns of native *Culex pipiens* and invasive *Aedes albopictus* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in urban zones from Barcelona, Spain'. *Journal of Medical Entomology*, 48(4): 956-960.
- Nash D., Mostashari F., Fine A., Miller J., O'Leary D., Murray K., Huang A., Rosenberg A., Greenberg A., Sherman M., et al.** 2001. 'The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999.'. *New England Journal of Medicine*, 344(24): 1807-1814.
- Neuman-Silberberg F. S. und Schupbach T.** 1993. 'The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein'. *Cell*, 75(1): 165-174.
- Nilson L. A. und Schupbach T.** 1999. 'EGF receptor signaling in *Drosophila* oogenesis'. *Current Topics in Developmental Biology*, 44: 203-243.
- Norvell A., Kelley R. L., Wehr K. und Schupbach T.** 1999. 'Specific isoforms of squid, a *Drosophila* hnRNP, perform distinct roles in Gurken localization during oogenesis'. *Genes and Development*, 13(7): 864-876.
- Paupy C., Delatte H., Bagny L., Corbel V. und Fontenille D.** 2009. '*Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light'. *Microbes and Infection*, 11(14-15): 1177-1185.
- Phillips S. L., Soderblom E. J., Bradrick S. S. und Garcia-Blanco M. A.** 2016. 'Identification of proteins bound to dengue viral RNA *in vivo* reveals new host proteins important for virus replication'. *American Society for Microbiology*, 7(1): e01865-01815.
- Pijlman G. P., Funk A., Kondratieva N., Leung J., Torres S., van der Aa L., Liu W. J., Palmenberg A. C., Shi P. Y., Hall R. A., et al.** 2008. 'A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity'. *Cell Host & Microbe*, 4(6): 579-591.

- Polacek C., Friebe P. und Harris E.** 2009. 'Poly(A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency'. *Journal of General Virology*, 90(3): 687-692.
- Ponlawat A. und Harrington L. C.** 2005. 'Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand'. *Journal of Medical Entomology*, 42(5): 844-849.
- Pont A. R., Sadri N., Hsiao S. J., Smith S. und Schneider R. J.** 2012. 'mRNA decay factor AUF1 maintains normal aging, telomere maintenance and suppression of senescence by activation of telomerase transcription'. *Molecular Cell*, 47(1): 5-15.
- Qing M., Yang F., Zhang B., Zou G., Robida J. M., Yuan Z. M., Tang H. L. und Shi P. Y.** 2009. 'Cyclosporine inhibits flavivirus replication through blocking the interaction between host cyclophilins and viral NS5 protein'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8): 3226-3235.
- Rajkowitz L., Chen D., Starnpf S., Sernrad K., Waldsich C., Mayer O., Jantsch M. F., Konrat R., Blasi U. und Schroeder R.** 2007. 'RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases'. *RNA Biology*, 4(3): 118-130.
- Rajyaguru P. und Parker R.** 2012. 'RGG motif proteins: modulators of mRNA functional states'. *Cell Cycle*, 11(14): 2594-2599.
- Rice C. M., Lenches E. M., Eddy S. R., Shin S. J., Sheets R. L. und Strauss J. H.** 1985. 'Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution'. *Science*, 229(4715): 726-733.
- Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T.** 1989. 'Molecular cloning: a laboratory manual'.
- Samuel G. H., Adelman Z. N. und Myles K. M.** 2018. 'Antiviral immunity and virus-mediated antagonism in disease vector mosquitoes'. *Trends in Microbiology*, 26(5): 447-461.
- Sanford T. J., Mears H. V., Fajardo T., Locker N. und Sweeney T. R.** 2019. 'Circularization of flavivirus genomic RNA inhibits *de novo* translation initiation'. *Nucleic Acids Research*, 47(18): 9789-9802.
- Sänger L.** 2019. 'Masterarbeit: Die RNA-Chaperon-Aktivität von AUF1 wird durch das YGG-Motiv vermittelt und moduliert eine miRNA-mRNA-Interaktion'.
- Sänger L., Bender J., Rostowski K., Golbik R., Lilie H., Schmidt C., Behrens S.-E. und Friedrich S.** 2020. 'Alternatively spliced isoforms of AUF1 differentially regulate miRNA-mRNA interaction through its YGG motif'. *eingereicht*.
- Savidis G., McDougall W. M., Meraner P., Perreira J. M., Portmann J. M., Trincucci G., John S. P., Aker A. M., Renzette N., Robbins D. R., et al.** 2016. 'Identification of Zika virus and dengue virus dependency factors using functional genomics'. *Cell Reports*, 16(1): 232-246.
- Schmidt T., Knick P., Lilie H., Friedrich S., Golbik R. P. und Behrens S.-E.** 2016. 'Coordinated action of two double-stranded RNA binding motifs and an RGG motif enables nuclear factor 90 to flexibly target different RNA substrates'. *Biochemistry*, 55(6): 948-959.
- Schnettler E., Sterken M. G., Leung J. Y., Metz S. W., Geertsema C., Goldbach R. W., Vlak J. M., Kohl A., Khromykh A. A. und Pijlman G. P.** 2012. 'Noncoding flavivirus RNA displays RNA interference suppressor activity in insect and mammalian cells'. *Journal of Virology*, 86(24): 13486-13500.
- Sessions O. M., Barrows N. J., Souza-Neto J. A., Robinson T. J., Hershey C. L., Rodgers M. A., Ramirez J. L., Dimopoulos G., Yang P. L., Pearson J. L., et al.** 2009. 'Discovery of insect and human dengue virus host factors'. *Nature*, 458(7241): 1047-1050.
- Shi P. Y., Tilgner M. und Lo M. K.** 2002. 'Construction and characterization of subgenomic replicons of New York strain of West Nile virus'. *Virology*, 296(2): 219-233.
- Simmonds P., Becher P., Bukh J., Gould E. A., Meyers G., Monath T., Muerhoff S., Pletnev A., Rico-Hesse R., Smith D. B., et al.** 2017. 'ICTV virus taxonomy profile: *Flaviviridae*'. *Journal of General Virology*, 98(1): 2-3.
- Simoes M. L., Caragata E. P. und Dimopoulos G.** 2018. 'Diverse host and restriction factors regulate mosquito-pathogen interactions'. *Trends in Parasitology*, 34(7): 603-616.
- Singh K. R. P.** 1967. 'Cell cultures derived from larvae of *Aedes Albopictus* (Skuse) and *Aedes Aegypti* (L.)'. *Current Science*, 36(19): 506-508.



- Stadler K., Allison S. L., Schalich J. und Heinz F. X.** 1997. 'Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin'. *Journal of Virology*, 71(11): 8475-8481.
- Stapleton J. T., Fong S., Muerhoff A. S., Bukh J. und Simmonds P.** 2011. 'The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus *Pegivirus* within the family *Flaviviridae*'. *Journal of General Virology*, 92: 233-246.
- Tautz N., Tews B. A. und Meyers G.** 2015. 'The Molecular Biology of Pestiviruses'. *Advances in Virus Research*, 93: 47-160.
- Thandapani P., O'Connor T. R., Bailey T. L. und Richard S.** 2013. 'Defining the RGG/RG motif'. *Molecular Cell*, 50(5): 613-623.
- Tilgner M., Deas T. S. und Shi P. Y.** 2005. 'The flavivirus-conserved penta-nucleotide in the 3' stem-loop of the West Nile virus genome requires a specific sequence and structure for RNA synthesis, but not for viral translation'. *Virology*, 331(2): 375-386.
- Tilgner M. und Shi P. Y.** 2004. 'Structure and function of the 3' terminal six nucleotides of the West Nile virus genome in viral replication'. *Journal of Virology*, 78(15): 8159-8171.
- Tompa P. und Csermely P.** 2004. 'The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones'. *The FASEB Journal*, 18(11): 1169-1175.
- Varjak M., Maringer K., Watson M., Sreenu V. B., Fredericks A. C., Pondeville E., Donald C. L., Sterk J., Kean J., Vazeille M., et al.** 2017. '*Aedes aegypti* Piwi4 is a noncanonical PIWI protein involved in antiviral responses'. *Mosphere*, 2(3): e00144-00117.
- Vashist S., Anantpadma M., Sharma H. und Vrati S.** 2009. 'La protein binds the predicted loop structures in the 3' non-coding region of Japanese encephalitis virus genome: role in virus replication'. *Journal of General Virology*, 90: 1343-1352.
- Vashist S., Bhullar D. und Vrati S.** 2011. 'La protein can simultaneously bind to both 3'- and 5'-noncoding regions of Japanese encephalitis virus genome'. *DNA and Cell Biology*, 30(6): 339-346.
- Villordo S. M., Alvarez D. E. und Gamarnik A. V.** 2010. 'A balance between circular and linear forms of the dengue virus genome is crucial for viral replication'. *RNA*, 16(12): 2325-2335.
- Vogels C. B., Goertz G. P., Pijlman G. P. und Koenraadt C. J.** 2017. 'Vector competence of european mosquitoes for West Nile virus'. *Emerging Microbes and Infections*, 6(11): e96.
- Wagner B. J., DeMaria C. T., Sun Y., Wilson G. M. und Brewer G.** 1998. 'Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms'. *Genomics*, 48(2): 195-202.
- Ward A. M., Calvert M. E. K., Read L. R., Kang S., Levitt B. E., Dimopoulos G., Bradrick S. S., Gunaratne J. und Garcia-Blanco M. A.** 2016. 'The golgi associated ERI3 is a *Flavivirus* host factor'. *Scientific Reports*, 6: 34379
- Wengler G. und Wengler G.** 1981. 'Terminal sequences of the genome and replicative-form RNA of the flavivirus West Nile virus: absence of poly(A) and possible role in RNA replication'. *Virology*, 113(2): 544-555.
- White E. J. F., Brewer G. und Wilson G. M.** 2013. 'Post-transcriptional control of gene expression by AUF1: mechanisms, physiological targets, and regulation'. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6-7): 680-688.
- White E. J., Matsangos A. E. und Wilson G. M.** 2017. 'AUF1 regulation of coding and noncoding RNA'. *Wiley Interdisciplinary Reviews-RNA*, 8(2).
- Wilson G. M., Lu J., Sutphen K., Suarez Y., Sinha S., Brewer B., Villanueva-Feliciano E. C., Ysla R. M., Charles S. und Brewer G.** 2003a. 'Phosphorylation of p40AUF1 regulates binding to A + U-rich mRNA-destabilizing elements and protein-induced changes in ribonucleoprotein structure'. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(35): 33039-33048.
- Wilson G. M., Lu J., Sutphen K., Sun Y., Huynh Y. und Brewer G.** 2003b. 'Regulation of A + U-rich element-directed mRNA turnover involving reversible phosphorylation of AUF1'. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35): 33029-33038.
- Woodson S. A.** 2010. 'Taming free energy landscapes with RNA chaperones'. *RNA Biology*, 7(6): 677-686.

- Wu P., Yu X., Wang P. H. und Cheng G.** 2019. 'Arbovirus lifecycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission'. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 21(e1): 1-6.
- Wu X., Chesoni S., Rondeau G., Tempesta C., Patel R., Charles S., Daginawala N., Zucconi B. E., Kishor A., Xu G., et al.** 2013. 'Combinatorial mRNA binding by AUF1 and Argonaute 2 controls decay of selected target mRNAs'. *Nucleic Acids Research*, 41(4): 2644-2658.
- Yoon J. H., De S., Srikantan S., Abdelmohsen K., Grammatikakis I., Kim J., Kim K. M., Noh J. H., White E. J. F., Martindale J. L., et al.** 2014. 'PAR-CLIP analysis uncovers AUF1 impact on target RNA fate and genome integrity'. *Nature Communications*, 5: 5248.
- Yoon J. H., Jo M. H., White E. J., De S., Hafner M., Zucconi B. E., Abdelmohsen K., Martindale J. L., Yang X., Wood W. H., et al.** 2015. 'AUF1 promotes let-7b loading on Argonaute 2'. *Genes and Development*, 29(15): 1599-1604.
- Yu L. und Markoff L.** 2005. 'The topology of bulges in the long stem of the flavivirus 3' stem-loop is a major determinant of RNA replication competence'. *Journal of Virology*, 79(4): 2309-2324.
- Zeng L. L., Falgout B. und Markoff L.** 1998. 'Identification of specific nucleotide sequences within the conserved 3'-SL in the dengue type 2 virus genome required for replication'. *Journal of Virology*, 72(9): 7510-7522.
- Zhang B., Dong H., Stein D. A., Iversen P. L. und Shi P. Y.** 2008. 'West Nile virus genome cyclization and RNA replication require two pairs of long-distance RNA interactions'. *Virology*, 373(1): 1-13.
- Zhang G. M., Hussain M. und Asgari S.** 2014. 'Regulation of arginine methyltransferase 3 by a Wolbachia-induced microRNA in *Aedes aegypti* and its effect on Wolbachia and dengue virus replication'. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 53: 81-88.
- Zhang X. und Cheng X. D.** 2003. 'Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides'. *Structure*, 11(5): 509-520.
- Zucconi B. E., Ballin J. D., Brewer B. Y., Ross C. R., Huang J., Toth E. A. und Wilson G. M.** 2010. 'Alternatively expressed domains of AU-rich element RNA-binding protein 1 (AUF1) regulate RNA-binding affinity, RNA-induced protein oligomerization, and the local conformation of bound RNA ligands'. *Journal of Biological Chemistry*, 285(50): 39127-39139.

#### Internetquelle:

#### Abbildung 2: Globale Verbreitung ausgewählter Flaviviren

**Weltkarte:** [http://www.lebenimaargau.ch/pages/wp-](http://www.lebenimaargau.ch/pages/wp-content/ict/kapitel_4/die_weite_welt_bei_mir_zuhause/deine_vorlieben.html)

[content/ict/kapitel\\_4/die\\_weite\\_welt\\_bei\\_mir\\_zuhause/deine\\_vorlieben.html](http://www.lebenimaargau.ch/pages/wp-content/ict/kapitel_4/die_weite_welt_bei_mir_zuhause/deine_vorlieben.html), 18.04.20, 16 Uhr

## VII. Anhang

Proteinsequenzen:

Squid-p32:

MADQDQEMNGNGQESQDQNGGDQNGAEGSNVRDDDRKLFVGGLSWETS  
DKELKEHFGQYGEIESINVKTD PNTGRSRGF AFIVYKSADSIDKVVAAGD HVINNKKVDP  
KKAKARHGKIFVGGLTTEISDEEIKTFFGQFGNIVEVEMPFDKQKNQRKGF CFITFDSEQ  
VVNELLKTPKQTISGKEVDVKKATPKPDNMHMGGPMGGRGGMRGPPRGGMRGGRGGPPGGP  
KGYGQGWGNQGGYGGGGYGNQGGYGYGDY YGDWAGWGYNGYDYSHYGAGGGGYQGGK  
QRGGGGGNRQPRHTPY

Squid-p30:

MADQDQEMNGNGQESQDQNGGDQNGAEGSNVRDDDRKLFVGGLSWETS  
DKELKEHFGQYGEIESINVKTD PNTGRSRGF AFIVYKSADSIDKVVAAGD HVINNKKVDP  
KKAKARHGKIFVGGLTTEISDEEIKTFFGQFGNIVEVEMPFDKQKNQRKGF CFITFDSEQ  
VVNELLKTPKQTISGKEVDVKKATPKPDNMHMGGPMGGRGGMRGPPRGGMRGGRGGPPGGP  
KGYGQGWGNQGGYGGGGYGNQGGYGYGAGGGGYQGGKQRGGGGGNRQPRHTPY

RRM-Domänen, RGG/RG-Motiv, YGG-Motiv, Verlängerung des YGG-Motivs (nur in Squid-p32)

**Publikationsliste****Veröffentlichungen in Fachzeitschriften:**

**Meyer A., Golbik R. P., Sänger L., Schmidt T., Behrens S.-E. und Friedrich S.** 2019. 'The RGG/RG motif of AUF1 isoform p45 is a key modulator of the protein's RNA chaperone and RNA annealing activities'. *RNA Biology*, 16(7): 960-971.

**Meyer A., Freier M., Schmidt T., Rostowski K., Zwoch J., Lilie H., Behrens S.-E. und Friedrich S.** 2020. 'An RNA thermometer activity of the West Nile Virus genomic 3'-terminal stem-loop element modulates viral replication efficiency during host switching'. *Viruses*, 12(1).

**Tagungsbeiträge-Poster:**

**Meyer A., S.-E. Behrens, S. Friedrich.** Characterisation of mosquito proteins homologous to the human Flavivirus host factor AUF1. 28th Annual Meeting of the Society for Virology, 14.-17.03.2018, Würzburg.

**Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Sven-Erik Behrens für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe das Thema zu bearbeiten und diese Arbeit anzufertigen, bedanken. Durch sein stetiges Interesse an der Arbeit, dem entgegengebrachten Vertrauen, sowie dem Einbringen von immer neuen, konstruktiven Ideen und Vorschlägen, war er maßgeblich am Entstehen dieser Doktorarbeit beteiligt.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier für die Förderung im Rahmen des Graduiertenkollegs 1591 „*posttranscriptional control of gene expression: mechanisms and role in pathogenesis*“. Ein großes Dankeschön an Frau Dr. Anne Baude für die engagierte und freundliche Koordination des GRK. Des Weiteren danke ich der DFG für die Förderung über das Projekt BE1885/12-1.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. Gary Sawers und Herrn Prof. Dr. Norbert Tautz für die freundliche Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Susann Friedrich für den wirklich großen Einsatz und tollen Zusammenarbeit während der gesamten Doktorandenzeit bedanken. Vielen Dank für das nie nachlassende Interesse an der Arbeit, die vielen konstruktiven Diskussionen und Anregungen und nicht zuletzt dem Korrekturlesen meiner Arbeit. Deine unermüdliche Unterstützung war ein entscheidender Bestandteil bei der Entstehung dieser Doktorarbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dipl.-Biologin Katja Rostowski für die große Hilfe im Labor und dem steten Einsatz in der Zellkultur bedanken. Vielen Dank für die andauernde Bereitschaft in meiner Abwesenheit meine Zellen zu versorgen.

Ich danke ganz herzlich M. Sc. Cornelia Gruber für die Unterstützung im Bereich CRISPR/Cas9 und für die generelle Hilfsbereitschaft und anregenden Diskussionen.

Herrn PD Dr. habil. Ralph Peter Golbik danke ich für die Hilfe bei der CD-Spektroskopie, die Hilfsbereitschaft bei sämtlichen Anliegen im Labor und für seine Expertise, die einem auch als Biologe zuteilwurde.

Des Weiteren möchte ich Herrn PD Dr. habil. Hauke Lilie vom Institut für Biochemie und Biotechnologie der Universität Halle-Wittenberg für die Durchführung und Auswertung der analytischen Ultrazentrifugation danken.

Ebenso danke ich Frau Dr. Nadine Bley vom Institut für molekulare Medizin der Universität Halle-Wittenberg für die Vereinzelung der Mosquitozellen am FACS.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Uwe Liebert vom Institut für Virologie der Universität Leipzig für die Ermöglichung der West-Nil-Virus-Infektionsexperimente und Frau Grit Szczepankiewicz für die Durchführung dieser.

Herrn Prof. Dr. Ronald van Rij vom Radboud *Institute for Molecular Life Sciences* der Radboud Universität in Nijmegen (Niederlande) danke ich für die Bereitstellung der U4.4 und Aag2 Mosquitozellen.

Ein großes Dankeschön geht an alle derzeitigen und ehemaligen Mitglieder der Abteilung mikrobielle Biotechnologie. Vielen Dank für dieses angenehme und unterstützende Arbeitsklima und die Offenheit neuen Mitarbeitern gegenüber.

Ein großer Dank geht an meinen Leidensgenossen M. Sc. Matthias Reimers. Vielen Dank, dass du dir so häufig die Erlebnisse meines Laboralltags angehört hast und dich über jedes Ergebnis fast genauso gefreut hast, wie ich. Danke für die stetige Bereitschaft zur Diskussion und für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und bei meinen Freunden bedanken, die mit viel Geduld und Verständnis meine Doktorandenzeit miterlebt haben. Vielen Dank für eure Unterstützung und eure Motivation. Besonders danke ich meinem Papa, der in mir das Interesse an Naturwissenschaften weckte, auch wenn es am Ende kein Chemiestudium geworden ist. Ich danke insbesondere Philipp für die Geduld, mit der er etlichen „*Biotalk*“ über sich ergehen ließ, für die grammatikalische Aufbesserung dieser Arbeit und die tröstenden Worte, wenn mal etwas nicht so gut lief.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name	Alexandra Meyer
Geburtsort	Chemnitz
Geburtsdatum	15.10.1990
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Ausbildung:

seit 10/2016	Promotion im GRK 1591 „ <i>posttranscriptional control of gene expression: mechanisms and role in pathogenesis</i> “, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Mikrobielle Biotechnologie, Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens
04/2014 - 08/2016	Master of Science Biologie, Masterarbeit: „ <i>Untersuchungen zur Funktion des Wirtsfaktors AUF1 und AUF1-homologer Moskito-Proteine in der RNA-Replikation von Flaviviren</i> “, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Mikrobielle Biotechnologie, Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens
10/2010 - 03/2014	Bachelor of Science Biologie, Bachelorarbeit: „ <i>Changes in infestation level and apoptosis gene expression on N. ceranae infected bees induced by honey</i> “, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Abteilung Molekulare Ökologie, Betreuer: Prof. Dr. Robin Moritz
09/97 - 06/2010	Abitur am Julius-Adolph-Stöckhardt-Gymnasium, Chemnitz

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der im Quellen- und Literaturverzeichnis aufgeführten Werke angefertigt habe. Textstellen, die aus diesen Werken inhaltlich oder wörtlich übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt wurde und ich mich erstmals für die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Halle (Saale), den

Alexandra Meyer