

tRNA-Mimikry in Mengoviren:

**virale RNA-Elemente, welche die
Glycyl-tRNA-Synthetase binden**

tRNA mimicry in Mengoviruses:

viral RNA elements that bind Glycyl tRNA Synthetase

Dissertation

Vorgelegt von

Fabian Droß

(M.Sc Biologie)

zum Erlangen des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Eingereicht am Fachbereich 08 Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gießen, 24.09.2025

Die vorliegende Arbeit wurde am Biochemischen Institut des Fachbereichs 11 der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von Januar 2022 bis Dezember 2024 unter der Leitung von Apl. Prof. Dr. Michael Niepmann angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie (FB 08)
Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: PD Dr. habil. Oliver Rossbach
Institut für Biochemie (FB 08)
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Apl. Prof. Dr. Michael Niepmann
Biochemisches Institut (FB 11)
Justus-Liebig-Universität Gießen

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
1. Summary	2
2. Einleitung	3
2.1 Picornaviren	3
2.2 Genom.....	5
2.3 UTRs und ITAFs	8
2.4 Lebenszyklus von Picornaviren.....	13
2.5 Glycyl-tRNA Synthetase (GARS).....	16
2.6 Mengovirus.....	18
2.6 Aktueller Stand und Zielsetzung.....	18
3. Ergebnisse	20
3.1 Die Biotin-RNA Pull-Downs	20
3.2 Optimierung der Bedingungen für die Bindung der Biotin-RNA im Pull-Down... 22	22
3.2.1 Kontrolle der RNA im Pull-Down.Verfahren	22
3.2.2 Die Zugabe von Detergenz im Waschpuffer verringert unspezifische Bindungen	25
3.2.3 Biotin markiertes UTP bindet nicht an die Beads	27
3.2.4 Eine Markierung mit Biotin am 3'-Ende der RNA zeigt Erfolg	29
3.3 Optimierung des Western Blot Verfahrens.....	31
3.3.1 Erster Western Blot mit verbessertem Pull-Down	32
3.3.2 Mehr RNA und mehr Zellen zeigen erste Erfolge	34
3.3.3 Änderung des Protein-Release.....	35
3.3.4 Blocken der Beads für weniger unspezifische Bindungen.....	38
3.3.4 Verwendung von Beads mit hoher Bindeaffinität und -spezifität.....	40
3.4 GARS bindet an die 3'-UTR des Mengovirus.....	42
3.4.1 GARS-Bindung an das 3'-GBE	44

3.4.2 Untersuchung des eIF4G Strukturhomologs DAP5	47
3.5 GARS bindet beide Mengovirus UTRs, aber unterschiedlich stark.....	49
3.6 GARS bindet ebenfalls in Verwandten des Mengovirus - TMEV	52
3.7 Die Mutation der GARS-Bindungsstelle beeinflusst die Bindung weiterer Proteine an die UTR	55
3.8 Auswertung des iCLiP2 Versuchs.....	63
3.8.1 Überblick der alignierten Daten	67
3.8.2 Zoom der 5'-GBE.....	69
3.8.3 Zoom der 3'-GBE.....	70
4. Diskussion	72
4.1 Nachweis und Analyse der GARS-Bindung an die GBEs	72
4.2 Warum GARS?.....	81
4.3 Fehleranalyse des iCLiP2 Versuchs.....	82
4.4 Ausblick und offene Fragen.....	84
5. Material.....	85
5.1 Geräte	85
5.2 Chemikalien	86
5.3 Enzyme	88
5.4 Kits	89
5.5 Beads.....	89
5.6 Antikörper.....	90
5.7 Plasmide.....	90
5.8 Zelllinien und Bakterienstämme	91
5.9 Kulturmedien.....	92
5.10 Kulturmedien Zusätze.....	92
5.11 Radionuklide	92
5.12 Oligonukleotide.....	93
6. Methoden.....	95

6.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	95
6.2 Erstellung viraler RNA	95
6.3 RNA 3'-Biotinylierung und Streptavidin-Shift.....	97
6.4 Zellkultur.....	98
6.5 Elektroporation und Pull-Down.....	99
6.6 Western Blot (WB)	101
6.7 Massenspektrometrie	107
6.8 Test IP (pre-test-CLIP)	108
6.9 Test CLIP	113
6.10 iCLIP2.....	116
6.11 Sequenzierung.....	124
6.12 Verarbeitung der iCLIP2 Daten	124
7. Quellen.....	126
8. Anhang.....	141
8.1 Abbildungen	141
8.2 Referenzgenome.....	145
9. Tabellenverzeichnis	149
10. Abbildungsverzeichnis	151
11. Abkürzungen und Einheiten.....	153
12. Danksagung.....	158
13. Eidesstattliche Erklärung.....	159

1. Zusammenfassung

Picornaviren sind kleine RNA-Viren, welche aus einer positiven einzelsträngigen RNA bestehen. Diese (+)ssRNA codiert das gesamte virale Polyprotein. Der codierende Bereich des Polyproteins ist am 5'- und 3'-Ende von untranslatierten Regionen (UTRs) mit komplexer Sekundärstruktur flankiert. Die virale RNA ist am 5'-Ende anstatt mit einem Cap-Nukleotid mit einem viralen Protein (VPg) versehen, das 3'-Ende endet mit einem Poly(A)-Schwanz. Aufgrund der fehlenden 5'-Cap-Struktur wird die virale Translation über eine "internal ribosome entry site" (IRES) in der 5'-UTR initiiert. Der Zusammenbau des Ribosoms an der viralen RNA findet mithilfe von Teilen des humanen 48S-Initiationskomplexes, eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIFs) und weiteren Proteinen, die an die virale IRES binden, statt. Diese IRES bindenden Proteine werden als IRES trans acting factors (ITAFs) bezeichnet. Zu den ITAFs gehören Proteine wie PTB, hnRNP K, UNRIP und PCBP 1 und 2. Auch für die Glycyl-tRNA Synthetase (GARS) konnte bereits eine Funktion als ITAF in Polioviren gezeigt werden. Hier bindet GARS an die Domäne V der 5'-UTR. Es erkennt die tRNA ähnliche Struktur der UTR und bindet an eine (einzelssträngige) 5'-CCA-3' Sequenz eines Loops.

Diese Bindung wird aber nicht nur in Enteroviren vermutet. Aufgrund der Bedingungen der Bindung von GARS an die virale RNA finden sich viele weitere theoretische GARS-Bindestellen (GBE) in den verschiedenen Picornaviren, so auch im Mengovirus (MV), einem Isolat des Encephalomyocarditis Virus (EMCV) aus der Gruppe der Cardioviren. Das Mengovirus stammt aus der Region Mengo in Uganda und infiziert in erster Linie Nager und nicht-humane Primaten, in welchen es dann eine schwere Myokarditis auslöst, aber auch der Mensch kann infiziert werden.

In dieser Arbeit wurden die gefundenen GBEs in der MV 5'- und 3'-UTR untersucht. Hierfür wurden Reporter-RNAs mit Mutationen der beiden UTRs in HeLa Zellen transfiziert. Durch Optimierung der verwendeten Pull-Down-Methode konnte die Bindung von GARS an die MV RNA nachgewiesen werden. Mittels Massenspektrometrie wurde die Auswirkung der GARS-Bindung untersucht. Hierbei wurde beobachtet, dass durch die Bindung von GARS die Bindung einer Vielzahl weiterer Proteine gefördert wird. Diese Proteine gehören unter anderem zu den Translationis-Initiationsfaktoren, Elongationsfaktoren oder zu Teilen der ribosomalen Untereinheiten. Es konnte die Bindung von GARS an die virale RNA nachgewiesen werden, und die daraus folgende positive Wirkung wird in dieser Arbeit diskutiert.

1. Summary

Picornaviruses are small RNA viruses containing a positive single-stranded RNA. This (+)ssRNA encodes the entire viral polyprotein. The polyprotein coding region is flanked at the 5' and 3' ends by untranslated regions (UTRs) having a complex secondary structure. The viral RNA has a viral protein (VPg) at the 5' end instead of a cap, and a poly(A) tail is added to the 3' end. Due to the lack of a 5' cap, the translation of the viral RNA is initiated via an internal ribosome entry site (IRES) at the 5'-UTR. Assembly of the ribosome at the IRES of the viral RNA is supported by components of the human 48S initiation complex, such as the eukaryotic initiation factors (eIFs) and other proteins that bind to the viral IRES. These IRES-binding proteins are called IRES trans-acting factors (ITAFs). ITAFs include proteins such as PTB, hnRNP K, UNRIP, and PCBP 1 & 2. Glycyl-tRNA synthetase (GARS) has also been proven to express a supportive function as an ITAF in polioviruses. GARS binds to domain V of the 5'-UTR. It recognizes the tRNA-like structure of the UTR and binds to a (single-stranded) 5'-CCA-3' sequence of a loop.

However, this binding is not only suspected in enteroviruses. Due to the conditions of GARS binding to viral RNA, many other putative GARS binding sites (GBE) are found in various picornaviruses, including Mengovirus (MV), an isolate of Encephalomyocarditis Virus (EMCV) from the Cardiovirus group. Mengovirus originates from the Mengo region in Uganda and primarily infects rodents and non-human primates, in which it causes severe myocarditis. However, humans can also be infected.

In this study, the GBEs found in the MV 5'- and 3'-UTR were investigated. For this purpose, reporter RNAs with mutations of both UTRs were transfected into HeLa cells. By optimizing and improving the protocol of the pull-down method, the binding of GARS to the MV RNA was proven. Mass spectrometry was used to investigate the effect of GARS binding. The data obtained show that the binding of GARS promotes the binding of many other proteins. These proteins include translation initiation factors, elongation factors, and parts of the ribosomal subunits. Thus, GARS binding to the viral RNA was proven and the potential positive effects are discussed.

2. Einleitung

2.1 Picornaviren

Picornaviren werden in der Klassifikation der Viren in den Realm der Riboviria und die Ordnung der Picornavirales gegliedert (Zell *et al.*, 2017). Sie bestehen aus vielen verschiedenen Genera, unter denen sich viele Pathogene für Tier und Mensch befinden (Zell, 2018; Heim, 2020). Zu ihnen gehören z. B. Enteroviren wie das Poliovirus, Aphthoviren wie Maul- und Klauenseuche (FMDV), Rhinoviren, das Hepatitis-A-Virus oder Cardioviren. Cardioviren sind in sechs verschiedene Gattungen (Cardiovirus A bis F) aufgeteilt (Lefkowitz *et al.*, 2018). Das Mengovirus ist beispielsweise ein Isolat des Encephalomyocarditis Virus (EMCV), der Gattung Cardiovirus A (Carocci & Bakkali-Kassimi, 2012). Picornaviren sind nicht umhüllt und haben eine ikosaedrische Form mit einem Durchmesser von lediglich 25 bis 30 nm (Zell *et al.*, 2017). Sie bestehen klassischerweise aus einer, wie der Name „Pico-RNA...“ andeutet, kleinen RNA. Bei dieser RNA handelt es sich um eine ca. 6,7 bis 10,1 kb kurze RNA, die als positiver Einzelstrang ((+)ssRNA) vorliegt (Jiang *et al.*, 2014; Heim, 2020). Das Genom von Picornaviren enthält das Leseraster für ein einziges Polypeptid, welches an beiden Enden (5' und 3') von je einer hoch strukturierten untranslatierten Region (UTR) flankiert ist (Jackson *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2009; Palmenberg *et al.*, 2010; Heim, 2020). Die virale RNA ist nicht wie bei eukaryotischen Zellen am 5'-Ende mit einem m⁷GpppN-CAP versehen (Sonenberg & Hinnebusch, 2009), sondern am 5'-Ende der 5'-UTR ist ein virales Protein kovalent an das Genom gebunden (VPg) (Flanegan *et al.*, 1977; Lee *et al.*, 1977; Ambros & Baltimore, 1978; Rothberg *et al.*, 1978). Neben dem am 5'-Ende gebundenen VPg ist am 3'-Ende ein Poly(A)-Schwanz aus etwa 50 bis 90 nt codiert (Yogo & Wimmer, 1972). Die verpackte virale RNA mit VPg und Poly(A)-Schwanz ist in **Abb. 1** dargestellt. Da die virale RNA nicht gecapt ist, muss die Translation Cap-unabhängig gestartet werden. Dies ist durch eine *internal ribosome entry site* (IRES), einer Struktur in der 5'-UTR von Picornaviren, gewährleistet, welche eine Cap-unabhängige Translationsinitiation ermöglicht (Jang *et al.*, 1988; Pelletier & Sonenberg, 1988). Neben diesen Strukturen und Elementen des viralen Genoms gibt es noch ein *cis*-replikatorisches Element (CRE), das eine relevante Rolle in der Replikation spielt (McKnight & Lemon, 1998). Nach Eckard Wimmer und Aniko V. Paul gibt es genetisch sechs charakteristische Merkmale für Picornaviren (Wimmer & Paul, 2010).

1. Eine virale (+)ssRNA, die am 5'-Ende ein VPg gebunden hat und 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz besitzt.
2. Ein Genom aus 7.000 – 8.000 nt mit einer viralen Replikase ohne Proofreading (Korrektur) Funktion.
3. Eine starke Tendenz zur genetischen Rekombination mit verwandten Picornaviren.
4. Eine monocistronische mRNA, welche ein Polypeptid codiert, das prozessiert werden muss.
5. Eine IRES, um Cap-unabhängige Translation zu gewährleisten und die Inhibition Cap-abhängiger Translation zu erlauben.
6. Eine effiziente Replikation mit dem Bestreben, die optimalen Strukturen des Genoms zu erhalten.

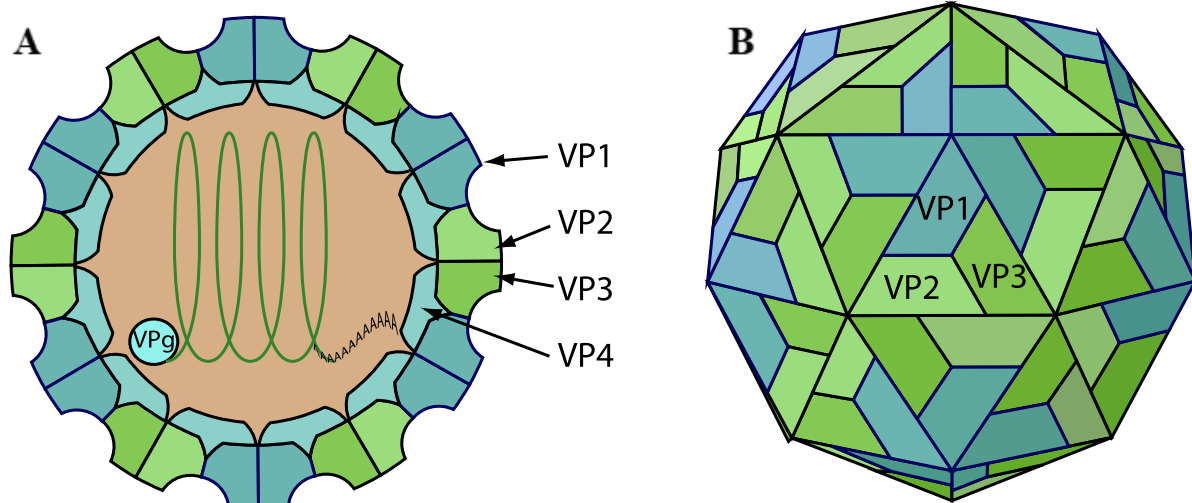


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Picornavirus. A zeigt einen Querschnitt des Kapsids, mit viraler RNA und ihrem VPg und dem Poly(A)-Schwanz an 5'- und 3'-Ende. B zeigt das Virus von außen. Die Strukturproteine bilden mit VP1-3 außen und VP4 im inneren (A) eines von 60 Proteomeren. Das Kapsid ist um die 30 nm im Durchmesser und besitzt eine ikosaedrische Form (Hulo *et al.*, 2011).

2.2 Genom

Der Aufbau des Polyproteins ist zwischen den verschiedenen Picornaviren ähnlich strukturiert. Eine schematische Darstellung eines Cardiovirus-Genoms und der Prozessierung seines Polyproteins zu den finalen Proteinen ist in **Abb. 2** gezeigt. Das Polypeptid besteht in der ersten Einteilung aus einem Leaderprotein (L), P1 (dem Kapsidprotein-Vorläufer) sowie P2 und P3, den Vorläufern der Replikationsproteine (Hulo *et al.*, 2011; Martínez-Salas *et al.*, 2015). Das Polyprotein muss prozessiert werden, um funktionale Proteine zu erhalten. Um sich nicht vollständig auf die Wirtszellen verlassen zu müssen, sind die benötigten Proteasen im Polyprotein enthalten und können dieses somit in verschiedenen Schritten prozessieren (Toyoda *et al.*, 1986; Parks *et al.*, 1989; Skern *et al.*, 1991; Seipelt *et al.*, 1999).

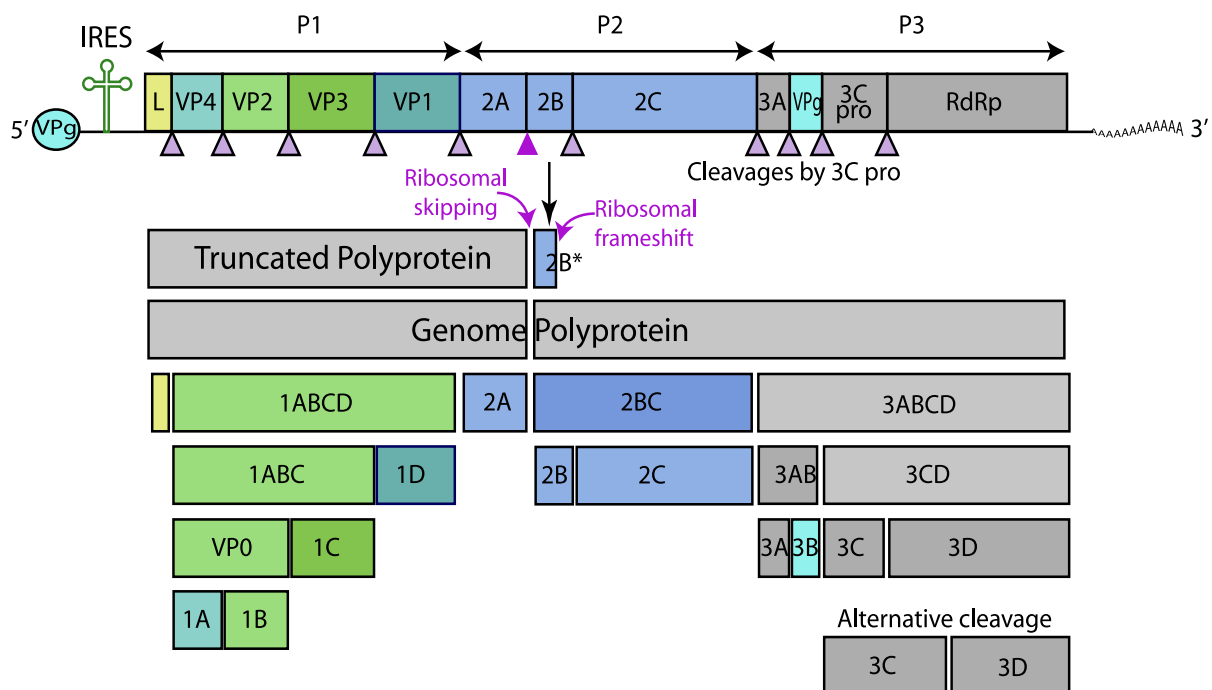


Abb. 2: Schematische Darstellung des Cardiovirus-Genoms mit Polypeptid und viralen Proteinasen. Die virale RNA mit VPg, 5'-UTR, codiertem Bereich, 3'-UTR und Poly(A)-Schwanz ist dargestellt. Der kodierende Bereich ist in die Übergruppen P1, 2 und 3 und die einzelnen Peptide unterteilt. Die Schnittstellen von 3C sind mit blauschwarzen Dreiecken markiert. Es handelt sich um ein 7,8 kb Genom mit einem einzelnen ORF. P1 kodiert für die Strukturproteine, P2 und P3 für die Replikationsproteine (Hulo *et al.* 2011).

Für die initiale Spaltung und die sekundäre Spaltung des Polyproteins aller Picornaviren ist die Protease 3C verantwortlich (Parks *et al.*, 1989; Seipelt *et al.*, 1999). Neben 3C können L und 2A in verschiedenen Picornaviren noch zusätzliche Proteasefunktionen aufweisen (Martínez-Salas *et al.*, 2015). Das Leaderprotein von Cardioviren wie dem Mengovirus besitzt mehrere Funktionen. Es ist nicht nur an der Translationsregulation beteiligt (Dvorak *et al.*, 2001), sondern sorgt auch für eine Inhibition der Apoptose (Romanova *et al.*, 2009) und kann zusätzlich die

Interferonsynthese mittels Phosphorylierung der Nukleoporeine inhibieren (Hato *et al.*, 2007; Porter & Palmenberg, 2009). Die Aufteilung und Nomenklatur der weiteren Proteine erfolgt alphabetisch von 5' nach 3'. Zusätzlich sind die Proteine nummeriert, je nachdem, ob sie aus P1 (1C) P2 (2B) oder P3 (3D) stammen.

Wie in **Abb. 1** dargestellt, besteht das virale Kapsid aus 60 Untereinheiten, aufgebaut aus 1A, 1B, 1C und 1D (nach alter Nomenklatur VP für Viral Protein), wobei 1A sich im Innern des Kapsids befindet, wohingegen 1B, 1C und 1D die Außenseite bilden (Hulo *et al.*, 2011). Die Proteine der P2-Region bestehen aus 2A, 2B und 2C. Die folgenden Ausführungen beziehen sich, wenn nicht anders vermerkt, auf Cardioviren. Das 2A-Protein ist auf der einen Seite an einem Frameshift beteiligt, aus welchem 2B hervorgeht, auf der anderen Seite bindet es an 40S-Untereinheiten des Ribosoms und sorgt für eine Inhibierung der Wirtstranslation (Aminev *et al.*, 2003; Groppo & Palmenberg, 2007; Palmenberg *et al.*, 2010). Protein 2B ist über eine Aktivierung von NLRP3-Inflammasomen an einer erhöhten Permeabilität der Wirtszelle beteiligt (Ito *et al.*, 2012). Protein 2C bindet an die Zellmembran und kann diese neu organisieren und weist zusätzlich noch eine ATPase-Aktivität auf (Cho *et al.*, 1994; Yin *et al.*, 2024).

Die P3-Region des viralen Genoms codiert unter anderem für das 3A-Protein, welches in verschiedenen Picornaviren unterschiedliche Funktionen besitzt, wie z. B. PI4KB Rekrutierung oder Inhibierung von Proteintransporten (Jackson & Belsham, 2021). Protein 3B, meist nur als VPg bezeichnet, ist essentiell für alle Picornaviren, ist aber kaum konserviert zwischen verschiedenen Arten (Wimmer & Paul, 2010). VPg ist ein kleines (19 bis 26 AS) Peptid (Sun *et al.*, 2014), welches nach seiner Translation an das 5'-Ende des Genoms gebunden wird und dort als Primer für die Polymerase 3D dient (Paul *et al.*, 1998). Dieses Peptid spielt eine entscheidende Rolle in der viralen Replikation und wird später genauer beschrieben. Das vorletzte Protein, welches auf dem Genom kodiert ist, ist die Protease 3C. Wie oben bereits beschrieben, ist diese für die proteolytische Spaltung des Polyproteins verantwortlich (Toyoda *et al.*, 1986; Parks *et al.*, 1989; Skern *et al.*, 1991; Seipelt *et al.*, 1999). Zusätzlich inhibiert 3C die Stressantwort und Bildung von Stressgranula der Wirtszelle (Ng *et al.*, 2013). Als 3CD-Vorläufer besitzt es zusätzlich die Fähigkeit, die virale RNA zu binden (Andino *et al.*, 1990). Das letzte Protein des Genoms ist die virale RNA Polymerase 3D, welche sich zwischen verschiedenen Picornaviren in Struktur und Sequenz (460 bis 470 AS) kaum unterscheidet (Cameron *et al.*, 2010). Neben der Polymerase Funktion wird 3D noch benötigt, um den Primer für die RNA Polymerisation (VPg) mit Hilfe des CRE zu uridylieren (Paul *et al.*, 1998).

Ein weiteres wichtiges Element des Genoms ist das CRE. Es dient als Template für die Polyuridylierung des VPg zu VPgpUpU (Paul *et al.*, 2000; Rieder *et al.*, 2000; Paul *et al.*, 2003).

Trotz seiner essenziellen Rolle als Template für VPg ist das CRE kaum konserviert. Die einzigen Konstante des CRE sind zwei aufeinanderfolgende Adenosine (A), welche als direktes Template des VPg dienen, auch wenn diese Adenosine je nach Virusart an unterschiedlichen Positionen des Loops sitzen (Rieder *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002; Nayak *et al.*, 2005; van Ooij *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008). Nicht nur die genauen Sequenzen des CRE-Loops weichen stark voneinander ab, auch die Position des CREs variiert stark zwischen verschiedenen Picornaviren (Paul & Wimmer, 2015). Wie von A. V. Paul und E. Wimmer beschrieben (Paul & Wimmer, 2015), finden sich CREs beispielsweise in den kodierenden Regionen für die Strukturproteine VP2 (Mengovirus) oder VP0 (Parecovirus), der Replikationsproteine 2C (Poliovirus), 3D-pol (Hepatovirus) oder 2C-ATPase (Sapelovirus), oder sogar in der 5'-UTR (FMDV) (Lobert *et al.*, 1999; Goodfellow *et al.*, 2000; Mason *et al.*, 2002; Al-Sunaidi *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Son *et al.*, 2014).

2.3 UTRs und ITAFs

Untranslatierte Regionen (UTRs) sind Bereiche des Genoms, die nicht translatiert werden. Sie weisen ein hohes Maß an RNA-Sekundärstrukturen auf. Der codierende Bereich der viralen RNA ist am 5'- und 3'-Ende von UTRs flankiert. Die gesamte 5'-UTR von EMCV ist inklusive der Strukturelemente und Nomenklatur der Domänen in **Abb. 3** schematisch dargestellt.

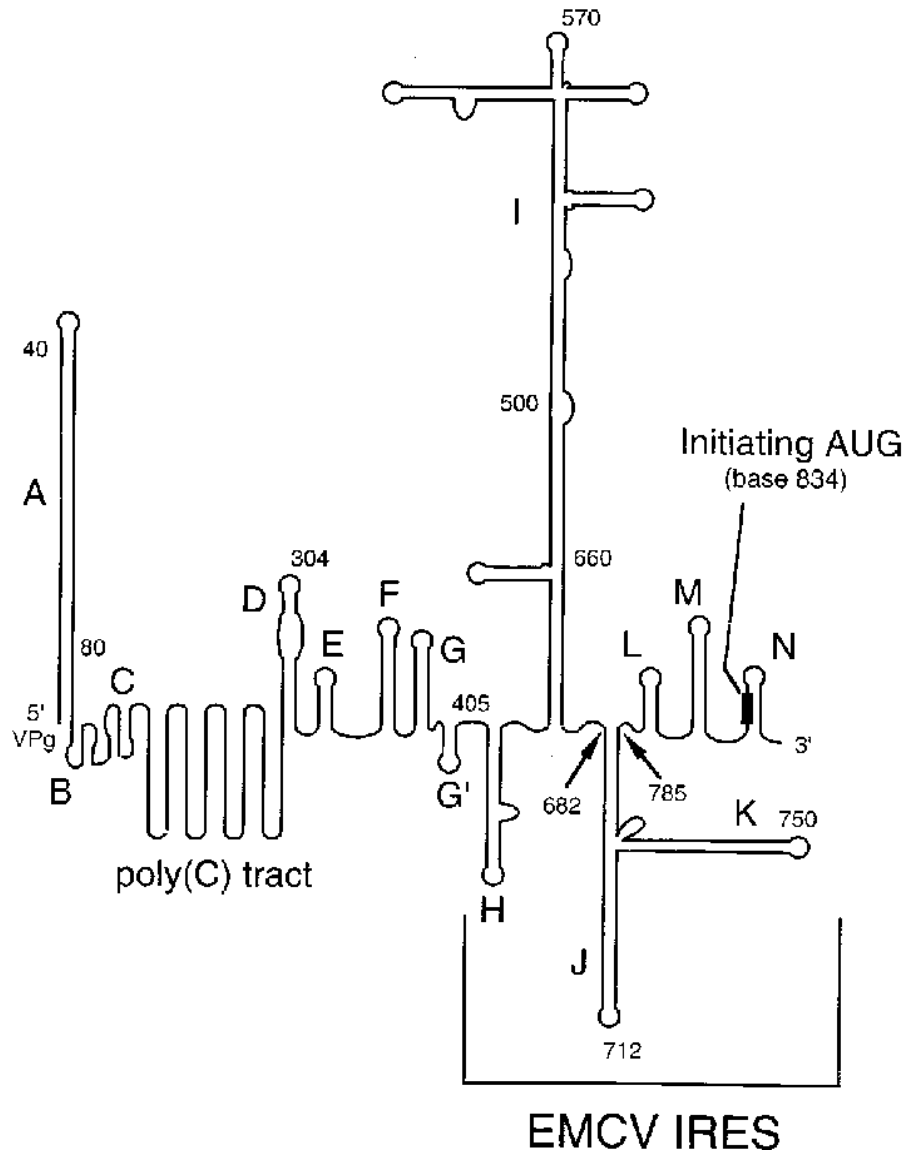


Abb. 3: EMCV 5'-UTR mit Poly(C)-Trakt und IRES. Dargestellt ist die Sekundärstruktur der 5'-UTR von EMCV-1. Die einzelnen Domänen sind alphabetisch benannt. Die für die Translation unerlässliche IRES ist umklammert. Es handelt sich um die nicht attenuierte Variante mit vorhandenem Poly(C)-Trakt (Hoffman & Palmenberg 1995).

Zwischen den stark strukturierten Bereichen der 5'-UTR findet sich bei EMCV und FMDV ein Bereich, welcher keine komplexe Struktur aufweist. Hierbei handelt es sich um einen Poly(C)-Trakt mit 50 bis 500 Cytosinbasen (C) (Martínez-Salas *et al.*, 2015). Dieser Poly(C)-Trakt spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenität des Mengovirus, da seine Kürzung oder gar komplette Deletion in einem attenuierten Mengovirus resultiert, welches nur noch

Bruchteile seiner ursprünglichen Pathogenität aufweist (Duke *et al.*, 1990). Wie bereits vorab erwähnt, handelt es sich bei Picornaviren um nicht gecapte RNAs. Am 5'-Ende der 5'-UTR befindet sich ein VPg-Peptid (Ambros & Baltimore, 1978; Rothberg *et al.*, 1978). Dieses VPg dient in Polioviren beispielsweise als Primer für die 3DPol (Paul *et al.*, 1998).

Ohne Cap ist die 5'-UTR frei verfügbar für die Unterbringung von Replikationssignalen (Liu *et al.*, 2009; Paul & Wimmer, 2015). Da die RNA nicht gecapt ist, muss die Initiation der Translation bei Picornaviren dann aber auf anderem Wege initiiert werden. Hierfür findet sich in allen Picornaviren eine stark konservierte interne Andockstelle für das Ribosom (eine IRES) (Jackson *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2009). Die erste Charakterisierung einer IRES erfolgte in Picornaviren (Jang *et al.*, 1988) (und Pelletier, s.o.), aber nicht nur Picornaviren nutzen eine IRES für die Initiation ihrer Translation. Neben den Picornaviridae verwenden auch Viren aus anderen Familien eine IRES, zu diesen gehören unter anderem das Pestivirus, Retroviren oder das Hepatitis-C-Virus (HCV) (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Vallejos *et al.*, 2010). Allgemein werden IRES in vier verschiedene Typen eingeteilt nach ihrem Bedarf an zellulären Faktoren wie *ires trans acting factors* (ITAFs) und nach ihrer RNA-Struktur (Kieft, 2008). Typ I IRES-Elemente finden sich unter anderem in Enteroviren und haben den höchsten Bedarf an ITAFs; Aphthoviren und Cardioviren besitzen eine Typ II IRES, eine Typ III IRES ist in Hepatitis-A-Viren zu finden und Typ IV IRES, welche aufgrund ihrer komplexen Struktur auch als HCV-like IRES bezeichnet werden, finden sich in Teschoviren. Diese benötigen lediglich eine geringe Anzahl an ITAFs für die Bindung des Ribosoms (Lin *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2022). Die IRES Typen I, II und IV, welche die Picornaviren abdecken, sind in **Abb. 4** mit den entsprechenden Bindungspartnern schematisch dargestellt.

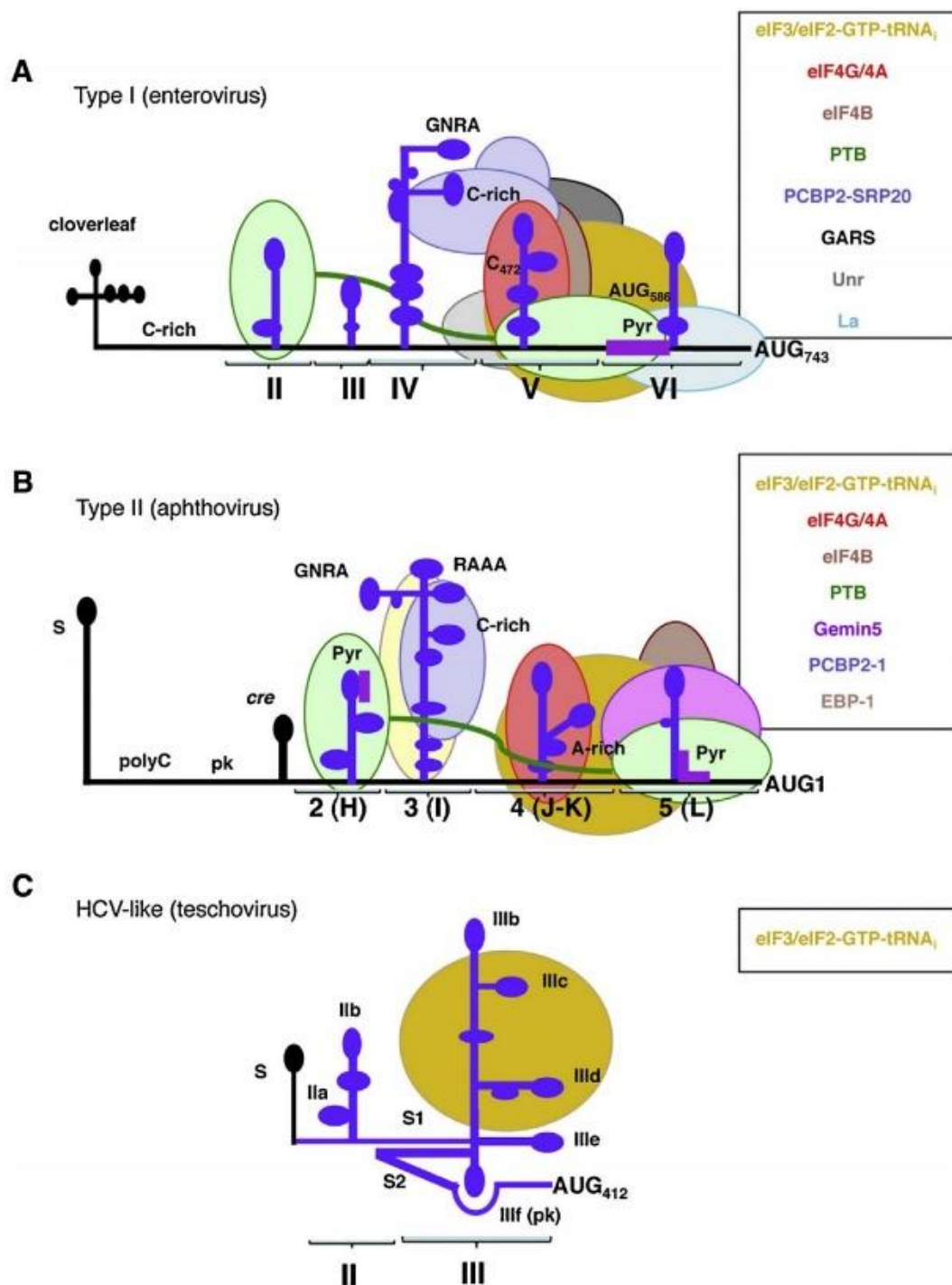


Abb. 4: IRES-Typen (1,2 und 4). **A** zeigt eine Typ 1 IRES wie bei Enteroviren, die benötigten eIFs und ITAFs zum Start der Translation sind farblich markiert, und ihre Bindung an den entsprechenden IRES-Teil ist schematisch dargestellt. **B** stellt eine Typ II IRES von Aphtho- oder Cardioviren dar. Die benötigten eIFs und ITAFs für die Aktivierung der IRES sind farblich dargestellt, sowie schematisch ihre Bindung an die entsprechende IRES-Stelle. **C** zeigt eine für diese Arbeit eher irrelevante Typ IV IRES von Teschoviren. Diese IRES ist HCV-ähnlich und benötigt nur einen eIF3/2-GTP-tRNA Komplex für ihre Aktivität. Diese ist mit entsprechender Bindestelle schematisch dargestellt (Martínez-Salas et al. 2015).

Es gibt mehrere verschiedene zelluläre Proteine, welche an und um die IRES binden und deren Funktion regulieren, wie eIF4G, ein kanonischer Translationsinitiationsfaktor, welcher unter anderem an die Poliovirus IRES Domäne 5, die FMDV IRES Domäne 4 und die EMCV IRES Domäne 4 (J-K-L) bindet (Kolupaeva *et al.*, 1998; López de Quinto & Martínez-Salas, 2000; Bassili *et al.*, 2004; Niepmann, 2009; Lozano *et al.*, 2014; Martínez-Salas *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017; Francisco-Velilla *et al.*, 2022; Abdullah *et al.*, 2023). ITAFs sind Proteine, welche an die IRES binden, und spielen somit eine wichtige Rolle in der viralen Replikation, indem sie den Zusammenbau des 48S-Translationsinitiationskomplex fördern (Pilipenko *et al.*, 2000; Pilipenko *et al.*, 2001; Andreev *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2011). Zu den ITAFs gehören einige Ribonukleoproteine wie *polypyrimidine tract-binding protein* (PTB). PTB gehört zu den gut untersuchten ITAFs und ist der erste beschriebene ITAF, welcher die Aktivität von Typ II IRES (Cardio- und Aphthoviren) verstärkt (Jang & Wimmer, 1990; Luz & Beck, 1991; Kaminski *et al.*, 1995). In der IRES von FMDV bindet PTB an zwei separate Bereiche der IRES (Song *et al.*, 2005), ebenso in der IRES von EMCV (Borovjagin *et al.*, 1994; Kolupaeva *et al.*, 1996). Genauer gesagt bindet es die Domäne 2 der Typ II IRES (Jang & Wimmer, 1990; Luz & Beck, 1991) und zusammen mit eIF4B die Domäne 5 (Meyer *et al.*, 1995; López de Quinto *et al.*, 2001). Somit verbindet PTB beide Enden der IRES miteinander (Song *et al.*, 2005) (Kafasla *et al.*, 2009). Es agiert als ein RNA-Chaperon, indem es die RNA-Struktur stabilisiert, um somit die Initiation der Translation zu unterstützen (Borovjagin *et al.*, 1994; Song *et al.*, 2005). Weitere Ribonukleoproteine, die als ITAFs fungieren, sind unter anderem das Poly(C)-Bindepotein 1 (PCBP1), UNRIP, hnRNP K (Choi *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2008) und PCBP2, welches die EMCV IRES aktiviert (Walter *et al.*, 1999). Ein weiteres ITAF ist die Glycyl-tRNA-Synthetase (GARS) (Andreev *et al.*, 2022), die in dieser Arbeit Gegenstand der Untersuchungen ist. GARS bindet an die Domäne 5 der Poliovirus IRES und hat einen positiven Effekt auf die Translation (Andreev *et al.*, 2012). Die 3'-UTR von Picornaviren besitzt, ähnlich wie die 5'-UTR, eine komplexere RNA-Struktur und endet am 3'-Ende mit einem Poly(A)-Schwanz von 50 bis 90 Basen (Yogo & Wimmer, 1972). Die Notwendigkeit einer 3'-UTR variiert zwischen den Picornaviren. Für Mengoviren (Cardiovirus) und Aphthoviren wurde gezeigt, dass eine Deletion der 3'-UTR zu einem Verlust der Infektiosität und der viralen Replikation führt (Duque & Palmenberg, 2001; Sáiz *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu zeigte eine Deletion der 3'-UTR in Polioviren kaum Unterschiede in der Effizienz der viralen Replikation, und die Infektiosität blieb ebenso weitestgehend erhalten (Brown *et al.*, 2005). Der Poly(A)-Schwanz kann von dem Poly(A)-Bindepotein (PABP) gebunden werden (Blobel, 1973) und ist für Eukaryoten (Kahvejian *et al.*, 2005) und auch Hefen (Sachs *et al.*, 1987) wichtig, um die Translation zu initiieren. Dies geschieht bei der viralen Translation durch seine Bindung mit eukaryotischen

Initiationsfaktoren (eIFs) (eIF4G im Initiationskomplex), was zu einer Zirkularisierung der RNA führt (Gingras *et al.*, 1999). Die Translation von Picornaviren wird ebenso von der Interaktion zwischen PABP und eIF4G verstärkt (Michel *et al.*, 2001). Für Polioviren wurde jedoch gezeigt, dass die Zirkularisierung der RNA auf der Bindung von PABP mit dem viralen Protein 3CD beruht, welches zu diesem Zeitpunkt an das 5'-Ende gebunden ist (Herold & Andino, 2001). Zusätzlich wird eine Interaktion zwischen dem 3'-gebundenen PABP und dem 5' gebundenen PCBP vermutet, die die Zirkularisierung der viralen RNA unterstützen könnte (Barton *et al.*, 2001). In der folgenden **Abb. 5** sind die Initiationskomplexe der Translation und die daran beteiligten Proteine für ein Cap-abhängige und eine IRES-abhängige (virale) Translation gezeigt.

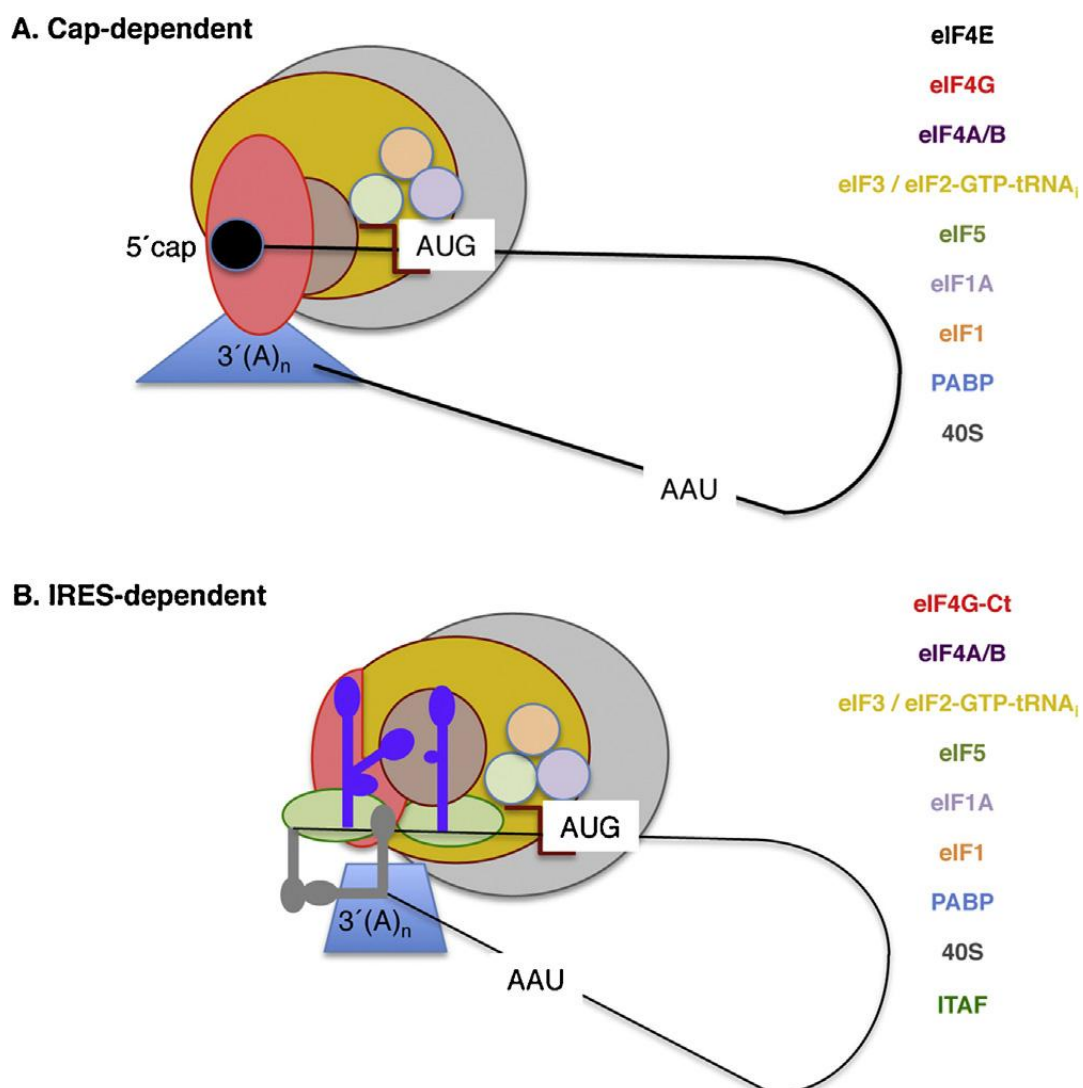


Abb. 5: Vergleich der Initiationskomplexe von Cap-abhängiger Translation zellulärer mRNAs und IRES-abhängiger viraler Translation. A zeigt farblich markiert die benötigten eIFs und deren schematische Position an der RNA bei CAP-abhängiger Translation. Ähnlich ist in B der IRES-abhängige Initiationskomplex schematisch mit seinen Bindungspartnern (eIFs) farblich dargestellt (Martínez-Salas et al. 2015).

2.4 Lebenszyklus von Picornaviren

Im Folgenden wird ein Überblick, wie in **Abb. 6** dargestellt, über den Lebenszyklus von Picornaviren vermittelt. Picornaviren sind, wie alle Viren, auf Faktoren der Wirtszelle angewiesen, um sich zu vermehren. Zusätzlich werden Wirtsfaktoren wie verschiedene eukaryotische Initiationsfaktoren modifiziert oder verändert, damit die Cap-abhängige Translation inhibiert und die Cap-unabhängige Translation verstärkt wird (Gingras *et al.*, 1996; Martínez-Salas *et al.*, 2015). Zu bemerken ist, dass das Genom von Picornaviren nicht zeitgleich translatiert und repliziert werden kann (Gamarnik & Andino, 1998; Barton *et al.*, 1999). Da die Replikationsproteine zwar im Plusstrang-Genom kodiert sind, aber nicht im Virus-Partikel vorhanden sind, kann ein Genom, welches noch nicht translatiert wurde, nicht repliziert werden (Collis *et al.*, 1992; Novak & Kirkegaard, 1994).

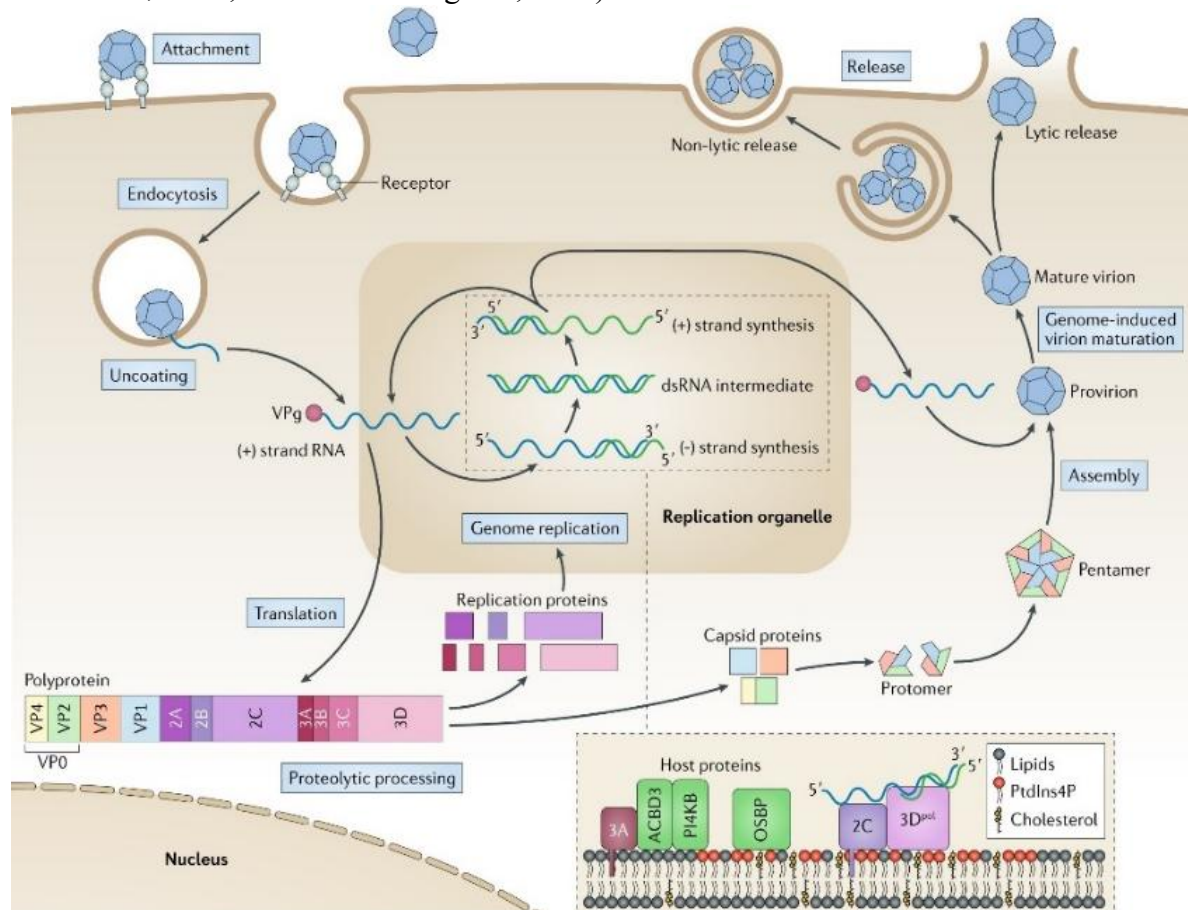


Abb. 6: Lebenszyklus eines Picornavirus. Der dargestellte Lebenszyklus ist weitestgehend auf alle Picornaviren zu übertragen. Das Virus muss zunächst an die Wirtszelle binden und anschließend aufgenommen werden. Nach der Aufnahme in die Zelle wird die virale RNA freigegeben, und eine erste Translationsrunde findet statt. Mit dem Erhalt der ersten Replikationsproteine wird zunächst die RNA-Synthese des Minusstranges und danach die Massenproduktion der Plusstrang-RNAs eingeleitet. Aus der Plusstrang-RNA kann weitere RNA und eine große Menge an Proteinen produziert werden. Am Ende wird VPg 5' an die virale (+)ssRNA gebunden, diese wird im Provirion verpackt und die fertigen Viren verlassen lytisch (EMCV) die Wirtszelle (Baggen et al. 2018).

An erster Stelle des Lebenszyklus steht das Binden an eine Wirtszelle und die rezeptorvermittelte Aufnahme des Virus mittels Endozytose (Bergelson, 2010; Levy *et al.*, 2010). Für EMCV wurde im Mausmodell gezeigt, dass es für die Aufnahme in die Zellen an den Rezeptor VCAM1 (Vaskuläres Zell Adhäsions Molekül 1) bindet (Huber, 1994). In HeLa Zellen konnte gezeigt werden, dass EMCV an ein 70 kDa großes Sialoglycoprotein bindet (Burness & Pardoe, 1983; Jin *et al.*, 1994). Nach der Aufnahme in die Wirtszelle wird die virale RNA in das Cytoplasma freigesetzt (Levy *et al.*, 2010). Der Mechanismus der Aufnahme der viralen RNA in die Zelle variiert zwischen den verschiedenen Picornaviren. Es wird vermutet, dass die Abläufe innerhalb der Genera konserviert sind (Levy *et al.*, 2010), dies ist für EMCV noch nicht vollständig verstanden (Carocci & Bakkali-Kassimi, 2012).

Von der im Cytosol freigesetzten viralen (+)ssRNA wird die Translation des ersten Polyproteins gestartet. Sobald dann die ersten viralen Replikationsproteine im Cytosol vorliegen, induzieren diese Replikationorganellen, an denen dann die Replikation des Genoms startet (Kirkegaard & Semler, 2010; Palmenberg *et al.*, 2010; van der Schaar *et al.*, 2016; Baggen *et al.*, 2018; Heim, 2020). Das 5' gebundene VPg besitzt keine Funktion in der Translation und kann durch ein Wirtsenzym vom viralen Genom abgespalten werden (Ambros & Baltimore, 1980). Wie in allen Picornaviren wird auch in EMCV/Mengoviren die Translation Cap-unabhängig mittels IRES initiiert (Martínez-Salas *et al.*, 2015). Für die Translationsinitiation wird die Bindung des C-terminalen Teils von eIF4G und die restlichen zellulären eIFs mit Ausnahme von eIF4B benötigt, PTB stimuliert diesen Prozess (Kaminski *et al.*, 1995; Balvay *et al.*, 2009). Mithilfe dieses Initiationskomplexes wird die 40S-Untereinheit des Ribosoms an die IRES rekrutiert, welche dann nach einem Startcodon scannt, um, dort angekommen, die 60S-Untereinheit zu rekrutieren und die Initiationsfaktoren wieder freizugeben (Carocci & Bakkali-Kassimi, 2012). Somit ist das Ribosom vervollständigt, und die Translation wird gestartet. Das entstandene Polyprotein wird durch 3C und 2A in die Kapsid- und Replikationsproteine prozessiert (Parks *et al.*, 1989; Seipelt *et al.*, 1999). Im Anschluss an die erste initiale Translation werden zelluläre eIFs wie eIF4B oder der N-terminale Teil von eIF4G mittels Proteolyse zerstört, um die Translation der Wirtszelle zu inhibieren und nur noch Cap-unabhängige Translation zu gewährleisten (Lamphear *et al.*, 1993; Gingras *et al.*, 1996; Belsham *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Gradi *et al.*, 2004; Rodríguez Pulido *et al.*, 2007; Bonderoff *et al.*, 2008). Zudem wird mit Erhalt der ersten Replikationsproteine die Massenproduktion der viralen RNA gestartet, woraufhin auch virale Proteine in großer Menge translatiert werden können. Nach M. Carocci besteht der Replikationskomplex in erster Linie aus der Polymerase 3D^{Pol} mit Unterstützung von 3CPro, 2C und 3AB (Carocci & Bakkali-Kassimi, 2012). Ebenso ist laut M. Carocci der detaillierte Ablauf

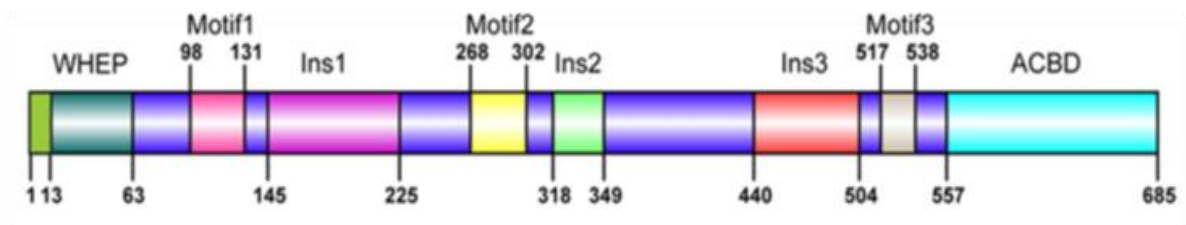
der Cardiovirus Replikation nicht vollständig untersucht und verstanden. Der Modellorganismus für Picornaviren ist das Poliovirus (Carocci & Bakkali-Kassimi, 2012).

Nach der initialen Translation des infizierenden Genoms wird für die Massenproduktion von viralen Bestandteilen dann im nächsten Schritt eine einzelsträngige Minusstrang-RNA-Kopie der viralen RNA erstellt. Hierfür wird die Translation eingestellt, um die RNA transkribieren zu können, da ansonsten die in 5'-3'-Richtung laufenden Ribosomen mit der in 3'-5'-Richtung entgegen kommenden viralen RNA-Polymerase kollidieren würden (Gamarnik & Andino, 1998). In Polioviren wird angenommen, dass die Initiation der Minusstrang-RNA-Synthese durch eine Zirkularisierung der RNA über Interaktion von PCBP2-3CDpro, gebunden am 5'-Cloverleaf, und PABP, gebunden am 3'-Poly(A), eingeleitet wird (Barton *et al.*, 2001; Herold & Andino, 2001; Paul & Wimmer, 2015). Im nächsten Schritt wird die Uridinylierung des VPg zu VPgpUpU durch 3Dpol katalysiert (Flanegan & Baltimore, 1977; Paul *et al.*, 1998). Für die Uridinylierung des VPg werden die zwei konstanten Adenosine des CRE-Loops als Template verwendet (Paul *et al.*, 2000; Rieder *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 2003; Nayak *et al.*, 2005; van Ooij *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008). VPgpUpU bindet dann am Poly(A)-Schwanz und wird dort von 3Dpol als Primer zur Minusstrang-RNA-Synthese verwendet (Flanegan & Baltimore, 1977; Paul *et al.*, 1998). Mit der Elongation der Minusstrang-RNA entsteht ein dsRNA-Intermediat, die sogenannte replikative Form (RF) (Montagnier & Sanders, 1963; Pérez-Bercoff *et al.*, 1974). Um die beiden Stränge der dsRNA zu trennen und viel Plusstrang-RNA zu synthetisieren, bindet vermutlich die 2C/2BC-ATPase an das 3'-Ende des Minusstrang-RNA-Cloverleaf (Pfister *et al.*, 2000; Paul & Wimmer, 2015). Dann wird neues VPgpUpU zum 3'-Ende des Clover Leaf des Minusstrang-RNA gebracht, und 3Dpol elongiert mehrere (+)RNAs an einer Minusstrang-RNA (RI) (Paul & Wimmer, 2015). Das replikative Intermediat (RI) besteht aus einem Minusstrang-RNA mit 6 bis 8 neu entstehenden (+)RNA-Strängen und besitzt somit ssRNA und dsRNA-Bereiche (Kuhn & Wimmer, 1987) (Wimmer *et al.*, 1993). Durch die Masse an replizierter (+)ssRNA steigt dann auch die Menge an translatiertem Polyprotein sowie finalen viralen Proteinen. Im letzten Schritt wird die virale RNA mit dem 5'-gebundenen VPg zusammen in Provirionen verpackt und die Wirtszelle wird lysiert (Flanegan *et al.*, 1977; Mikitas *et al.*, 2012). Dieser ganze Zyklus dauert ungefähr 7 bis 10 Stunden (Romanova *et al.*, 2009).

2.5 Glycyl-tRNA Synthetase (GARS)

Der Genlocus der humanen GARS befindet sich auf Chromosom 7p14 und ist etwa 40 kb groß. Das Transkript, bestehend aus 17 Exons, hat je nach Spleißvariante eine Größe von etwa 2,5 kb (Antonellis *et al.*, 2003). Die Glycyl-tRNA-Synthetase liegt als Homodimer vor und ist der Klasse II der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRS) zuzuordnen (Eriani *et al.*, 1990; Delarue, 1995; Francklyn *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 2016; Kaiser *et al.*, 2018). Das Protein besteht aus drei Domänen: der WHEP-TRS Domäne, dem katalytischen Kern, in welchem die Ligation von Aminosäure und tRNA stattfindet, und der Anticodon-Bindungs-Domäne (ABD), welche die Glycin spezifische Sequenz der tRNA erkennt (Antonellis *et al.*, 2003). GARS katalysiert unter Abhängigkeit von ATP die Bindung von Glycin an das 3'-Ende der tRNA (Cader *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2014; Oprescu *et al.*, 2017). Somit trägt es entscheidend zur zellulären Translation bei (Andreev *et al.*, 2012). Zusätzlich produziert es Diadenosin (Ap4A = Stresshormon), welches ein universelles Signalmolekül für Signalwege der Zelle ist (Guo *et al.*, 2009; Ferguson *et al.*, 2020). Neben der Bindung von Glycin an die tRNA ist GARS, unter anderem durch die Produktion von Ap4A, an der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase beteiligt und spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorabwehr sowie bei der Pathophysiologie von Erkrankungen (Park *et al.*, 2012). Mutationen des GARS Gens führen zu einem Defekt in der Translation, welcher wiederum an der Entstehung der Charcot-Marie-Tooth Krankheit und der spinalen Muskelatrophie beteiligt ist (Antonellis *et al.*, 2003; Guo & Schimmel, 2013). Im viralen Kontext konnte von R. Aviner gezeigt werden, dass GARS sich in Polysomen mit viraler RNA anreichert (Aviner *et al.*, 2021). Zudem ist bekannt, dass GARS an die Poliovirus IRES bindet und dadurch die Translation stimuliert (Andreev *et al.*, 2012). GARS erkennt und bindet einen RNA-Loop mit 5'-NCC-3' Abfolge (Jühling *et al.*, 2009; Westhof *et al.*, 2022; Giegé & Eriani, 2023). Bei der Sequenz 5'-NCC-3' handelt es sich um die komplementäre Sequenz des Glycin Codons 5'-GGN-3'. Direkt nach dem 5'-NCC-3' folgt in 3'-Richtung ein Adenosin, welches in Bakterien und in Eukaryoten stark konserviert ist (Saks & Conery, 2007; Jühling *et al.*, 2009; Westhof *et al.*, 2022). Dieses Adenosin steht in direktem Kontakt zur ABD von GARS, somit enthält die im tRNA-Antikodon-Loop vorhandene Sequenz das konservierte Motif 5'-CCA-3' (Qin *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2023). Ein Überblick der Struktur von GARS ist in der folgenden **Abb. 7** dargestellt.

A



B

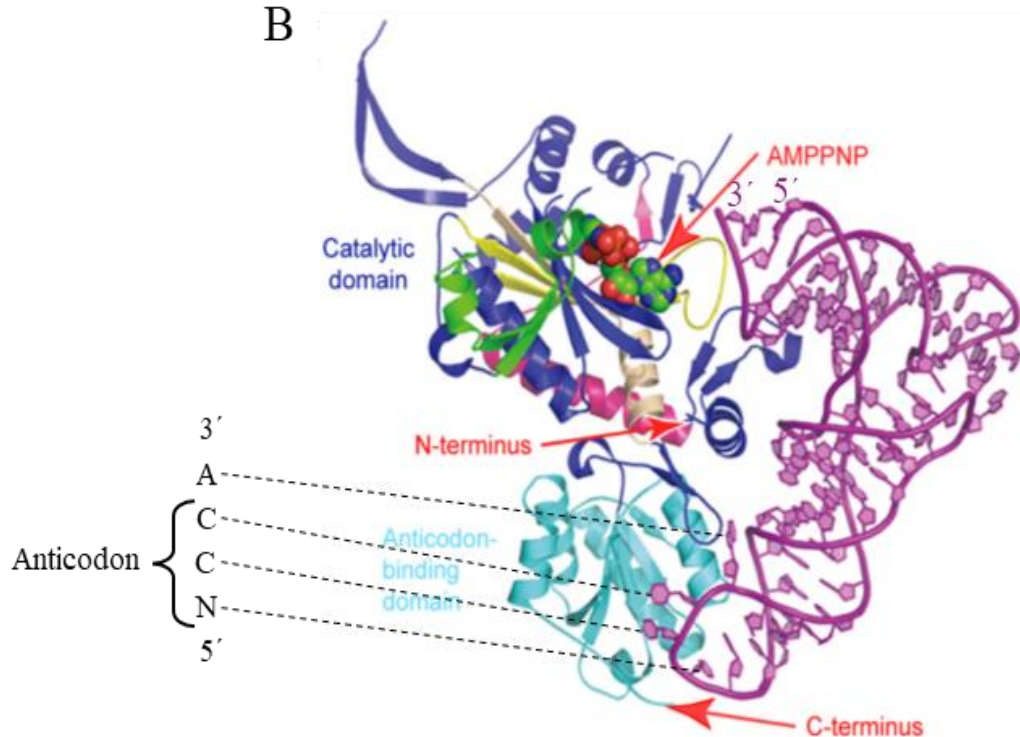


Abb. 7: Struktureller Überblick von E71GSF-tRNAGly-glycine-AMPPNP. **A** stellt die GARS-Domänen dar. Der katalytische Teil ist in dunkelblau gefärbt, die Anticodon-Bindestelle ist in Cyan gefärbt und die WHEP-TRS-Domäne ist in Dunkelgrün markiert. **B** zeigt den E71GSF-tRNAGly-glycine-AMPPNP Komplex. Das Farbschema ist mit Teil A identisch. C-, N-Terminus und AMPPNP sind mit roten Pfeilen markiert. Zusätzlich sind die Enden der tRNA, ebenso wie die tRNA, in lila beschriftet. Die Markierung und Beschriftung (schwarz) des Anticodons wurde dem Original ergänzt. Verändert nach (Qin et al. 2014).

2.6 Mengovirus

Der erste dokumentierte Fund eines mit dem Mengovirus (MV) infizierten Lebewesens war 1946 in einem Forschungsinstitut in Uganda. Ein als Versuchsobjekt verwendeter Rhesusaffe, welcher noch keiner Behandlung unterzogen worden war, zeigte plötzlich eine Lähmung seiner hinteren Extremitäten, und das Mengovirus konnte aus dem Affen isoliert werden (Dick *et al.*, 1948). Bereits vier Jahre zuvor konnte in Miami Florida ein EMCV Isolat aus einem Gibbon gewonnen werden (Helwig & Schmidt, 1945). Dieser starb plötzlich an einer Myokarditis und einem Lungenödem. Das Mengovirus wird in die Familie der Picornaviridae eingeordnet und gehört unter den aktuell sechs verschiedenen Gattungen (Cardiovirus A bis F) der Cardioviren zu den Cardioviren A (Carocci & Bakkali-Kassimi, 2012). Wie alle Picornaviren handelt es sich bei dem Mengovirus um ein kleines, nicht umhülltes Virus mit einer (+)ssRNA (7,8 kb), eingepackt in einem 30 nm großen, ikosaedrischen Kapsid (Luo *et al.*, 1987). Durch eine Infektion mit dem Virus wird eine schwere Myokarditis ausgelöst, welche in nicht-humanen Primaten und Nagetieren zum Tod führt (Helwig & Schmidt, 1945; Dick *et al.*, 1948). Das Mengovirus kann nicht nur kleine und große Säugetiere infizieren, sondern auch in abgeschwächter Form den Menschen, was es zu einem Zoonosenerreger der Risikogruppe 2 macht (Oberste *et al.*, 2009; Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA), 2018). Um bei Arbeiten mit dem Mengovirus Gefahren zu minimieren, wird ein attenuierter Stamm mit deletiertem Poly(C)-Trakt verwendet, welcher eine um 10^{-8} fach verringerte Pathogenität in Mäusen aufweist (Duke *et al.*, 1990). Dieser Stamm ist in Deutschland in die Risikogruppe 1 eingestuft. Diese geringe Pathogenität macht das Mengovirus zu einem idealen Modellorganismus für Picornaviren.

2.6 Aktueller Stand und Zielsetzung

Bereits 2012 wurde die Bindung von rekombinantem GARS an die Domäne 5 der Poliovirus (PV) 5'-UTR RNA gezeigt, und eine Stimulation der Poliovirus-Translation durch GARS wurde nachgewiesen (Andreev *et al.*, 2012). Daraufhin wurde eine bioinformatische Suche nach putativen GARS-Bindestellen in der Familie der Picornaviridae durchgeführt (noch unveröffentlicht AG Niepmann/AG Marz). Hierdurch konnten theoretische GARS-Bindestellen in der Gruppe der Cardioviren gefunden werden. Im Gegensatz zu anderen Picornaviren sind GARS-Bindestellen bei Cardioviren nicht nur in der 5'-UTR, sondern auch in der 3'-UTR des Genoms zu finden. Mittels Transfektionen und Plaque-Assays, RNA-Stabilitätsmessungen und Fluoreszenzmessungen konnte in der AG Niepmann (noch unveröffentlicht) gezeigt werden,

dass durch die Bindung von GARS an die virale RNA ein positiver Effekt auf die virale Translation vermittelt wird.

In dieser Arbeit wurde die Bindung von GARS an die Mengovirus RNA für die 3'-UTR bestätigt, und die in einer zusätzlichen bioinformatischen Suche gefundene mögliche GARS-Bindestelle der 5'-UTR konnte experimentell nachgewiesen werden. Hierfür wurden Co-Präzipitations-Experimente von viraler RNA mit assoziierten Proteinen verwendet, und die an die RNA gebundenen Proteine wurden mit Hilfe von Western Blots sowie mit Massenspektrometrie (MassSpec) nachgewiesen. Basierend auf den MassSpec-Ergebnissen wurden noch weitere Bindungspartner der viralen RNAs identifiziert und deren mögliche Interaktionen analysiert. Abschließend wurden mittels iCLiP2 alle GARS bindenden RNA-Fragmente auch im gesamten Transkriptom einer mit Mengovirus infizierten humanen Zelllinie (und als Kontrolle in nicht-infizierten Zellen), viral oder human, sequenziert. Aus diesen Daten kann jeweils die genaue Stelle der Bindung zwischen GARS und RNA gezeigt werden. Ziel ist es, ein besseres Verständnis über die Abläufe der Translation und Replikation von Mengoviren im Bezug zu GARS zu erlangen und deren Auswirkung zu diskutieren.

3. Ergebnisse

3.1 Die Biotin-RNA Pull-Downs

Im Folgenden wird das Vorgehen zur Optimierung des Pull-Down-Verfahrens dargestellt. Im Laufe des Prozesses wurde das Protokoll schrittweise optimiert. Die finale Version des Pull-Downs ist unter **7.5 Elektroporation und Pull-Down** zu finden. Der finale Western Blot dient dem Nachweis der Bindung von GARS an die virale RNA. In dieser Arbeit wurden dafür kurze Reportervarianten der viralen RNA (783 nt) verwendet. In **Abb. 8** ist die verwendete RNA samt ihrer Sekundärstruktur dargestellt. Sie besteht aus der 5'-UTR ohne Poly(C), einem kurzen Linker, dem HiBiT Fluoreszenzreporter und der 3'-UTR samt Poly(A). Die bioinformatisch gefundenen GARS-Bindeelemente (GBE) sind hell- und dunkelblau markiert. Verwendet wurden vier Varianten dieser RNA. Ein Wildtyp (WT) ohne Veränderungen, eine Punktmutation der GBE der 5'-UTR (5'MT), eine Punktmutation der GBE der 3'-UTR (3'MT) und eine Variante, bei der beide GBEs mutiert wurden (2xMT). Die genauen Sequenzen und Punktmutationen sind in **Tabelle 15** zu finden und die vollständigen Sequenzen der RNAs sind in **8.2 Referenzgenome** zu finden.

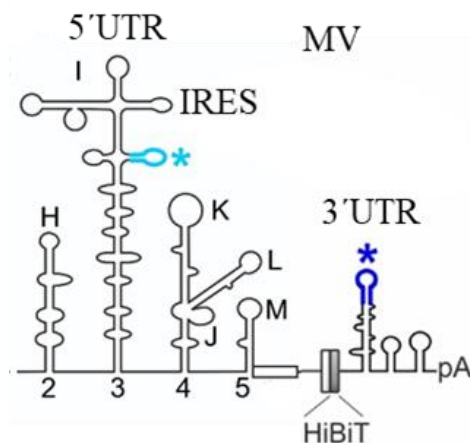


Abb. 8: Schematische Darstellung der verwendeten Mengovirus-Reporter-RNA. Die Domänen der 5'-UTR sind mit H bis M benannt und die Position der internal ribosome entry site (IRES) ist beschriftet. Der HiBiT-Fluoreszenzreporter ist zwischen den UTRs abgebildet. Die GBE in der 5'-UTR ist hellblau und die in der 3'-UTR ist dunkelblau markiert. Der Poly(A)-Schwanz ist als pA abgebildet. Bereitgestellt von Michael Niepmann.

Anfangs wurde eine Markierung der RNA über den Einbau von biotinyliertem UTP im Verhältnis 1:30 zu normalem UTP während der *in vitro* Transkription vorgenommen (Andreev *et al.*, 2012). Davon wurden anfangs 550 ng RNA (~ 2,2 pmol) mittels Elektroporation (EP) in 5 Millionen HeLa Zellen transfiziert, und die biotinylierte RNA mit gebundenen Proteinen aus dem Lysat wurde nach einer Inkubation an Streptavidin-gekoppelte Sepharose Beads gebunden. Gewaschen wurde mit dem bekannten Waschpuffer (**Tabelle 18**), aber ohne Zugabe von Detergenz. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass die Auftrennung der Proteine anfangs auf einem reinen 10 % SDS-Acrylamid-Gel erfolgte und alle verwendeten Primärantikörper auf die

gesamte Membran aufgetragen wurden. Die folgende **Abb. 9** zeigt einen der ersten Western Blots mit dem ursprünglichen Pull-Down-Verfahren. Es ist klar zu erkennen, dass im Pull-Down keine spezifischen Banden der gesuchten Proteine sichtbar sind. Der Input, welcher mit 10 % des Ausgangsvolumens jeder Probe gewählt wurde, zeigt für alle drei verwendeten Proben eine nahezu ähnliche Bandenintensität. Neben den Hauptbanden für GARS (83 kDa, orangener Pfeil) und GAPDH (36 kDa, grüner Pfeil) sind auch mehrere Banden unterhalb der Hauptbanden mit variierender Intensität zu erkennen. Dies könnte für Abbauprodukte der jeweiligen Proteine sprechen.

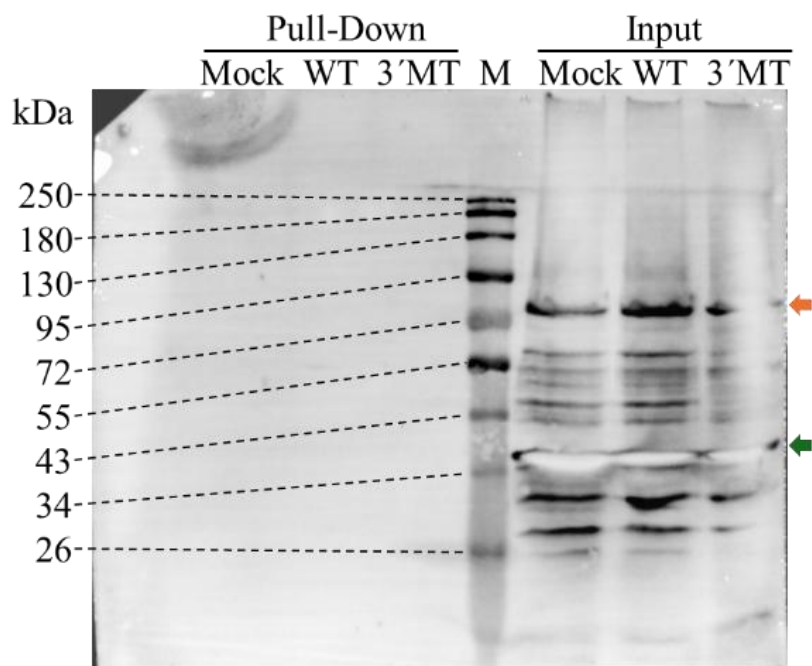


Abb. 9: Western Blot zur Testung des vorhandenen Pull-Down Protokolls. Pull-Down mit Sepharose-Beads und biotinylierter Mengovirus-RNA (Bio-UTP 1:30). Für den Pull-Down wurden je Probe 5 Millionen Zellen mit je 550 ng RNA mittels Elektroporation transfiziert. Die Beads wurden nicht geblockt, während der Aufreinigung des Pull-Downs wurde kein Detergenz im Waschpuffer verwendet und es fand kein Wechseln der Reaktionsgefäße statt. RNA gebundene Proteine wurden mittels RNase A (250 µg/ml) abgelöst und auf einem 10 % PAA-Gel aufgetrennt. Für den Input wurden 5 % und für den Pull-Down 95 % des Volumens verwendet. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen eIF4G, GARS und GAPDH inkubiert. Der Input und der GAPDH Antikörper dienen der Ladekontrolle. Aufgetragen wurden Wildtyp-RNA ohne Biotin (Mock), biotinylierte Wildtyp-RNA (WT) und 3'-GBE-Mutante (3'MT). Die GARS-Bande (83 kDa) ist mit einem orangenen Pfeil markiert, und die GAPDH Bande (36 kDa) ist mit dunkelgrün markiert.

Da der Pull-Down sichtlich leer ist, kam die Frage auf, ob die gewünschte RNA samt Proteinen über das Pull-Down-Verfahren tatsächlich bis zum Ende aufgereinigt werden kann oder ob eventuell über die Waschschrte ein Verlust der RNA stattfindet. Um dies zu überprüfen, wurde der Pull-Down erneut durchgeführt und in jedem Zwischenschritt wurden Aliquots gesammelt und auf intakte RNA überprüft.

3.2 Optimierung der Bedingungen für die Bindung der Biotin-RNA im Pull-Down

3.2.1 Kontrolle der RNA im Pull-Down-Verfahren

Zur Kontrolle des Pull-Downs wurden Aliquots in Höhe von 10 % des Ausgangsvolumens gesammelt. Aus diesen Aliquots wurde anschließend die RNA mittels sauren Phenols aufgereinigt und auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die Aliquots wurde in jedem Zwischenschritt, beginnend vor der Bindung an die Beads, bis hin zum Ablösen der markierten RNA von den Beads, gesammelt. Die Bedeutung der folgenden Probenbezeichnungen ist in **Tabelle 1** dargestellt.

Tabelle 1: Erklärung der Probenbezeichnungen

Probenbezeichnung	Bedeutung
1	vor der Bindung an die Beads
2	direkt nach er Bindung an die Beads
3	nach dem ersten Waschschrift
4	nach dem zweiten Waschschrift
5	aus dem Überstand des Releases und
R	von den restlichen Beads

Für diesen Test wurde die RNA nicht in Zellen transfiziert, sondern mit Retikulozyten-Lysat aus Kaninchen inkubiert. Es wurde virale Wildtyp-RNA mit Biotin-UTP Markierung (links) und ohne Biotin-UTP-Markierung (Rechts, Mock) verwendet. Als Kontrolle wurde WT RNA aufgetragen. Die mittels Ethidiumbromid visualisierten Gelbilder sind in **Abb. 10** abgebildet.

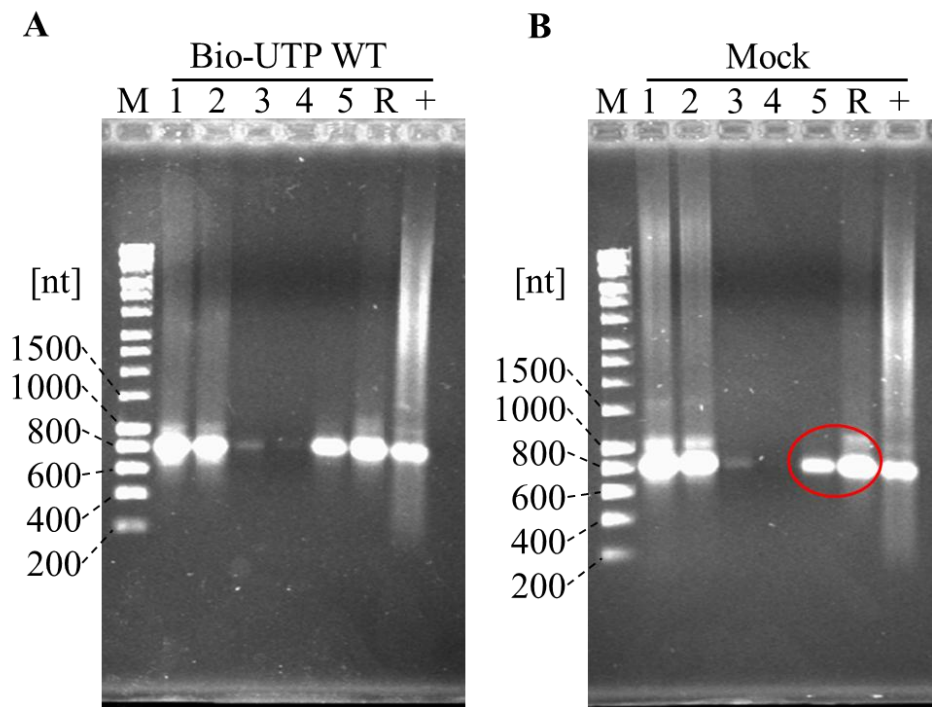


Abb. 10: Überprüfung der RNA während des Pull-Downs. RNA-Agarose-Gel mit 1 % Agarose und 0,12 % Natriumhypochlorit, gefärbt in Ethidiumbromid. Für die Auftrennung der RNA wurde eine Spannung von 90 V für 50 min angelegt. Virale Wildtyp-RNA (783 nt) wurde mit 1:30 Bio-UTP (A) und ohne Biotin (Mock, B) verwendet. Es wurden Aliquots aus dem laufenden Pull-Down-Verfahren aufgetragen, um die Funktionalität des Pull-Downs zu überprüfen. Die Aliquots wurden im gleichen Prozentsatz (10 %) des Ausgangsvolumens gesammelt. An folgenden Schritten wurden Aliquots für die Kontrolle gesammelt: (1) vor der Bindung an die Beads, (2) direkt nach der Bindung an die Beads, (3) nach dem ersten Waschschrift, (4) nach dem zweiten Waschschrift, (5) aus dem Überstand des Releases und (R) von den restlichen Beads. Als Kontrolle wurde die für den Versuch verwendete RNA (+) ebenfalls aufgetragen (400 ng).

Für beide Proben ist die Kontroll-RNA (+) in einer klaren Bande zwischen der 600 Nukleotid (nt) und der 800 nt Markerbande zu erkennen. Alle weiteren sichtbaren Banden befinden sich auf der gleichen Höhe und zeigen trotz unterschiedlicher Intensität keine Degradation. Probe 1 und 2 zeigen auf beiden Gelen eine starke Bande, welche direkt vor (1) und direkt nach (2) der Inkubation von RNA und Beads stammen. Diese Banden müssen zu sehen sein und zeigen, dass die RNA zu Versuchsbeginn sowie nach der Inkubation mit den Beads nicht degradiert ist. Im nächsten Schritt wurde nach den Waschschrift ebenfalls ein Aliquot gesammelt (3 & 4). Auf beiden Gelen ist zu sehen, dass nach dem ersten Waschschrift aus dem Waschpuffer noch eine geringe Menge RNA aufgereinigt werden konnte, nach dem zweiten Waschschrift aber so gut wie keine RNA mehr vorhanden war. Dies ist korrekt, da die zuvor freie RNA nun an die Beads gebunden sein sollte und nur RNA, welche sich nicht binden lässt, frei im Waschpuffer zu finden ist. Probe 5 zeigt im Gel mit der Biotin-RNA erneut eine klare Bande. Hierbei sollte es sich um

die zuvor an die Beads gebundene RNA handeln. Da die nachfolgende Bande in Spur R die RNA zeigt, welche nach dem Ablösen noch an den Beads verbleibt, wurden die Beads mit saurem Phenol aufgelöst und die RNA freigesetzt. Gleiches ist in der Probe ohne Biotin-Markierung zu erkennen.

Auf Grund dessen, dass die Banden nach dem Waschen verschwinden zeigt sich, dass freie, nicht an Beads gebundene RNA wie gewünscht entfernt werden kann. Unter Betrachtung, dass die auf das rechte Gel aufgetragene RNA keine Biotin-Markierung besitzt, sollte diese RNA nicht an die Beads binden und somit keine Banden für die abgelöste RNA (5) und die zurückgebliebenen Beads (R) zeigen (rot markiert im Gel). Dies führt zur Frage, woher diese RNA stammt, und vor allem, wie sie am Ende des Verfahrens aufgereinigt werden konnte. Da die unerwünscht an die Beads gebundene RNA dort wahrscheinlich unspezifisch bindet, wurde nachfolgend die Stringenz des Waschpuffers angepasst.

3.2.2 Die Zugabe von Detergenz im Waschpuffer verringert unspezifische Bindungen

Um die Stringenz des Waschpuffers zu testen, wurde dem Waschpuffer NP-40 in der finalen Konzentration 0,1 % und 0,01 % hinzugegeben. Die weiteren Bedingungen wurden zum vorherigen RNA-Gel nicht verändert. Der Test wurde mit der Wildtyp-RNA ohne Biotin-Markierung durchgeführt. Eine Verbesserung des Waschpuffers sollte durch das Fehlen einer Bande in Spur R erkennbar sein. Die Bedeutung der Probenbezeichnung ist erneut in **Tabelle 1** zu finden. Die Auswirkung der Zugabe von NP-40 ist in **Abb. 11** zu erkennen.

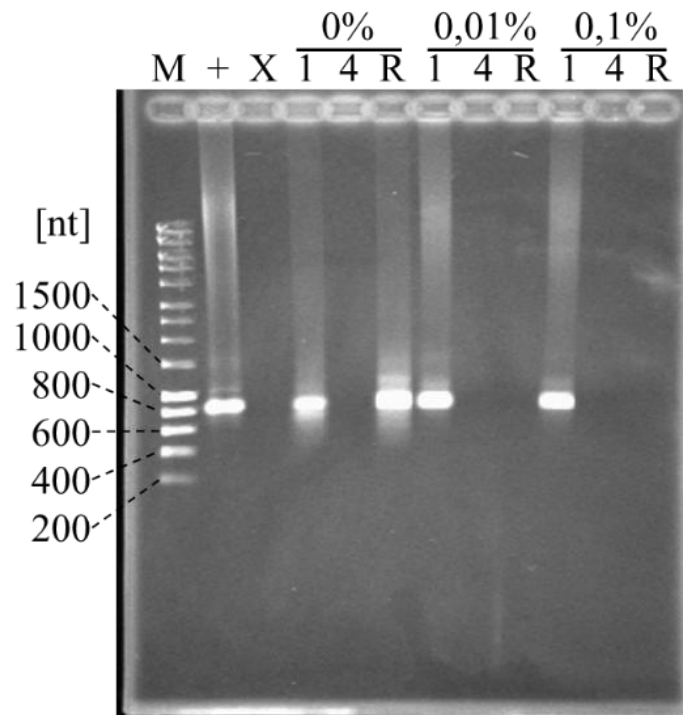


Abb. 11: Optimierung der Pull-Down-Aufreinigung. RNA-Agarose-Gel mit 1 % Agarose und 0,12 % Natriumhypochlorit, gefärbt in Ethidiumbromid. Für die Auftrennung der RNA wurde eine Spannung von 90 V für 50 min angelegt. Für diesen Test wurde virale Wildtyp-RNA im Pull-Down-Verfahren verwendet. In mehreren Schritten wurden Aliquots in Höhe von 10 % des Startvolumens entnommen und auf das Gel aufgetragen. Der Pull-Down wurde in drei Varianten durchgeführt, ohne Detergenz im Waschpuffer (0 %), mit 0,01 % NP40 im Waschpuffer (0,01 %) und mit 0,1 % NP40 im Waschpuffer (0,1 %). Als Ladekontrolle wurde die für den Versuch verwendete RNA (+) separat aufgetragen. Zwischen Kontrolle und Proben wurde eine Spur freigelassen (X). An folgenden Schritten wurden Aliquots für die Kontrolle gesammelt: (1) vor der Bindung an die Beads, (4) nach dem zweiten Waschschriff und (R) von den restlichen Beads. Als Kontrolle wurde die für den Versuch verwendete RNA (+) ebenfalls aufgetragen (400 ng).

Zur Kontrolle (+) wurde erneut die für den Versuch verwendete RNA geladen. Die Kontroll-RNA zeigt eine klare Bande zwischen der 800 nt und 600 nt Markerbande. Ebenso sind alle weiteren Banden scharf abgebildet, was dafür spricht, dass die RNA während des Versuchs nicht degradiert ist. Vergleicht man Spur 1, 4 und R aus **Abb. 10** (Mock, rechts) mit den Banden der Probe mit 0,0 % NP-40 (**Abb. 11**) lässt sich dasselbe Muster beobachten. Vor der Bindung an die

Beads (1) ist eine RNA-Bande erkennbar, welche nach dem zweiten Waschschrift (4) verschwindet. Wie zuvor lässt sich aber RNA von den übriggebliebenen Beads aufreinigen. Durch Zugabe von 0,1 % und 0,01 % NP-40 zum Waschpuffer verschwinden, wie gewünscht, die Banden in Spur R.

Die Zugabe des Detergenz sorgt dafür, dass Hintergrund-RNA von den Beads und gegebenenfalls auch von den Wänden des Reaktionsgefäßes entfernt wird. Da dies bereits bei der geringeren Konzentration von 0,01 % erfolgt, wird der Waschpuffer ab diesem Zeitpunkt mit 0,01 % NP-40 versetzt, zusätzlich wird ein vierter Waschschrift eingebaut und zwischen dem dritten und vierten Waschschrift wird das Reaktionsgefäß gewechselt. Neben der Reduzierung der Hintergrund-RNA bleibt aber noch die Frage offen, ob die mit Biotin-UTP markierte RNA stabil an die Streptavidin Beads bindet. Im Weiteren wird hierfür ein Streptavidin Shift durchgeführt.

3.2.3 Biotin markiertes UTP bindet nicht an die Beads

Um die Bindung zwischen biotinyliertem UTP und den Streptavidin-Beads zu überprüfen, wurden die vier RNA-Varianten (WT, 5'MT, 3'MT und 2xMT) jeweils einmal mit flüssigem (freiem löslichem, also nicht an Beads gebundenem) Streptavidin-Protein (+S) und einmal ohne Streptavidin (-S) inkubiert, bevor diese erneut auf ein Agarose-Gel geladen wurden. Bindet die markierte RNA das freie Streptavidin, so sollte man durch den RNA-Streptavidin-Komplex eine Bande deutlich oberhalb der Ursprungs-RNA erkennen. Als Kontrolle wurde zusätzlich Streptavidin ohne RNA (S) auf das Gel aufgetragen. Das visualisierte Gel ist in **Abb. 12** zu erkennen.

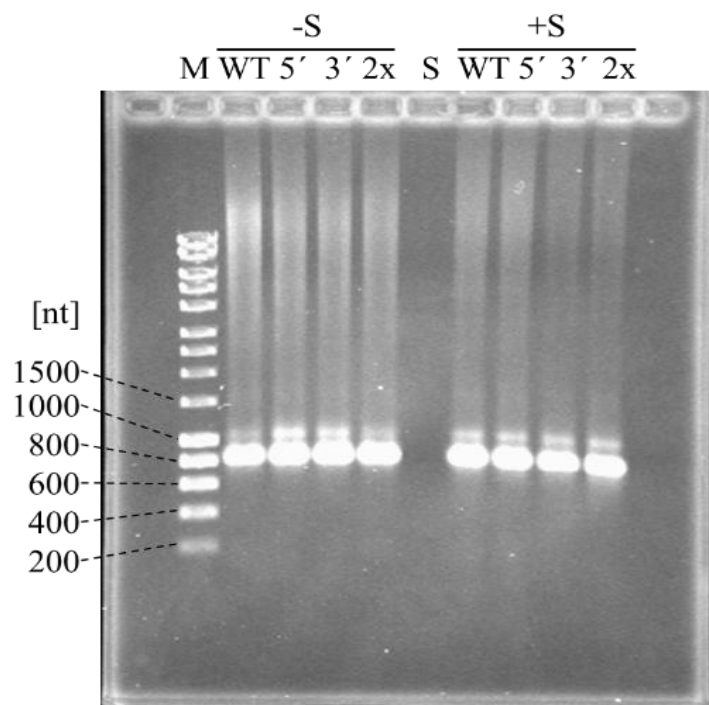


Abb. 12: Überprüfung der Biotinylierung mittels Streptavidin-Shift. RNA-Agarose-Gel mit 1 % Agarose und 0,12 % Natriumhypochlorit, gefärbt in Ethidiumbromid. Für die Auftrennung der RNA wurde eine Spannung von 90 V für 50 min angelegt. Aufgetragen wurden der Wildtyp (WT), die 5'-GBE-Mutante (5'), die 3'-GBE-Mutante (3') und die 5'-3'-GBE-Mutante (2x), welche vorab mit Streptavidin (+S) und ohne (-S) inkubiert wurden. Es wurden je 300 ng RNA mit 1,5 µg Streptavidin sowie 10 mM Tris pH 7,4, 2,5 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl 20 min auf Eis inkubiert. Als zusätzliche Kontrolle wurde das verwendete Streptavidin (S) auch einzeln geladen.

Für alle vier verschiedenen Klone ohne Streptavidin ist eine klare Bande, um die 800 nt Markerbande zu erkennen. In der Spur mit nur Streptavidin ist, wie erwünscht, nichts zu erkennen. Die RNA mit Zugabe von Streptavidin weist das gleiche Muster wie die Proben ohne Streptavidin auf. Erneut ist eine klare Bande auf der gleichen Höhe zu erkennen. Bei beiden Ansätzen ist zusätzlich noch eine Bande, welche wesentlich schwächer als die Hauptbande ist, zu erkennen.

Die leicht nach oben verschobenen Banden mit geringerer Intensität belegen keinen Streptavidin Shift, da sie auch bei den Proben ohne Streptavidin Zugabe zu erkennen sind. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um nicht vollständig denaturierte RNA. Da somit zwischen den Proben mit und ohne Streptavidin kein Unterschied zu erkennen ist, lässt sich die Hypothese belegen, dass Biotin-UTP-RNA und Streptavidin-Beads nicht aneinander binden. Zudem ist fraglich, inwieweit das UTP gebundene Biotin eventuell durch Sekundärstrukturen der RNA verdeckt wird. Um dies zu überprüfen und zu verbessern, wurde im nächsten Schritt eine neue Variante der Biotin-Markierung getestet.

3.2.4 Eine Markierung mit Biotin am 3'-Ende der RNA zeigt Erfolg

Für die Verbesserung der Biotin-Markierung wurde im Folgenden die Markierung mit einem einzigen Biotin am 3'-Ende der RNA getestet. Durch die Stärke der Biotin-Streptavidin Bindung sollte ein Biotinmolekül pro RNA definitiv ausreichend sein, um eine feste Bindung zu bilden (Willkomm & Hartmann, 2012). Hierfür wurde das Biotin chemisch an die letzte Base des 3'-Endes gebunden (Willkomm & Hartmann, 2012). Die Biotinylierung erfolgte nach dem in

6.3 RNA 3'-Biotinylierung und Streptavidin-Shift gelisteten Protokoll. Für diesen Test wurden erneut alle vier oben verwendeten RNAs in Duplikaten erst am 3'-Ende biotinyliert und anschließend mit Streptavidin inkubiert, bevor die RNA auf ein Agarosegel geladen wurde. Als Kontrolle diente markierte WT-RNA ohne Streptavidin. Das Gel zum Test der neuen Markierung ist in **Abb. 13** abgebildet.

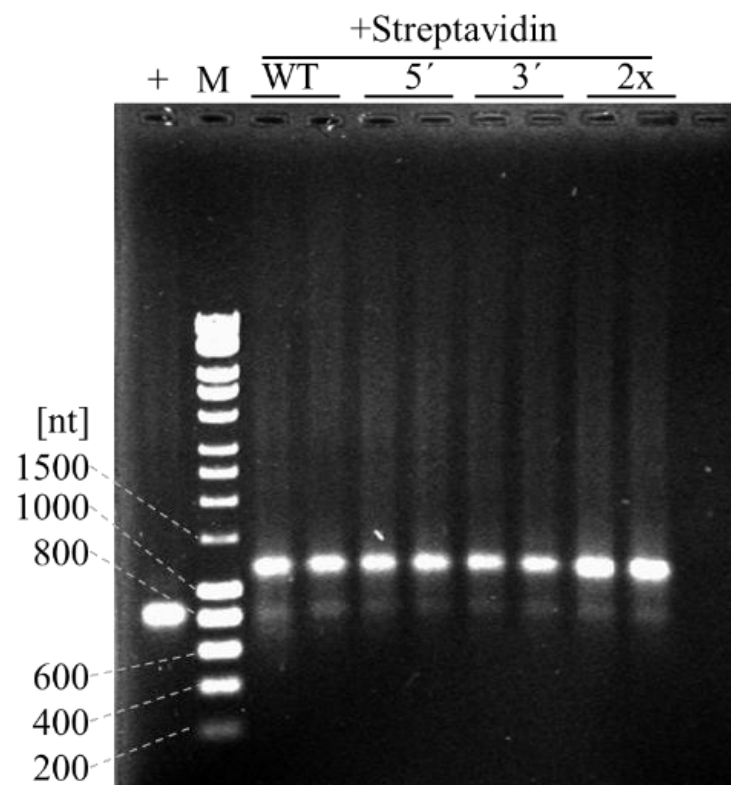


Abb. 13: Streptavidin-Shift mit 3'-Biotinmarkierung. RNA-Agarose-Gel mit 1 % Agarose und 0,12 % Natriumhypochlorit, gefärbt in Ethidiumbromid. Für die Auftrennung der RNA wurde eine Spannung von 90 V für 50 min angelegt. Für den Umstieg von Biotin-UTP (1:30) auf 3'-Biotin wurden Duplikate der viralen RNA mit Streptavidin inkubiert und aufgetragen. Es wurden je 300 ng RNA mit 1,5 µg Streptavidin sowie 10 mM Tris pH 7,4, 2,5 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl 20 min auf Eis inkubiert. Aufgetragen wurde RNA des Wildtyp (WT), der 5'-GBE-Mutante (5'), der 3'-GBE-Mutante (3') und der 5'-3'-GBE-Mutante (2x). Als Kontrolle für den Shift diente biotinylierte Wildtyp-RNA, welche nicht mit Streptavidin inkubiert wurde (+).

Die Kontroll-RNA zeigt die gewünschte Bande auf Höhe der 800 nt Markerbande. Zudem ist bei keiner der Proben eine Degradation zu erkennen. Die mit Streptavidin inkubierten RNAs zeigen untereinander ein identisches Bild. Auf Höhe der Kontrollbande findet sich eine sehr blasse, aber erkennbare RNA-Bande. Der Großteil der verwendeten RNA ist zwischen der 1000 nt und der 1500 nt Markerbande zu erkennen. Die verschobenen Banden weisen eine nahezu gleiche Intensität und Schärfe auf.

Durch den Versatz zur Kontroll-RNA und die Intensität der Banden auf 800 nt und >1000 nt Höhe lässt sich für die neue Biotin-Markierung eine funktionierende Bindung an Streptavidin bestätigen. Ebenso sprechen die gleiche Intensität und Schärfe zwischen den Klonen und Duplikaten dafür, dass die Markierung reproduzierbar funktioniert. Somit wurden Waschpuffer und Biotin-Streptavidin-Bindung im Pull-Down-Protokoll überarbeitet, und es folgte der erneute Versuch eines Western Blots mit dem verbesserten Pull-Down-Protokoll.

Fazit:

Durch den Zusatz von Detergenz im Waschpuffer, sowie den zusätzlichen Waschschrift mit Wechsel des Reaktionsgefäß, konnten Hintergrundbindungen der RNA an die Beads und das Reaktionsgefäß erfolgreich reduziert werden. Ebenso zeigte auch die Änderung der Markierung mit Biotin am 3'-Ende der RNA den erwünschten Erfolg.

3.3 Optimierung des Western Blot Verfahrens

Mit der funktionierenden Biotinylierung und dem optimierten Waschpuffer wurde im nächsten Schritt ein neuer Western Blot durchgeführt. Hierfür wurden je 750 ng RNA (~ 3 nmol) aller vier Klone jeweils mit 50 µl unbehandelten Retikulozyten-Lysat inkubiert und aufgereinigt. Zusätzlich wurde wegen des Größenunterschiedes der zu detektierenden Proteine (36 kDa bis 250 kDa) ein SDS-Gradienten-Gel (6 % bis 20 %) zur Auftrennung der Proteine des Lysates verwendet.

Für das Ablösen der an die viralen und 3'-biotinylierten RNA-Stücke gebundenen zellulären Proteine kamen zwei Strategien infrage. Eine verbreitete Methode ist die Inkubation der an die Streptavidin-Beads gekoppelten RNA-Protein-Komplexe mit SDS (zum Beispiel enthalten im Auftragspuffer für Proteingele). Dadurch werden die nicht-kovalent an die RNA gebundenen Proteine denaturiert und dadurch von der RNA der RNA-Protein-Komplexe und damit von den Beads abgelöst und können in das zur Analyse verwendete Gel einwandern. Die andere Methode (die von unseren Moskauer Kollegen erfolgreich verwendet wurde; (Andreev *et al.*, 2012)) ist die Inkubation der auf den Beads gebundenen RNA-Protein-Komplexe mit RNase A, die bewirkt, dass sich RNA-Stücke mit (nicht-kovalent) daran gebundenen Proteinen von den Beads lösen. Diese Methode hatte bei früheren Analysen den Vorteil, dass sich bei Abwesenheit von SDS im Elutionspuffer weniger Proteine von den Beads lösen, die dort unspezifisch gebunden waren (also nicht in RNA-Protein-Komplexen), wodurch der unspezifische Hintergrund reduziert werden sollte. Erst danach wird den Proben der SDS-haltiger Gel-Auftragspuffer zugesetzt. Daher wurde diese Methode zuerst für die Elution der nach dem Pull-Down in RNA-Protein-Komplexen gebundenen Proteine von den Beads verwendet.

3.3.1 Erster Western Blot mit verbessertem Pull-Down

Während des Western Blots wurde für eine zusätzliche Minimierung von unspezifischen Bindungen des Primärantikörpers an die Nitrozellulosemembran diese anhand des sichtbaren Markers mittig zwischen zwei erwarteten Proteinbanden durchgeschnitten. Die geschnittenen Membran-Stücke wurden anschließend nur mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert. Verwendet wurden Primärantikörper gegen eIF4G, GARS, PABP und GAPDH. Da die zu erwartenden Banden von zwei nachzuweisenden Proteinen (GARS und PABP) durch ihre sehr ähnliche Größe zu nah zusammen liegen, um sie durch das Zerschneiden der Membran zu trennen, wurden zwei Western Blots durchgeführt. Die in **Abb. 14** Teil **A** abgebildete Membran wurde mit Antikörpern gegen eIF4G (oben), PABP (Mitte) und GAPDH (unten) behandelt. Teil **B** zeigt die Membran mit den Antikörpern gegen eIF4G (oben), GARS (Mitte) und GAPDH (unten).

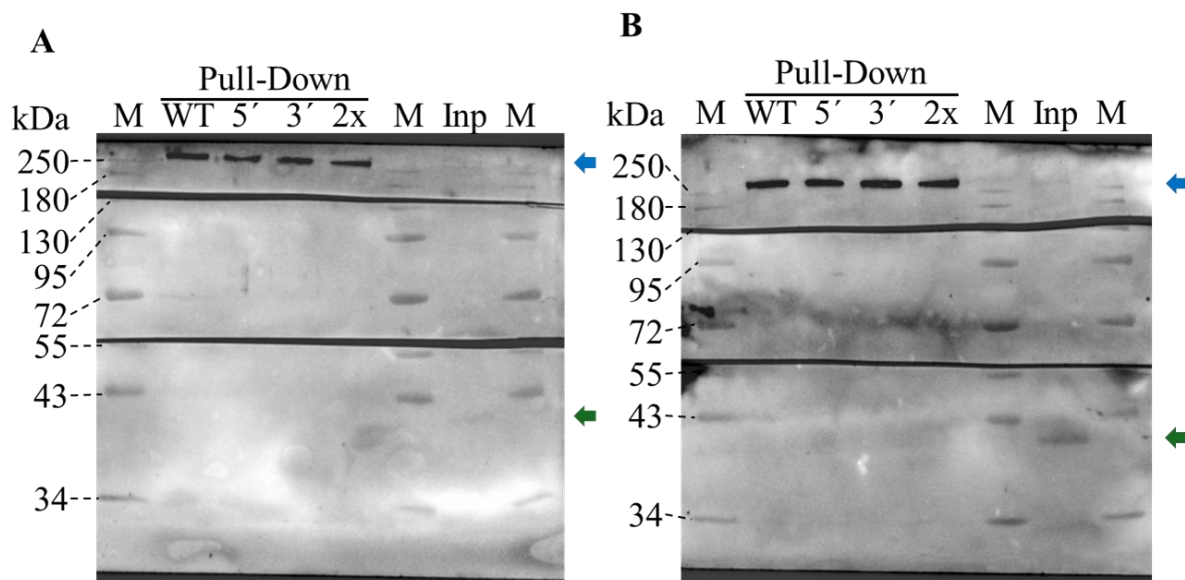


Abb. 14: Erster Western Blot mit verbessertem Pull-Down. Western Blot aus einem Pull-Down mit Sepharose-Beads. Die RNA mit der neuen 3'-Biotin-Markierung (750 ng) wurde mit Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (50 μ l) inkubiert, bevor sie an die Beads gebunden wurde. Die Proteine wurden mittels RNase A (250 μ g/ml) abgelöst und auf einem Gradienten-PAA Gel (6 bis 20 %) aufgetrennt. Aufgetragen wurden Wildtyp (WT), 5'-GBE-Mutante (5'), 3'-GBE-Mutante (3') und 5'-3'-GBE-Mutante (2x) und ein Marker (M). Als Ladekontrolle wurden ein Input (Inp) der Wildtyp Probe in Höhe von 5 % der Menge des Pull-Down-Materials geladen. Die Membranen wurden entsprechend der Größe der verwendeten Primärantikörper in separate Teile geschnitten und diese nur mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Verwendet wurden eIF4G, GARS, PABP und GAPDH. Da GARS und PABP eine ähnliche Größe besitzen, wurde das mittlere Membranstück von **A** mit PABP und das mittlere Stück von **B** mit GARS gefärbt. Die eIF4G Bande (250 kDa) ist mit einem blauen Pfeil markiert und die GAPDH Bande (36 kDa) mit dunkelgrün.

Auf beiden Membranen ist für alle 4 Klone eine kräftige und scharfe Bande auf dem mit eIF4G gefärbten Membranteil auf Höhe der 250 kDa Markerbande zu erkennen. Hierbei sollte es sich um das apparent 250 kDa große eIF4G handeln. Diese Bande ist jedoch nur im Pull-Down und nicht im Input zu erkennen. Des Weiteren sind auf beiden Membranen keine weiteren Banden im Pull-Down zu erkennen. Auch für den Input verhalten sich beide Membranen gleich. Wie bereits erwähnt ist hier auch keine Bande für eIF4G zu erkennen. Außerdem finden sich auch keine Banden auf den mit PABP (**A**) und GARS (**B**) behandelten Membranstücken. Nur für GAPDH ist auf **B** eine schwache und auf **A** eine sehr schwache Bande unterhalb der 43 kDa Markerbande zu erkennen.

Da der verwendete Antikörper und die beobachtete Größe der Pull-Down-Banden mit eIF4G übereinstimmen, lässt sich der Nachweis von eIF4G bestätigen. Dabei stellt sich allerdings die Frage, warum im Input keine eIF4G-Bande erkennbar ist. Für die im Pull-Down verwendete GAPDH Bande gilt gleiches wie für eIF4G. Für GAPDH ist im Pull-Down keine Bande zu erwarten, da GAPDH nicht an die Mengovirus-RNA binden sollte, und es ist auch keine Bande zu erkennen. Beide Beobachtungen, die fehlende eIF4G Bande im Input und die schwache GAPDH Bande, könnten dafür sprechen, dass zu wenig Material verwendet wurde.

3.3.2 Mehr RNA und mehr Zellen zeigen erste Erfolge

Um die Annahme zu überprüfen, dass nicht genügend Material geladen wurde, wurde der Versuch mit deutlich erhöhter RNA-Menge erneut durchgeführt. Zudem wurde die RNA, anstatt sie in Retikulozyten-Lysat zu inkubieren, in HeLa Zellen transfiziert, die eine erheblich komplexere Proteinausstattung haben als die hoch spezialisierten kernlosen Retikulozyten. Für den folgenden Western Blot wurden 30 µg RNA (~ 120 pmol) in 20 Mio. Zellen transfiziert, sodass sich sowohl erheblich mehr RNA als auch erheblich mehr Protein in der Reaktion befinden. Verwendet wurden RNA des WT und der 3'MT und Primärantikörper gegen eIF4G, GARS und GAPDH. Das Resultat des Western Blots ist in **Abb. 15** abgebildet.

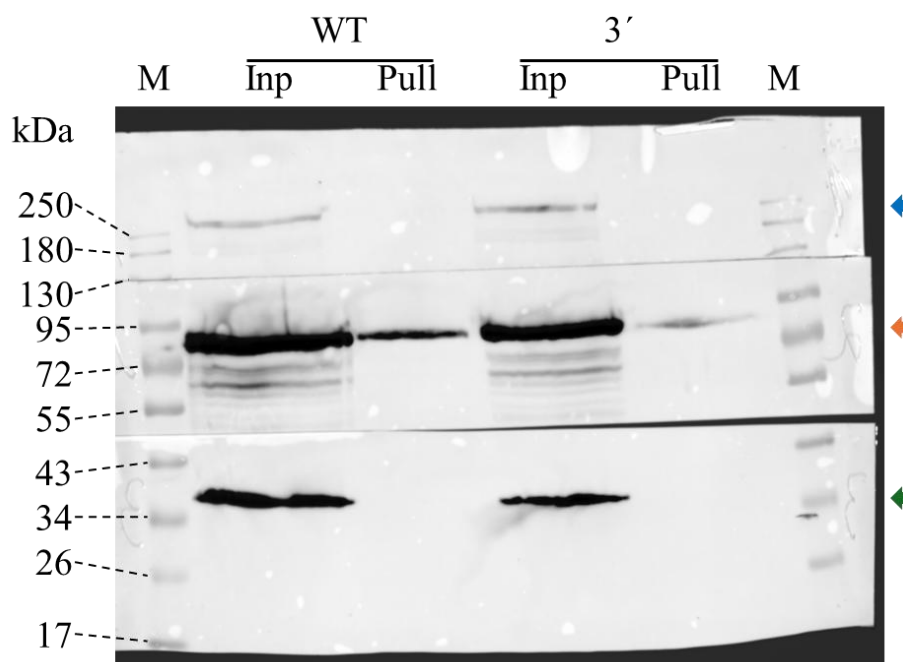


Abb. 15: Western Blot mit angepasster RNA- und Zellmenge. Western Blot aus einem Pull-Down mit Sepharose-Beads. Die RNA mit der neuen 3'-Biotin-Markierung (30 µg) wurde mittels Elektroporation in HeLa-Zellen (20 Millionen) transfiziert, bevor sie an die Beads (150 µl) gebunden wurde. Die Proteine wurden mittels RNase A (250 µg/ml) abgelöst und auf einem Gradienten-PAA-Gel (6 bis 20 %) mit vergrößerten Taschen aufgetrennt. Verwendet wurden der Wildtyp (WT) und die 3'-GBE-Mutante (3') mit einem Marker (M). Als Ladekontrolle wurden ein Input (Inp) mit der Menge von 5 % des Pull-Down-Materials (Pull) geladen. Die Membranen wurden entsprechend der Größe der verwendeten Primärantikörper in separate Teile geschnitten und nur mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Verwendet wurden eIF4G, GARS und GAPDH. Die eIF4G Bande (250 kDa) ist mit einem blauen Pfeil markiert, die GARS-Bande (83 kDa) ist mit einem orangen Pfeil markiert, und die GAPDH Bande (36 kDa) ist mit dunkelgrün markiert.

Zunächst ist allgemein festzustellen, dass jetzt im Input alle drei Banden (eIF4G, GARS und GAPDH) klar erkennbar sind. Dabei ist die Bande von GARS am stärksten. Dieser starke Unterschied zum Retikulozyten-Lysat ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass

HeLa-Zellen mehr GARS enthalten als Retikulozyten (Andreev *et al.*, 2012). Dabei ist jeweils die Bandenintensität zwischen dem Input des WT und der 3' MT nahezu gleich. Lediglich die GAPDH-Bande zwischen 34 kDa und 43 kDa ist im WT etwas stärker. Hierdurch lässt sich auf eine nahezu gleiche Ausgangsmenge des geladenen Materials rückschließen. Für beide RNAs ist im Input auf jedem Membranstück eine klare Bande zu erkennen. Im Pull-Down der WT-Probe ist eine starke und klare Bande (orangener Pfeil) auf dem mit GARS behandelten Membran-Stück zwischen 72 kDa und 95 kDa zu erkennen. Diese Bande ist auch für die 3' MT-Probe zu beobachten, hier aber etwas schwächer. In dem mit GARS-Antikörper behandelten Membranstück sind zudem im Input mehrere schwache Banden unterhalb der Hauptbande (**Abb. 15** orangener Pfeil) zu erkennen. Dies sind vermutlich Abbauprodukte des Proteins der starken Hauptbande. Weitere Banden sind im Pull-Down für beide Klone nicht zu erkennen.

Die zu erkennenden Banden entsprechen eIF4G (oben, blauer Pfeil), GARS (Mitte, orangener Pfeil) und GAPDH (unten, grüner Pfeil), da sie in dem für sie zu erwartenden Größenbereich erkennbar sind und da die entsprechenden Membranstücke nur mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert wurden. Es kann also festgestellt werden, dass die drastische Erhöhung der Mengen von RNA und Zelllysat den gewünschten Effekt zeigen, also den Nachweis der jeweiligen Proteine ermöglichen.

Da die Inputbanden zwischen dem WT und der 3' MT noch eine kleine Differenz aufweisen, wurden der Pull-Down und der Western Blot erneut wiederholt, um weitere Anpassungen im Pull-Down-Verfahren vorzunehmen. Um die Zeit des Protein-Release zu verkürzen, wurden im Folgenden eine Inkubation mit SDS anstatt RNase A getestet.

3.3.3 Änderung des Protein-Release

Hierzu wurde die Inkubation der Bead-gebundenen RNA-Protein-Komplexe mit 1 % SDS mit 100 mM NaCl für 10 Minuten und 15 Minuten für die Ablösung der Proteine von der viralen RNA getestet. Für den Test wurden je 13,3 µg 3'-biotinylierte RNA (53 pmol) mittels Elektroporation in je 6,6 Millionen Zellen transfiziert. Da sich die Proben lediglich in der Inkubationszeit unterschieden, wurden sie bis zum Release kombiniert verarbeitet. Auf Grund dessen wurde nur ein Input, der beide Inkubationszeiten widerspiegelt, angefertigt. Die RNA wurde an 150 µl Sepharose-Beads gebunden. **Abb. 16** zeigt das Ergebnis des veränderten Western Blots.

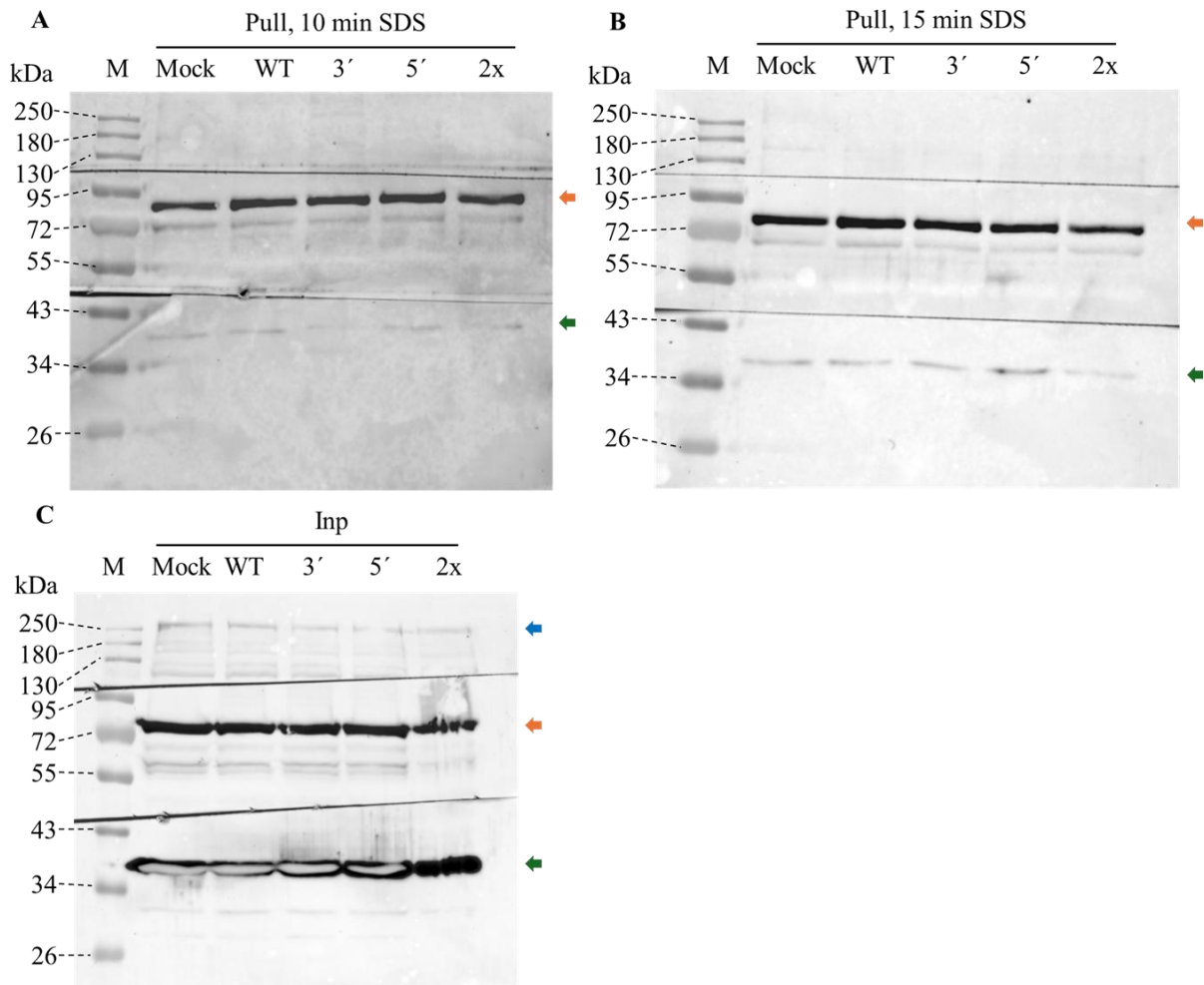


Abb. 16: Western Blot mit SDS als Release-Test. Western Blot zum Testen der Release Bedingungen. Für den Pull-Down wurde RNA mit 3'-Biotin-Markierung an Sepharose-Beads gebunden. Die RNA (13,3 μ g) wurde mittels Elektroporation in HeLa Zellen (6,6 Millionen) transfiziert, bevor sie an die Beads (150 μ l) gebunden wurde. Die Proteine wurden mittels 1 % SDS mit 100 mM NaCl abgelöst und auf einem Gradienten-PAA Gel (6 bis 20 %) aufgetrennt. Verwendet wurden der Wildtyp (WT), die 5'-GBE-Mutante (5'), die 3'-GBE-Mutante (3'), die 5'-3'-GBE-Mutante (2x), mit einem Marker (M) und zur Kontrolle eine Wildtyp RNA ohne Biotin-Markierung (Mock). Um SDS zu testen, wurden die Beads für 10 min (A) und 15 min (B) mit SDS inkubiert. Als Ladekontrolle wurde ein Input (C) in der Höhe von 5 % der Menge des Pull-Down-Materials geladen. Da sich nur die Inkubation des Release unterscheidet, wurden die Proben bis hierhin kombiniert behandelt, somit ergibt sich auch nur ein Input. Die Membranen wurden entsprechend der Größe der verwendeten Primärantikörper in separate Teile geschnitten und nur mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Verwendet wurden eIF4G, GARS und GAPDH. Die eIF4G Bande (250 kDa) ist mit einem blauen Pfeil markiert, die GARS-Bande (83 kDa) ist mit einem orangen Pfeil markiert, und die GAPDH Bande (36 kDa) ist mit dunkelgrün markiert.

Der Input in C zeigt für alle der verwendeten Antikörper entsprechende Banden auf der zu erwarteten Höhe. Neben den Hauptbanden, welche mit Pfeilen markiert sind, oben blau für eIF4G, in der Mitte orange für GARS und unten grün für GAPDH, sind weitere schwächere

Banden unterhalb der markierten Banden zu erkennen. Hierbei sollte es sich um Abbauprodukte der jeweils darüber laufenden Proteine handeln, die auch durch die jeweiligen Antikörper erkannt werden.

Die Intensität der verschiedenen Banden ist mit allen verwendeten RNAs sehr ähnlich. Somit lässt sich eine vergleichbare Ausgangsmenge aller RNAs bestätigen. Die Pull-Downs in **A** und **B** zeigen auf den ersten Blick ein ähnliches Bild. Für eIF4G sind in diesem Experiment keine Banden zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist die Bande für GARS bei beiden Inkubationszeiten stark und klar zu erkennen. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass die in **A** dargestellte Membran länger belichtet wurde als die in **B** dargestellte Membran. Die grün markierte GABDH-Bande ist in **B** zwar nur schwach zu erkennen, aber definitiv vorhanden, und in allen fünf Proben ähnlich stark vertreten. Die GAPDH-Banden aus den 10 min lang mit SDS eluierten Proben (**A**) ist nochmals um einiges schwächer als die aus der 15 min Elution. Bei der 3' MT ist die GAPDH-Bande nahezu nicht zu erkennen. Dennoch ist festzuhalten, dass für beide Inkubationszeiten in der untransfizierten Kontrolle (Mock) Banden für GARS und GAPDH erkennbar sind. Unterschiede in der Stärke der GARS-Banden zwischen den Proben mit verschiedenen RNAs sind allerdings nicht zu erkennen; erwartet wurde eine stärkere Bindung von GARS an die WT-RNA und eine schwächere Bindung an die Mutanten-RNA, mindestens die 3'-MT-RNA. Die schwache GAPDH-Bande in allen Pull-Downs, auch in der Mock-Kontrolle ohne 3'-biotinylierte Mengovirus-RNA, zeigt dagegen eine unspezifische Bindung dieses Proteins an die Beads. Zusammenfassend lässt sich aus diesem Versuch also sagen, dass ein Release mit SDS funktioniert, jedoch ist anhand der Mock-Banden beider Inkubationen zu erkennen, dass die detektierten Proteine offensichtlich überwiegend unspezifisch an die Beads binden.

Eine Gegenmaßnahme gegen die Ablösung unspezifisch an die Beads gebundener Proteine könnte einerseits eine Verkürzung der Elutionszeit sein. Um andererseits zusätzlich den Hintergrund durch unspezifische Bindungen zu minimieren, wurden die verwendeten Beads für weitere Versuche vor der Bindung geblockt. Mit diesen beiden Anpassungen wurde eine neue Transfektion mit anschließendem Pull-Down und Western Blot durchgeführt, um die Verwendung von SDS und RNase A für die Elution der Proteine von den Beads zu testen.

3.3.4 Blocken der Beads für weniger unspezifische Bindungen

Um das Protokoll weiter zu optimieren, wurde die Menge an verwendeter RNA und Zellen wieder erhöht und auf 20 µg (~ 80 pmol) RNA und 10 Mio. Zellen angepasst. Ebenfalls wurden die verwendeten Beads vor ihrer Verwendung im Pull-Down in einem Lysat aus tRNA, BSA und Glykogen für 3 h geblockt, um unspezifische Bindungen weiter zu reduzieren. Für das Freisetzen der Proteine vor der Auftrennung auf dem SDS-Gel wurden neben der Inkubation mit RNase A (30 min) wieder eine Inkubation mit 1 % SDS mit 100 mM NaCl getestet, die Elutionszeit dabei aber auf 3 min verkürzt (SDS), um die Elution unspezifisch an die Beads gebundener Proteine zu verringern. Neben den beiden mit Biotin markierten Proben wurde auch noch eine WT-RNA ohne 3'-Biotin-Markierung (Mock) verwendet. Das Ergebnis ist in **Abb. 17** zu erkennen.

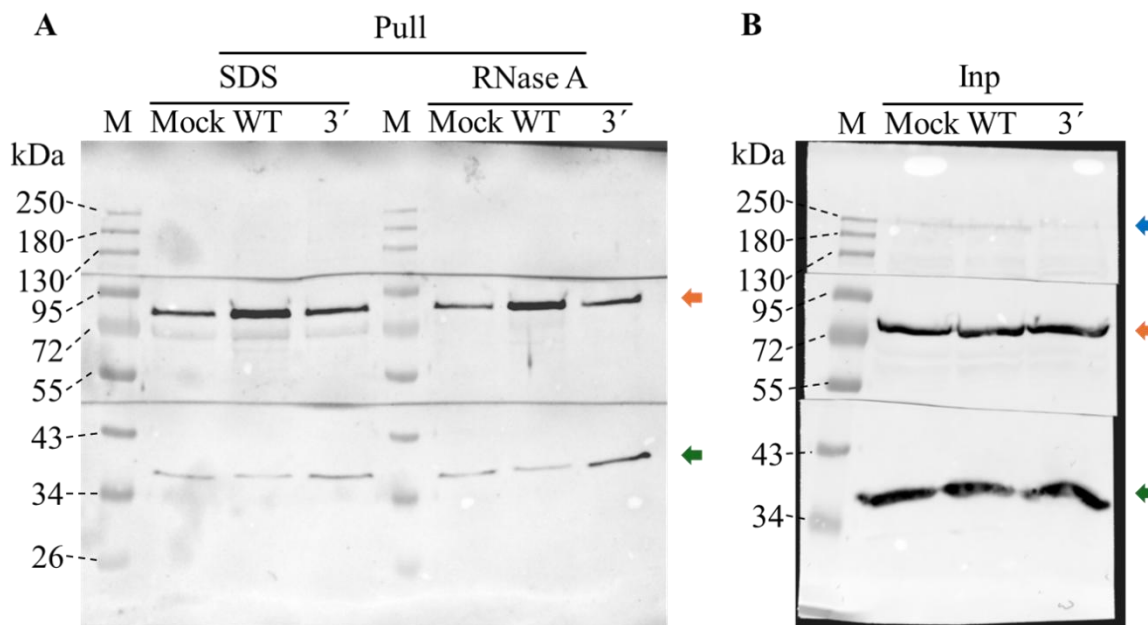


Abb. 17: Western Blot mit geblockten Beads und Release-Test. Western Blot aus einem Pull-Down (A) mit geblockten (3 h) Sepharose-Beads. Die RNA mit 3'-Biotin-Markierung (20 µg) wurde mittels Elektroporation in HeLa Zellen (10 Millionen) transfiziert, bevor sie an die Beads (150 µl) gebunden wurde. Die Proteine wurden mittels RNase A (250 µg/ml) (30 min) oder 1 % SDS mit 100 mM NaCl (3 min) abgelöst und auf einem Gradienten-PAA Gel (6 % bis 20 %) aufgetrennt. Verwendet wurden der Wildtyp (WT) und die 3'-GBE-Mutante (3') mit einem Marker (M) und zur Kontrolle eine Wildtyp-RNA ohne Biotin-Markierung (Mock). Als Ladekontrolle wurde ein Input (B) in Höhe von 5 % der Menge des Pull-Down-Materials geladen. Bis zum Release wurden die Proben für RNase und SDS in einem Gefäß aufgereinigt. Die Membranen wurden entsprechend der Größe der verwendeten Primärantikörper in separate Teile geschnitten und nur mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Verwendet wurden eIF4G, GARS und GAPDH. Die eIF4G Bande (250 kDa) ist mit einem blauen Pfeil markiert, die GARS-Bande (83 kDa) ist mit einem orangen Pfeil markiert, und die GAPDH Bande (36 kDa) ist mit dunkelgrün markiert.

Betrachtet man zunächst den Input (**B**), ist zu erkennen, dass für alle drei eingesetzten Antikörper eine Bande sichtbar ist. Diese Banden befinden sich auch auf der jeweils erwarteten Höhe der Proteine. Die Banden für GARS (Mitte, orange) und für GAPDH (unten, grün) sind klar abgegrenzt. Die eIF4G (oben, blau) Bande ist nur sehr schwach, aber in allen drei Proben gleich stark zu erkennen. Der Pull-Down (**A**) zeigt für alle geladenen Proben keine Banden im Bereich von eIF4G (oben), wohingegen klare Banden für GARS (Mitte, orange) und GAPDH (unten, grün) zu erkennen sind. Zwischen der Elution mit SDS und mit RNase sind nur geringe Unterschiede zu erkennen. Auf dem mit GARS inkubierten Stück zeigt sich zwischen Elution mit SDS und mit RNase ein ähnliches Bild, klare, scharfe und gut gesättigte Banden für alle drei Proben mit einer gleichen Intensität für Mock und die 3' MT, die Bande des WT ist dagegen intensiver. Somit gibt es in diesem Experiment zum ersten Mal den Hinweis darauf, dass GARS stärker an die WT-Mengovirus-RNA binden könnte als an die RNA der Mutante. Die mit SDS behandelten Proben zeigen in diesem Abschnitt zusätzlich schwache Banden unterhalb der GARS-Bande, die auf eine leichte Degradation von GARS hindeuten.

Auf dem mit dem GAPDH-Antikörper inkubierten Membranstück sind alle Banden recht schwach, aber scharf abgebildet, die Bande der mit RNase behandelten 3' MT ist deutlich stärker als die anderen Banden. Das Vorhandensein dieser GAPDH-Banden in den Pull-Downs deutet allerdings – ähnlich wie die GARS-Bande in der Mock-Probe – auf eine immer noch vorhandene unspezifische Bindung von Proteinen an die Beads hin.

Unter Betrachtung der Bandenstärke und -scharfe lässt sich das verwendete Verhältnis von 20 µg RNA (~ 80 pmol) und 10 Mio. Zellen als optimale Menge notieren. Um die Proteine während des Pull-Downs zu schonen, wurde von nun an SDS zum Freisetzen verwendet, da die Inkubationszeit für ein ähnliches Ergebnis von 30 min auf 3 min reduziert werden konnte.

Die schwachen im Pull-Down auftauchenden GAPDH-Banden sprechen allerdings wie erwähnt für unspezifische Bindungen an die Beads. Diese sollten eigentlich durch das Blocken der Beads minimiert werden, allerdings war im Experiment wegen der höheren RNA-Menge auch die Menge der eingesetzten Beads erhöht worden.

3.3.4 Verwendung von Beads mit hoher Bindeaffinität und -spezifität

Um den Einfluss der Beads im Pull-Down auf die unspezifische Bindung von Proteinen zu verbessern, wurden die Streptavidin-Beads durch NeutrAvidin-Beads ersetzt, da diese eine höhere Bindekapazität besitzen und dadurch einen geringeren Hintergrund relativ zur spezifischen Bindungskapazität aufweisen. Hierdurch konnte die verwendete Bead-Menge um 50 % reduziert werden. Das Blocken der Beads wurde von 3 h auf über Nacht ausgeweitet. Für diese neuen NeutrAvidin-Beads wurde der Unterschied zwischen SDS und RNase dann im Folgenden mit nochmals verkürzten Inkubationszeiten (2 min für die Elution mit SDS und 10 min für die Elution mit RNase) getestet. **Abb. 18** zeigt den Durchgeführten Western Blot.

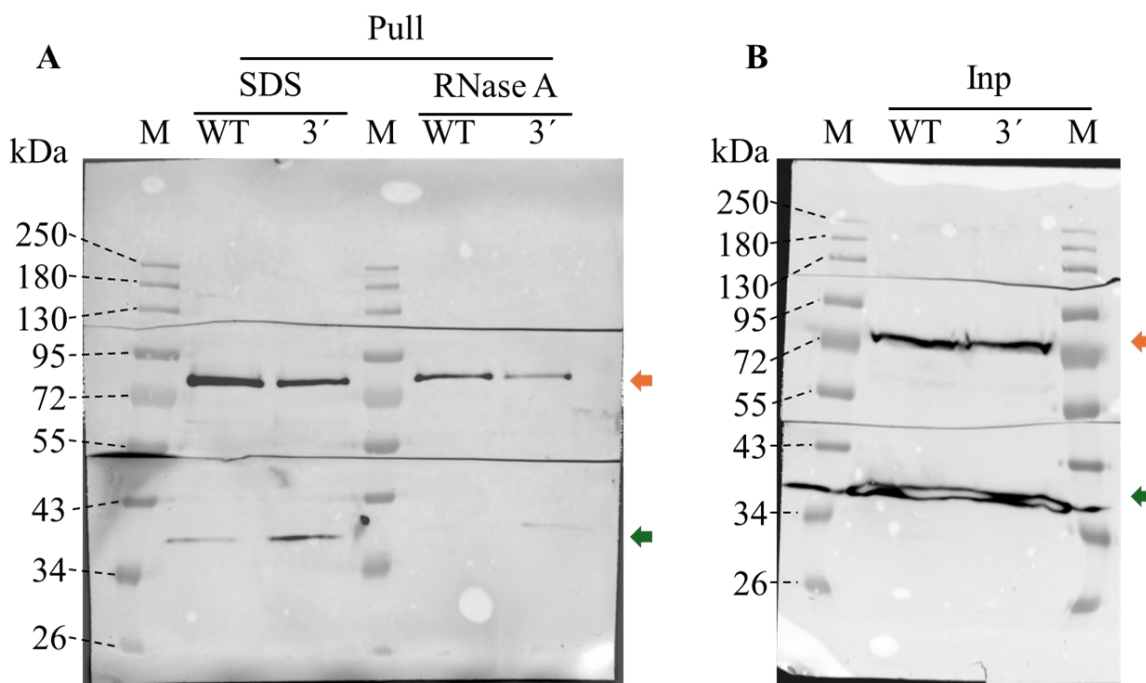


Abb. 18: Western Blot zur Optimierung des Protein-Release. Western Blot aus einem Pull-Down (A) mit geblockten (4 h, 4 °C) NeutrAvidin-Beads. Die RNA mit 3'-Biotin-Markierung (20 µg) wurde mittels Elektroporation in HeLa-Zellen (10 Millionen) transfiziert, bevor sie an die Beads (80 µl) gebunden wurde. Die Proteine wurden mittels RNase A (250 µg/ml, 10 min) oder 1 % SDS mit 100 mM NaCl (2 min) abgelöst und auf einem Gradienten-PAA Gel (6 bis 20 %) aufgetrennt. Verwendet wurden der Wildtyp (WT) und die 3'-GBE-Mutante (3') mit einem Marker (M). Als Ladekontrolle wurde ein Input (B) in Höhe von 2,5 % der Menge des Pull-Down-Materials geladen. Bis zum Release wurden die Proben für RNase und SDS in einem Gefäß aufgereinigt. Die Membranen wurden entsprechend der Größe der verwendeten Primärantikörper in separate Teile geschnitten und nur mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Verwendet wurden eIF4G, GARS und GAPDH. Die GARS-Bande (83 kDa) ist mit einem orangen Pfeil markiert, und die GAPDH Bande (36 kDa) ist mit dunkelgrün markiert.

Erneut betrachten wir zuerst den Input in **B**, um die gleiche Ausgangsmenge der Proben zu kontrollieren. Als Erstes fällt auf, dass für den WT und die 3'MT keine klaren Banden im Bereich von eIF4G (oben) erkennbar sind. Die GARS-Banden (Mitte, orange) zeigen eine sehr ähnliche Intensität, sind aber zwischen den Proben weniger scharf begrenzt als bei den vorherigen Western Blots zu erkennen, was tendenziell auf eine Überladung der Gele hinweist. Die GAPDH-Banden (unten, grün) erscheinen in ähnlicher Intensität, jedoch verlaufen die Banden miteinander. An der unteren Markerbande ist zu erkennen, dass das SDS-Gel im unteren Teil ungleichmäßig lief, wohl auch ein Effekt der Überladung. Im Pull-Down (**A**) ist diesmal ein klarer Unterschied zwischen SDS und RNase zu erkennen. Die mit SDS eluierten Banden sind intensiver, aber im Pull-Down ist erneut unspezifische Bindung von GAPDH bei WT und 3'MT zu erkennen. Die mit RNase behandelten Proben weisen die gleiche Verteilung zwischen WT und 3'MT wie die mit SDS behandelten auf, die GARS-Bande des mit SDS behandelten WT ist deutlich stärker als die der 3'MT.

Eine Verkürzung der Inkubationszeit mit SDS oder RNase sowie die Verwendung der neuen Beads zeigten also anhand der GAPDH-Banden im Pull-Down eine Verbesserung, da die unspezifischen Bindungen geringer wurden. Da die verkürzte Inkubation mit SDS kaum Unterschiede zur 1-minütig längeren Inkubation aus **Abb. 17** zeigt, wurde im Folgenden nochmals eine Verkürzung der Elutionszeit mit SDS auf 1 min getestet. Dies wurde durchgeführt, um zu zeigen, dass mit SDS noch deutlich kürzer als mit RNase inkubiert werden konnte. Ein letzter Feinschliff erfolgte zusätzlich an den Beads. Im Folgenden wurden High Capacity NeutrAvidin-Beads verwendet. Durch diese High Capacity Beads konnte die Menge der Beads ohne Verlust an Bindungskapazität nochmals um 60 % reduziert werden, um die unspezifische Bindung von Proteinen an die Bead-Matrix weiter zu verringern. Somit folgt mit dem nächsten Pull-Down und Western Blot der erste Versuch mit dem finalen und optimierten Protokoll.

Fazit:

Durch die detaillierte Fehlersuche konnte das Pull-Down und Western Blot Protokoll optimiert werden. Die Kombination aus geblockten Beads mit hoher Spezifität und Affinität und dem stark verkürzten Protein- Release zeigen in Kombination mit der angepassten Zell- und RNA-Menge vollen Erfolg. Zusätzlich konnten durch die Umstellung auf ein Gradientengel und die einzelne Antikörperinkubation der Membranstücke sauber getrennte und scharf visualisierte Proteinbanden beobachtet werden.

3.4 GARS bindet an die 3'-UTR des Mengovirus

Ziel dieser Versuche war der Nachweis der Bindung von GARS an die MV-RNA. Hierfür wurde virale Reporter-RNA mit WT-GARS-Bindestelle und eine Mutante mit veränderter GARS-Bindestelle verwendet. Die Veränderung der Bindestelle beruhte auf einem komplementären Austausch von vier Basen, wodurch die vermutete GARS-Bindung verloren ging, die RNA-Struktur aber erhalten blieb.

Dieser Versuch basierte auf einem Fund von D. Andreev, der in einem Luciferase-Assay zeigte, dass die Zugabe von rekombinant exprimiertem GARS-Protein zu PV-RNA eine erhöhte Luciferase-Intensität und damit eine vermehrte Translation von der Polivirus-IRES bewirkt. Zudem zeigen Andreev et al. über Deletionsmutanten des rekombinanten GARS, dass die Anticodon Binding Domain (ABD) von GARS für diesen positiven Effekt notwendig ist. Mithilfe von Massenspektrometrie (MassSpec) wird zusätzlich gezeigt, dass GARS mit der PV-IRES-Domäne V interagiert (Andreev *et al.*, 2012).

Eine bioinformatische Suche nach einem theoretischen GBE in Picornaviren wurde in Zusammenarbeit der AG Niepmann mit der AG Marz in Jena durchgeführt und ergab eine Vielzahl an GBE-Kandidaten, welche weit über die Familie der Picornaviren verteilt waren. Die folgenden Parameter wurden für diese Suche verwendet: ein kleiner Loop mit einem Stamm aus mindestens fünf Basen und einer Faltungsenergie von -10 kcal/mol oder niedriger, und ein Loop aus sechs Basen "NNNCCA". In diesen bioinformatischen Analysen wurde ein mögliches GARS Binding Element (GBE) unter anderem in der 3'-UTR des Mengovirus identifiziert (**Abb. 19**). Später wurde eine weitere bioinformatische Suche nach GBEs durchgeführt, bei denen nach GBE-Kandidaten mit einem Loop von sieben Nukleotiden ("NNNNCCA" oder NNNCCAN") gesucht wurde. Ein solches mögliches GBE wurde dann in der 5'-UTR des Mengovirus gefunden (**Abb. 19**). Diese Konstrukte sind die Grundlage für die oben gezeigten Optimierungs-Versuche und auch für die folgenden Experimente.

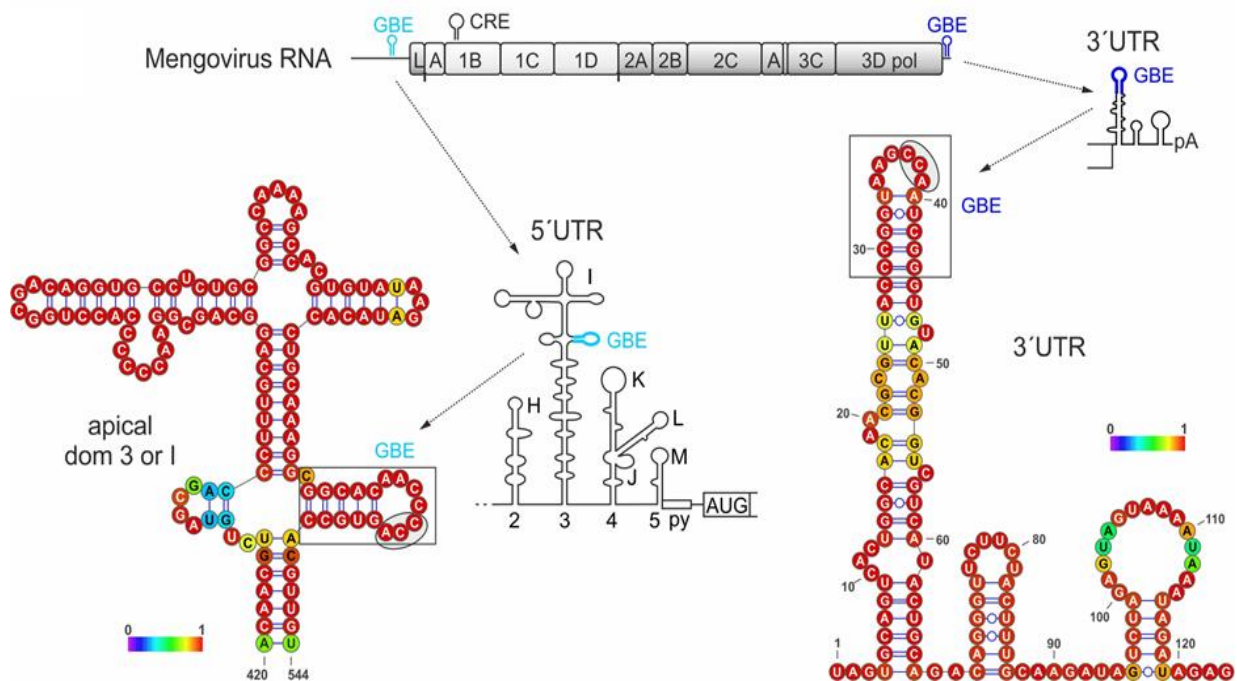


Abb. 19: Detaillierte Darstellung beider gefundenen Mengovirus GBEs. Oberhalb ist das Mengovirus Genom mit dem CRE und den beiden GBEs (hellblau/blau) abgebildet. Die einzelnen Genomabschnitte sind entsprechend beschriftet. Von den GBEs in 5'-UTR und 3'-UTR verweisen Pfeile auf eine vergrößerte schematische Darstellung beider UTR-Strukturen. Auch hier sind die GBEs in hellblau und blau markiert. Von den vergrößerten UTR-Strukturen verweisen erneut Pfeile auf eine Vergrößerung des jeweiligen Loops der entsprechenden GBEs. Hier sind die GBEs erneut farbig beschriftet, der gesamte Stem-Loop der GBEs ist mit einem Kasten markiert, und das CCA ist oval umrandet. Der Farbcode der Basen spiegelt die abgebildete Faltungswahrscheinlichkeit wider (in doppelsträngigen Bereichen die Wahrscheinlichkeit für Doppelstrang und in Einzelstrangbereichen die Wahrscheinlichkeit für Einzelstrang). Die Einteilung der Farbcodierung ist von 0 bis 1 (0 % bis 100 %) bei jeder Vergrößerung zu finden. Bereitgestellt von Michael Niepmann, Droß et al. unveröffentlicht.

3.4.1 GARS-Bindung an das 3'-GBE

Zur Durchführung wurden WT- und 3'MT-RNA mittels in vitro-Transkription erstellt, aufgereinigt und wie in

6.3 RNA 3'-Biotinylierung und Streptavidin-Shift beschrieben biotinyliert und auf erfolgreiche Biotinylierung kontrolliert. Die biotinylierte RNA wurde per Elektroporation in HeLa-Zellen transfiziert und inkubiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen geerntet und lysiert, und die biotinylierte virale RNA samt ihrer Bindungspartner wurde zur Aufreinigung an NeutrAvidin-Beads gebunden. Danach wurden die Bindungspartner der viralen RNA mittels SDS gelöst und sofort von den Beads und der noch daran gebundenen RNA separiert. Die aufgereinigten Bindungspartner der RNA wurden zur Visualisierung auf ein Gradienten-SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, aufgetrennt, geblottet und mittels Antikörper-Färbung visualisiert.

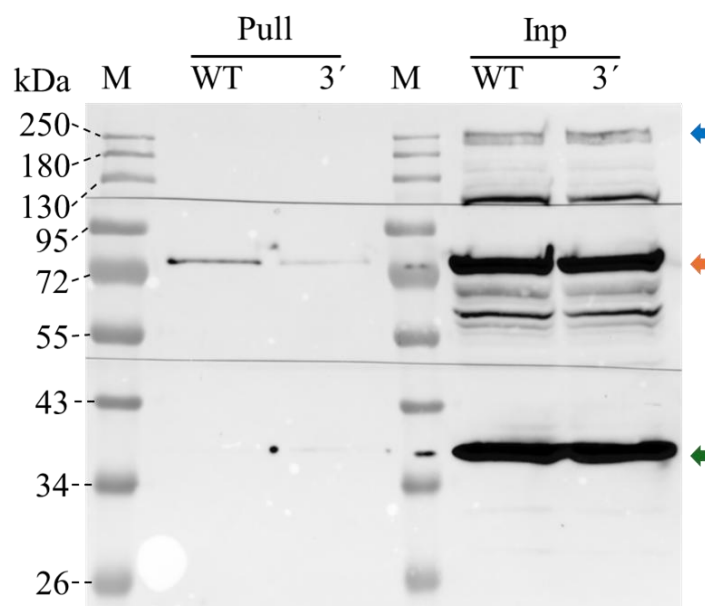


Abb. 20: Western Blot zur Bestätigung der Bindung von GARS an das Mengovirus 3'-GBE. Western Blot mit dem finalen Pull-Down Protokoll mit geblockten High Capacity NeutrAvidin-Beads (oN, 4 °C). Die RNA mit 3'-Biotin-Markierung (20 µg) wurde mittels Elektroporation in HeLa-Zellen (10 Millionen) transfiziert und nach der Zellyse an die Beads (30 µl) gebunden. Die Proteine wurden mittels 1 % SDS mit 100 mM NaCl (1 min) abgelöst und auf einem Gradienten-PAA Gel (6 bis 20 %) aufgetrennt. Verwendet wurden der Wildtyp (WT) und die 3'-GBE-Mutante (3') mit einem Marker (M). Als Ladekontrolle wurden ein Input (Inp) in Höhe von 2,5 % des Pull-Down-Materials geladen. Die Membranen wurden entsprechend der Größe der verwendeten Primärantikörper in separate Teile geschnitten und nur mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Verwendet wurden eIF4G, GARS und GAPDH. Die eIF4G Bande (250 kDa) ist mit einem blauen Pfeil markiert, die GARS-Bande (83 kDa) ist mit einem orangen Pfeil markiert, und die GAPDH Bande (36 kDa) ist mit dunkelgrün markiert.

Die Struktur der 3'-UTR des Mengovirus ist samt GBE (lila) nochmals in **Abb. 19** dargestellt. Das Western Blot-Ergebnis ist in der vorherigen **Abb. 20** dargestellt

Wir betrachten in gewohnter Weise erneut zunächst den Input. Die Hauptbanden der erkennbaren Proteine auf den jeweiligen Membranstücken sind mit Pfeilen, blau (oben) für eIF4G, orange (Mitte) für GARS und grün (unten) für GAPDH markiert. Diese markierten Hauptbanden entsprechen, anhand des Markers, der erwarteten Proteingröße. Zudem sind die Banden klar erkennbar und scharf. Lediglich die Banden für GAPDH sind leicht miteinander verbunden, zeigen aber im Vergleich die gleiche Intensität. Für GARS und eIF4G sind neben den Hauptbanden auch noch mehrere Banden unterhalb zu erkennen, bei welchen es sich um Abbauprodukte des entsprechenden Proteins handelt. Im Vergleich des WTs mit der 3'MT zeigt sich hier das gleiche Muster, es passen Anzahl, Höhe und Intensität aller Banden.

Der Pull-Down zeigt eine klare und scharfe, aber nicht sonderlich starke Bande auf dem mit dem GARS-Antikörper inkubierten Membranstück für den WT. Auch bei der 3'MT ist eine Bande für GARS zu erkennen, diese ist aber erheblich schwächer als die GARS-Bande des WT. Weitere Banden sind im Pull-Down für beide verwendete Klone nicht zu erkennen. Der Input ist deutlich stärker als der Pull-Down.

Im Anhang ist in **Abb. 40** ein weiteres Replikat mit ähnlichem Ergebnis dargestellt. Der Input dort zeigt eine ähnliche Ausgangsmenge von WT und 3'MT. Hier ist kein eIF4G zu erkennen, lediglich eine leichte Bande unterhalb der 130 kDa Markerbande. Hierbei sollte es sich im Vergleich mit dem Input aus **Abb. 20** um Abbauprodukte von eIF4G handeln. Der Pull-Down in **Abb. 40** im Anhang wurde erneut mit RNase A und SDS aufgereinigt und zeigt in beiden Fällen in der WT-Probe eine Bande für GARS, welche für die Probe, welche mit RNase A behandelt wurde, deutlich schwächer ist als die der SDS-Behandlung. Die 3'MT zeigt dort für beiden Behandlungen keine Banden.

Durch die gleiche Stärke der Inputbanden bei WT und der 3'MT lässt sich auf eine gleiche Ausgangsmenge an Lysat für den Pull-Down schließen. Zudem bestätigen die fehlenden GAPDH Banden im Pull-Down, dass die Optimierung des Verfahrens bezüglich der Minimierung von unspezifischer Hintergrund-Bindung anderer Proteine an die Beads erfolgreich verlief. Gleiches lässt sich zu der erneuten Verkürzung der SDS-Behandlung sagen, die offensichtlich in einer einzigen Minute Elutionszeit genügend Zeit lässt für das Abdissoziieren der in RNA-Protein-Komplexen mit der 3'-biotinylierten Mengovirus-Reporter-RNA gebundenen Proteine von der RNA, aber nicht genügend Zeit lässt für das Ausdiffundieren nennenswerter Mengen unspezifisch an die Beads gebundener Proteine (wie GAPDH). Die

schwächere GARS-Bande des 3' MT-Pull-Downs in diesem Experiment ist damit eine erste Bestätigung der tatsächlich spezifischen Bindung von GARS an das bioinformatisch gefundene GBE der 3'-UTR.

Für eine finale Optimierung der Experimente sollten Pull-Down und Input auf Grund ihrer unterschiedlichen Intensität auf verschiedene Gele und Membranen aufgetragen werden, um zu verhindern, dass starke Input-Signale bei der Exposition der Western Blots (die einen limitierten Dynamikbereich aufweist) zu einer falsch niedrigen Signalstärke auf den Membranen für den Pull-Down führt. Da eIF4G im Pull-Down nicht replizierbar detektierbar war, wurde als nächstes ein erneuter Western Blot mit Primärantikörper gegen DAP5, dem Homolog der proteolysierten Form von eIF4G durchgeführt (Gingras *et al.*, 1996).

3.4.2 Untersuchung des eIF4G Strukturhomologs DAP5

Wie zuvor wurde biotinylierte RNA des WT und der 3'MT mittels Elektroporation in HeLa-Zellen transfiziert und anschließend mit ihren Bindungspartnern aufgereinigt. Die RNA-gebundenen Proteine wurden mittels SDS von der RNA abgelöst und auf einem PAA-Gel aufgetrennt, geblottet und zur Visualisierung mit Antikörpern inkubiert. Aufgrund der Tatsache, dass nach der Inkubation mit dem Primärantikörper gegen eIF4G im finalen Protokoll keine Banden im Pull-Down mehr sichtbar waren, wurde zusätzlich ein Primärantikörper gegen das Strukturhomolog DAP5 verwendet. Ebenso wurde nun erneut versucht, eine PABP-Bande zu detektieren. Die Antikörper gegen GARS und GAPDH wurden unverändert weiterverwendet. Der Western Blot ist in **Abb. 21** zu sehen.

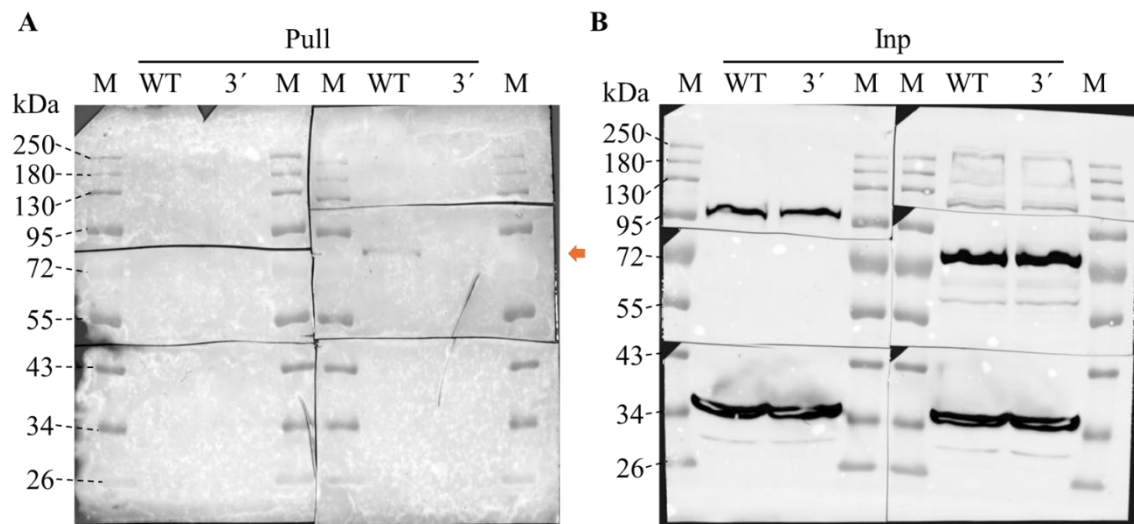


Abb. 21: Western Blot zur Bestätigung der Bindung von GARS an die Mengovirus 3'-GBE mit zusätzlicher Verwendung des DAP5-Antikörpers. Western Blot mit dem finalen Pull-Down-Protokoll mit geblockten High Capacity NeutrAvidin-Beads (oN, 4 °C). Die RNA mit 3'-Biotin-Markierung (20 µg) wurde mittels Elektroporation in HeLa-Zellen (10 Millionen) transfiziert, bevor sie an die Beads (30 µl) gebunden wurde. Die Proteine wurden mittels 1 % SDS mit 100 mM NaCl (1 min) abgelöst und auf einem Gradienten-PAA Gel (6 bis 20 %) aufgetrennt. Verwendet wurden der Wildtyp (WT) und die 3'-GBE-Mutante (3') mit einem Marker (M). Als Ladekontrolle wurde ein Input (Inp, **B**) in Höhe von 2,5 % der Menge des Pull-Down-Materials geladen. Die Membranen wurden entsprechend der Größe der verwendeten Primärantikörper in separate Teile geschnitten und nur mit dem entsprechenden primären Antikörper gefärbt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Verwendet wurden eIF4G, DAP5, GARS, PABP und GAPDH. Die eIF4G Bande (250 kDa) ist mit einem blauen Pfeil markiert, die DAP5-Bande (100 kDa) ist mit einem lila Pfeil markiert, die GARS-Bande (83 kDa) ist mit einem orangen Pfeil markiert, und die GAPDH Bande (36 kDa) ist mit dunkelgrün markiert.

Um die Vergleichbarkeit der Mengen der verwendeten RNAs zu überprüfen, wird zunächst der Input in **B** betrachtet. Zwischen den Banden des WT und der 3'MT sind keine Unterschiede in Dicke oder Intensität zu erkennen. Dies spricht für eine gute Vergleichbarkeit. Hier ist noch erwähnenswert, dass für nahezu alle verwendeten Primärantikörper Banden zu erkennen sind. Die entsprechenden Banden sind wie zuvor mit farbigen Pfeilen markiert. Blau (rechter Teil, oben) zeigt die Bande von eIF4G, Orange (Mitte) die GARS-Bande und Grün (unten) die Bande für GAPDH. Neu ist die lila Bande unterhalb von eIF4G (im oberen Teil des linken Blots in **B**), welche für DAP5 steht. Die Input Banden für DAP5, GARS und GAPDH haben eine ähnliche Intensität, welche um einiges stärker ist als die der eIF4G Banden. PABP konnte hier nicht detektiert werden (**Abb. 21 B**, linker Teil, mittlerer Abschnitt).

Im Vergleich zum Input erscheint der Pull-Down in **Abb. 21 A** in der Intensität eher schwach. Es ist nur eine einzige Bande beim WT zu erkennen, sie befindet sich auf dem mit GARS-Antikörper inkubierten Membranstück. Für die 3'MT und auf den anderen Membranstücken sind keine weiteren Banden zu erkennen. Zusammengefasst zeigt das Ergebnis des Western Blots in **Abb. 21** ein ähnliches Bild bezüglich des Nachweises der Bindung von GARS an das 3'-GBE wie die zuvor unter dem finalen Protokoll durchgeführten Blots, nämlich das GARS spezifisch an die WT-RNA, aber schwächer an die Mutanten-RNA bindet.

Der nächste Schritt war, das ebenfalls bioinformatisch gefundene mögliche GBE der 5'-UTR auf Bindung von GARS-Protein zu überprüfen. Hierfür wurde im nächsten Ansatz ein Western Blot mit den RNAs von allen vier Klonen durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen aus den zuvor durchgeführten Western Blots mit dem finalen Protokoll werden für die Proben mit allen vier Klonen nur Primärantikörper gegen eIF4G, GARS und GAPDH eingesetzt.

Fazit:

Die schwächere/fehlende GARS-Bande der 3'MT, im Vergleich zu der WT-Probe, weist auf eine Bindung von GARS an das 3'-GBE des Mengovirus hin. Zusätzlich ist mit den zuvor gezeigten Western Blot Bildern final der Erfolg des optimierten Versuchsprotokolls sichergestellt.

3.5 GARS bindet beide Mengovirus UTRs, aber unterschiedlich stark

Ziel dieses Versuches war die Untersuchung, ob GARS an das 5'-GBE des MV bindet, und ob es einen Unterschied in der Bindeintensität zwischen der 5'- und 3'-GBEs gibt.

Dazu wurde die virale Reporter-RNA in vier verschiedenen Varianten der GBEs verwendet (5'-3': WT-WT, MT-WT, WT-MT, MT-MT). Die Veränderung der Bindestelle basierte, wie zuvor, auf einem komplementären Austausch von vier Basen, wodurch die GARS-Bindestelle auf Sequenzebene verloren ging, die RNA-Struktur aber erhalten blieb.

Das Verfahren der RNA-Erstellung und Markierung, der Transfektion mittels Elektroporation, des Pull-Downs und der Western Blot-Analyse der Gelelektrophorese bis zur Visualisierung blieb identisch zu dem des 3'-MT Western Blot.

Das 5'-GBE wurde wie oben erwähnt durch eine erneute bioinformatische Suche in Zusammenarbeit der AG Niepmann mit der AG Marz identifiziert. Die ursprünglichen Parameter blieben bis auf die Basenzahl im Loop unverändert. In der neuen Suche wurde nach Loops mit einer Größe von sieben Basen "NNNCCAN" oder "NNNNCCA" gesucht. Auch diese Suche ergab erneut eine große Anzahl an Treffern, die über die verschiedensten Picornaviren verteilt waren. Für einen erneuten Überblick der Struktur der viralen UTRs und der Position der GBEs ist **Abb. 19** zu betrachten.

Wie gewohnt wird zuerst der Input (**Abb. 22 B**) der verwendeten Proben betrachtet, um eine gleiche Ausgangsmenge des Pull-Down-Materials zu bestätigen. Dies ist durch GARS (Mitte, orange) und GAPDH (unten, grün) erkennbar. Die Banden des jeweiligen Proteins sind in allen vier Klonen klar und scharf erkennbar. Zwischen den vier Klonen ist auch die gleiche Intensität der Banden zu erkennen. Jedoch ist in dem mit eIF4G gefärbten Bereich keine Bande zu erkennen.

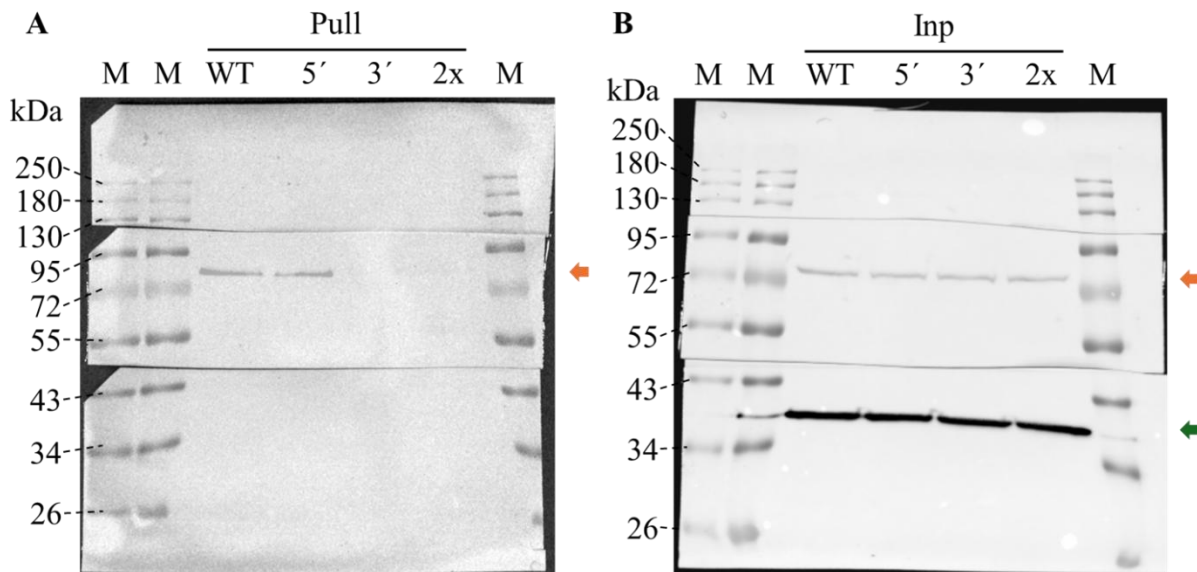


Abb. 22: Western Blot zur Bestätigung der Bindung von GARS an die Mengovirus 5'-GBE. Western Blot mit dem finalen Pull-Down-Protokoll (A) mit geblockten High Capacity NeutrAvidin-Beads (oN, 4 °C). Die RNA mit 3'-Biotin-Markierung (20 µg) wurde mittels Elektroporation in HeLa Zellen (10 Millionen) transfiziert, bevor sie an die Beads (30 µl) gebunden wurde. Die Proteine wurden mittels 1 % SDS mit 100 mM NaCl (1 min) abgelöst und auf einem Gradienten-PAA-Gel (6 bis 20 %) aufgetrennt. Verwendet wurden der Wildtyp (WT), 5'-GBE-Mutante (5'), 3'-GBE-Mutante (3') und 5'-3'-GBE-Mutante (2x) mit einem Marker (M). Als Ladekontrolle wurde ein Input (B) in Höhe von 2,5 % der Menge des Pull-Down-Materials geladen. Die Membranen wurden entsprechend der Größe der verwendeten Primäntikörper in separate Teile geschnitten und nur mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Verwendet wurden eIF4G, GARS und GAPDH. Die GARS-Bande (83 kDa) ist mit einem orangen Pfeil markiert, und die GAPDH Bande (36 kDa) ist mit dunkelgrün markiert.

Der Pull-Down in **Abb. 22 A** zeigt wie gewünscht für keinen der verwendeten Klone eine Bande im Bereich von GAPDH und zeigt damit, dass die Bindung bzw. Elution unspezifisch an die Beads bindender Proteine minimiert wurde. Die WT-Probe zeigt eine GARS-Bande, welche klar erkennbar ist. In der 5'MT (also der RNA mit einer mutierten GARS-Bindungsstelle in der Mengovirus 5'-UTR, aber einer intakten Bindungsstelle in der 3'-UTR) ist ebenfalls eine Bande für GARS zu erkennen, diese ist bei genauer Betrachtung etwas schwächer als die Bande des WT. Für die 3'MT und die Doppelmutante (2xMT) sind im Pull-Down keine Banden zu erkennen. Für eIF4G ist in keiner der Proben eine Bande zu erkennen.

Ein weiteres Replikat dieses Versuches ist im Anhang in **Abb. 41** abgebildet. Auch dort zeigt der Input eine gleiche Verteilung der Ausgangsmenge der verwendeten Proben. Alle drei verwendeten Antikörper zeigen zudem eine Bande auf der gewünschten Größe. Die Banden für eIF4G (blau) sind zwar schwach, aber dennoch klar und gleichmäßig verteilt. Anhand der GARS (orange) Bande lässt sich die gleiche Verteilung des Ausgangsmaterials am besten beobachten.

Die Banden sind scharf, voneinander getrennt und in guter Stärke erkennbar. Für GAPDH (grün) sind die Banden ein wenig zusammengelaufen, was auf die hohe Intensität der Banden zurückzuführen ist. Dennoch ist erkennbar, dass die Intensität der Banden zwischen den vier Klonen gleich verteilt ist. Für den mit eIF4G behandelten Membranteil sind schwache Banden oberhalb der 250 kDa Markerbande und minimal unterhalb der 180 kDa Markerbande zu erkennen. Dies gilt jedoch nur für den WT und die 5'MT. Eine Bande auf der passenden Höhe für eIF4G (250 kDa) ist in keinem der Klone zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist bei allen Klonen eine passende Bande für GARS zu sehen. Die Banden sind klar erkennbar, variieren aber zwischen den Klonen in ihrer Intensität. Die 5'MT zeigt die intensivsten Banden auf, dicht gefolgt von dem WT. Die Bande der 3'MT ist nur noch schwach und die Bande der 2xMT ist kaum noch zu erkennen.

Wie in **Abb. 20** ist auch in **Abb. 41** im Pull-Down eine deutlich geringerer Bandenstärke der 3'MT im Vergleich zum WT zu erkennen. Ähnliches gilt für die 2xMT. Diese zeigt sogar eine noch etwas schwächere Bande als die 3'MT. Im Gegensatz dazu steht die 5'MT, welche in beiden Western Blots (**Abb. 22 & Abb. 41**) eine deutliche Bande zeigt. Dies könnte suggerieren, dass trotz Mutation der 5'-GBE eine effizientere GARS-Bindung stattfindet; dies wird im Folgenden mit Konstrukten, welche ausschließlich aus 5'-UTR (WT/MT) oder 3'-UTR (WT/MT) bestehen, überprüft. Anhand dieser bisherigen Ergebnisse lässt sich die Hypothese aufstellen, dass das 3'-GBE GARS deutlich effizienter als das 5'-GBE bindet.

3.6 GARS bindet ebenfalls in Verwandten des Mengovirus - TMEV

Um die vermutete unterschiedliche Stärke der Bindung von GARS an das GBE in der 5'-UTR und das in der 3'-UTR des Mengovirus zu überprüfen, wurde ein weiterer Western Blot mit dem bekannten Protokoll durchgeführt. Zusätzlich wurde die bioinformatische Suche nach GBEs in einem nahen Verwandten des Mengovirus (Cardiovirus A), dem Theiler's Murine Encephalitis Virus (TMEV, GBE in der 3'-UTR) (Cardiovirus B), fortgesetzt und damit die Hypothese der GARS-Bindung an das 3'-GBE gestützt. Hierfür wurden RNA-Konstrukte (**Abb. 23**), die nur aus der 5'-UTR (MV, **A**) oder 3'-UTR (MV, **B** & TMEV, **C**) bestehen, verwendet.



Abb. 23: Schematische Darstellung der UTR-Sekundärstrukturen der verwendeten UTR-Konstrukte. Die UTRs samt GBE des MV (**A** & **B**) und des TMEV (**C**), auf welchen die UTR-Konstrukte beruhen, sind abgebildet. **A** zeigt den Ausschnitt aus der 5'-UTR des MV (Domäne I) mit markierter GBE (hellblau), auf dem das UTR-Konstrukt der MV-5'-GBE basiert. **B** zeigt die 3'-UTR des MV mit GBE (blau) ohne Poly(A), auf dem das MV-3'-GBE-Konstrukt basiert. **C** zeigt die 3'-UTR des TMEV mit GBE (blau), auf dem das entsprechende TMEV-UTR-Konstrukt basiert. Bereitgestellt von Michael Niepmann, Droß et al. unveröffentlicht.

Jedes UTR-Konstrukt wurde als GBE-WT und GBE-MT verwendet. Die Änderungen in der mutierten GBE waren identisch zu den zuvor verwendeten GBE-Mutanten. Nach bekanntem Pull-Down-Protokoll wurden 80 pmol biotinylierte RNA mittels Elektroporation in 10 Millionen HeLa Zellen transfiziert, inkubiert, lysiert, an Beads gebunden und aufgereinigt. Die eluierten Proteine wurden mittels SDS-Gradientengel (6 % bis 12 %) aufgetrennt und wie zuvor mittels Western Blot visualisiert. Hier wurden verschiedene Inkubationszeiten bei dem Western Blot Verfahren für verschiedene Bandenstärken gewählt. Der folgend dargestellte Western Blot (**Abb. 24**) wurde über Nacht bei 4 °C geblockt und 1,5 h bei Raumtemperatur mit den Primärantikörpern inkubiert. Im Anhang ist ein weiterer Western Blot (**Abb. 42**) zu finden, welcher 2 h bei Raumtemperatur geblockt und über Nacht bei 4 °C mit den Primärantikörpern inkubiert wurde.

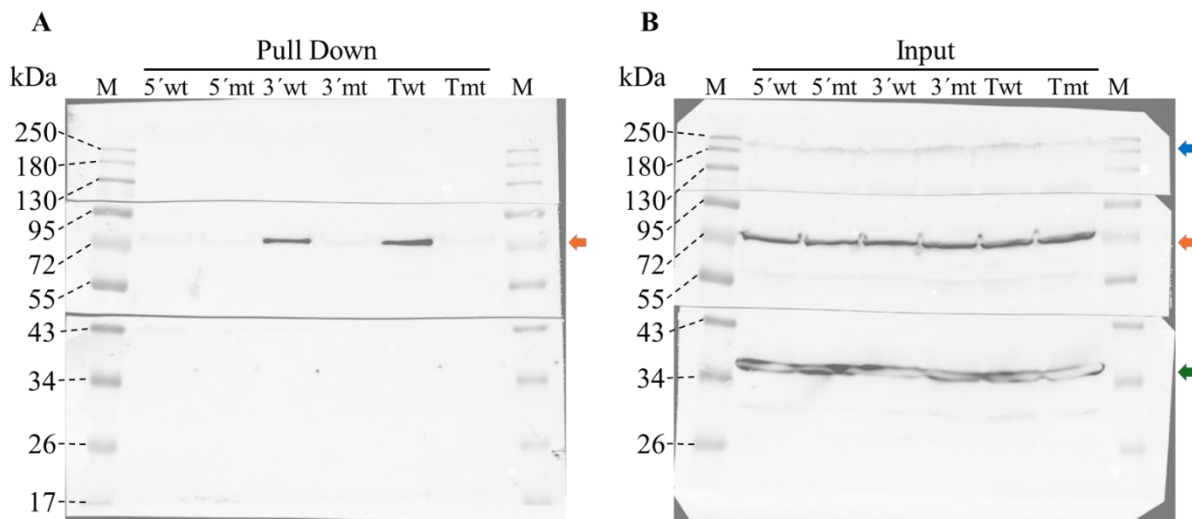


Abb. 24: Bindungsintensität der einzelnen MV UTRs und Bindungsnachweis eines nahen Verwandten des MV, dem TMEV. Western Blot (A) mit dem finalen Pull-Down-Protokoll mit geblockten High Capacity NeutrAvidin-Beads (oN, 4 °C). Die RNA mit 3'-Biotin-Markierung (80 pmol) wurde mittels Elektroporation in HeLa Zellen (10 Millionen) transfiziert, bevor sie an die Beads (30 µl) gebunden wurde. Die Proteine wurden mittels 1 % SDS mit 100 mM NaCl (1 min) abgelöst und auf einem Gradienten-PAA Gel (6 bis 20 %) aufgetrennt. Verwendet wurden Konstrukte bestehend aus den UTRs mit GBE von Mengovirus und Theiler murine Virus (TMEV = T) in GBE WT und GBE MT Varianten. Dem entsprechend wurden die MV-5'-UTR-GBE-WT/MT (5'wt/5'mt), die MV-3'-UTR-GBE-WT/MT (3'wt/3'mt) und die TMEV-3'-UTR-GBE-WT/MT (Twt/Tmt) mit einem Marker (M) verwendet. Als Ladekontrolle wurde ein Input (B) in Höhe von 2,5 % der Menge des Pull-Down-Materials geladen. Die Membranen wurden entsprechend der Größe der verwendeten Primärantikörper in separate Teile geschnitten und nur mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Diese Membran wurde über Nacht geblockt und 1,5 h mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Verwendet wurden eIF4G, GARS und GAPDH. Die eIF4G Bande (250 kDa) ist mit einem blauen Pfeil markiert, die GARS-Bande (83 kDa) ist mit einem orangenen Pfeil markiert, und die GAPDH Bande (36 kDa) ist in dunkelgrün markiert.

Der Input beider Replikate (**Abb. 24 B & Abb. 42 B**) zeigt eine gleiche Verteilung der Startmenge aller sechs verwendeten Lysat-Proben. Dies ist am besten an den mit orangenem Pfeil markierten GARS-Banden zu erkennen. Sie weisen auf beiden Membranen zwischen den geladenen Proben eine gleiche Bandenstärke auf. Ähnliches lässt sich zu den mit grünem Pfeil markierten GAPDH-Banden sagen, welche jedoch so stark sind, dass sie teilweise durch die Überexposition bei der Detektion der Chemilumineszenz weiß dargestellt werden. Dies ist ein klassisches Phänomen bei zu starker Visualisierung durch beispielsweise zu viel Material, zu viel Antikörper oder zu langer Inkubation. Gestützt wird die Aussage durch **Abb. 43**, in der in Teil A eine Aufnahme ohne Chemilumineszenz des Input aus **Abb. 42 B** und in Teil B eine digitale Aufnahme eines weiteren Replikates dieser Versuchsreihe zu sehen ist. Hier sind die GAPDH Banden bereits mit bloßem Auge erkennbar. Zwischen den Pull-Down-Abbildungen (**Abb. 24 A**

& Abb. 42 A) bestehen, wie oben beschrieben, Unterschiede in den Inkubationszeiten von Blocklösung und Primärantikörper. Bei längerem Blocken, aber kürzerer Inkubation mit Primärantikörper (**Abb. 24 A**) sind insgesamt nur zwei Banden erkennbar. Diese sind jedoch stark ausgeprägt und klar zu erkennen. Bei beiden Banden handelt es sich um GARS-Banden (oranger Pfeil) des Mengovirus-3'-UTR-GBE-WT (3'wt) und des TMEV-GBE-WT (Twt). Beide GARS-Banden zeigen eine ähnliche Intensität. Eine GARS-Bande für die GBE der Mengovirus 5'-UTR (5'wt) ist in dieser Abbildung nicht zu erkennen. Im Pull-Down der Membran mit kürzerem Blocken, aber längerer Primärantikörper Inkubation (**Abb. 42 A**) sind für alle Proben GARS-Banden zu erkennen. Auch hier sind die Banden des MV-3'-WT und des TMEV-WT die stärksten Banden, wobei die Bande des TMEV-WT etwas stärker als die der MV-3'-WT scheint. Die restlichen GARS-Banden sind im Vergleich eher schwach, aber untereinander mit einer gleichen Intensität zu erkennen. Dieses Ergebnis und die Tatsache, dass für alle sechs Proben ein Schimmer einer GAPDH-Bande zu erkennen ist, spricht für eine Reduktion der Spezifität der Bindung der Antikörper, vermutlich bedingt durch die Kombination von kürzerer Block-Zeit und zu langer Inkubation mit dem Primärantikörper.

Fazit:

Somit bestätigt dieser Versuch die Vermutung, dass ein Unterschied in der Bindestärke der MV 3'-GBE im Vergleich zur 5'-GBE existiert. Das GARS Binding Element in der Mengovirus 3'-UTR bindet das GARS-Protein deutlich stärker als das GBE in der MV 5'-UTR. Ebenso wird das Ergebnis der bioinformatischen Suche der GBEs durch die GARS-Banden des TMEV-WT untermauert.

Für eine sensitivere Analyse der Bindungspartner der viralen RNA wurde im nächsten Schritt eine massenspektrometrische Analyse der für die Western Blots aus **Abb. 22** (und der Replikate) verwendeten Proben durchgeführt. Dies soll zum Einen einen besseren Überblick über die Abundanz der Bindungspartner liefern und eventuelle Unterschiede der gebundenen Proteine zeigen, zum Anderen sollen möglicherweise andere an die jeweiligen RNAs bindende Proteine detektiert werden.

3.7 Die Mutation der GARS-Bindungsstelle beeinflusst die Bindung weiterer Proteine an die UTR

Ziel der Massenspektrometrie war die Analyse der verschiedenen Bindungspartner der viralen RNA, insbesondere im Hinblick auf Unterschiede in der Abundanz zwischen den verschiedenen Mutanten der viralen GBE. Dieser Versuch wurde gewählt, da er im Vergleich zu einem Western Blot eine höhere Sensitivität und eine größere Bandbreite an detektierbaren Bindungspartnern bietet.

Für die Massenspektrometrie (im Laborjargon aus dem Englischen abgekürzt "MassSpec") wurden alle vier Varianten der viralen RNA wie im vorherigen Experiment (**Abb. 22** und Replikate) verwendet. Die Probenaufbereitung lief identisch bis zu dem Punkt der abgelösten und aufgereinigten RNA-Bindungspartner. Anstelle der Gelelektrophorese und Antikörper-Färbung wurden die Proben an die AG von Dr. Uwe Linne für die Massenspektrometrie übergeben. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte in der AG von Prof. Michael Kracht in Gießen. Die Beschreibung der Ergebnisse umfasst an dieser Stelle aufgrund der noch nicht fertiggestellten bioinformatischen Analyse nur die bis zum Zeitpunkt der Arbeit vorliegenden Daten. Dabei handelt es sich um Daten zum WT und der 3'MT. Die analysierten Daten sind in **Abb. 25** als Violinplots dargestellt.

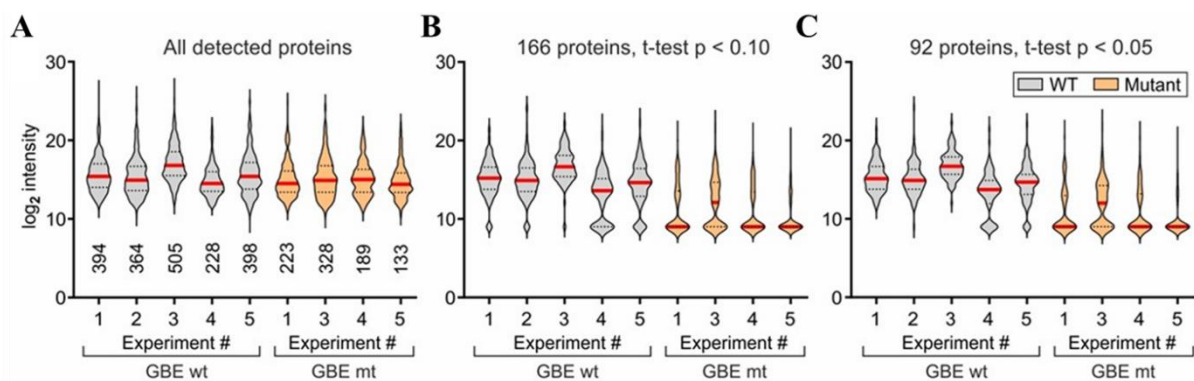


Abb. 25: Die Mutation der GBE beeinträchtigt die Interaktion der RNA mit Proteinen. Virale Reporter-RNA mit 3'-Biotin-Markierung wurde als Wildtyp und 3'-MT mittels Elektroporation in HeLa Zellen transfiziert. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert, die biotinylierte RNA an High Capacity NeutrAvidin-Beads gebunden und aufgereinigt. Die RNA gebundenen Proteine wurden mittels 1 % SDS mit 100 mM NaCl abgelöst und mittels LC-MS/MS analysiert. Dargestellt sind Violinplots der entsprechenden Replikate. Die Proteinintensität ist auf der Y-Achse als log₂ dargestellt und die totale Anzahl der jeweiligen Proteine unter den Violinen. Der Median ist rot eingezeichnet. **A** zeigt die allgemeine Verteilung aller gemessenen Proteine der jeweiligen Replikate. Der mittlere Plot (**B**) zeigt die Proteinintensität der Proteine, welche mit einer Signifikanz von $p < 0,1$ an- oder abgereichert sind. Im rechten Violinplot (**C**) sind diejenigen Proteine dargestellt, die im Hinblick auf An- oder Abreicherung ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ aufweisen. Die p-Werte wurden mittels t-Test ermittelt. Bereitgestellt von Dr. Axel Weber.

Die Violinplots zeigen von links nach rechts zuerst, wie viele verschiedene Proteine pro Replikat der WT und 3'MT-Proben jeweils identifiziert werden konnten (X-Achse). Die Anzahl der Messungen für die jeweiligen Proteine ist für alle Proteine als Logarithmus mit der Basis 2 dargestellt (Y-Achse, " \log_2 intensity"), dabei sind im Violinplot die zu den verschiedenen Proteinen gehörenden Datenpunkte zur Visualisierung von Verteilung und Menge der erfolgreichen Messungen mehr oder weniger in der Breite auseinandergezogen. Hier ist eine ähnliche Verteilung für Anzahl und Menge der Proteine innerhalb der biologischen Replikate, aber auch zwischen WT und 3'MT zu erkennen. In Teil **A** sind alle gemessenen Proteine aus den jeweiligen Replikaten abgebildet. Im Vergleich zwischen den verschiedenen Replikaten ist eine natürliche biologische Varianz durch die Anzahl an verschiedenen Proteinen zu erkennen, welche aber innerhalb eines Replikats zwischen beiden Klonen gleichbleibt. Betrachtet man zum Beispiel Replikat drei, so ist zu erkennen, dass hier für den WT und die 3'MT jeweils die meisten verschiedenen Proteine gemessen wurden.

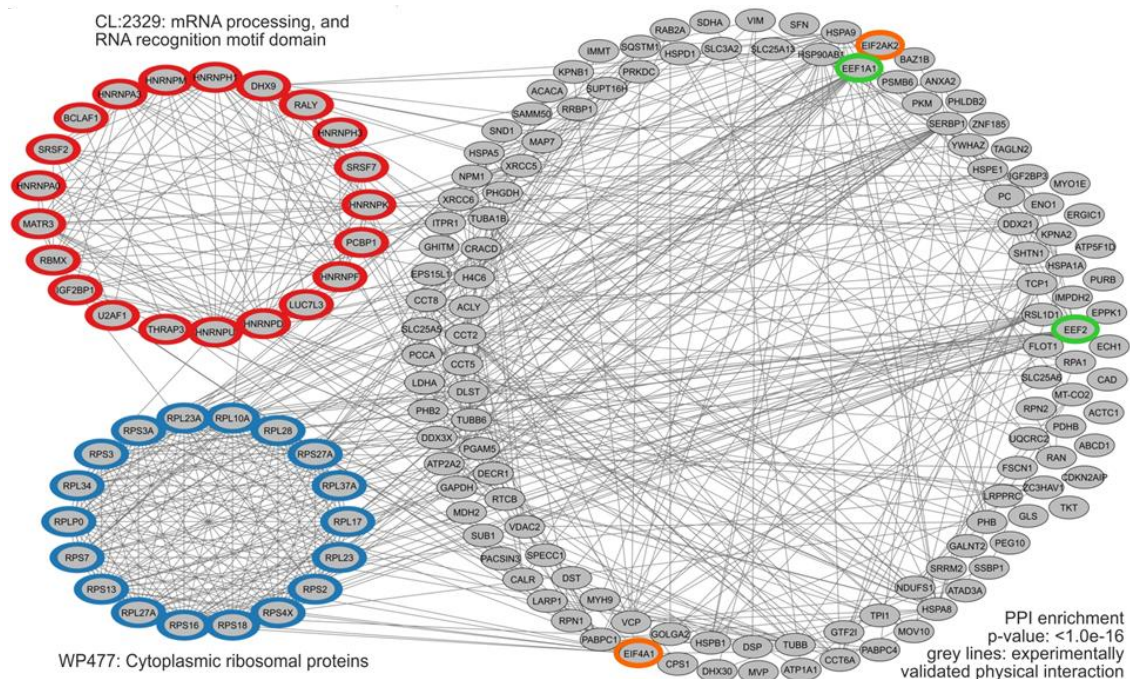
Dies spricht für die gute Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Daten. Ebenso wird dies durch die Anzahl von fünf Replikaten des WT und den vier Replikaten der 3'MT unterstützt. Es konnten nicht nur viele verschiedene Proteine gemessen werden, auch die Abundanz der jeweiligen Proteine ist mit einem \log_2 von 10 bis 20 sehr hoch, was ebenfalls die Signifikanz stark unterstützt. Der Median ist als rote Linie eingezeichnet. In der Darstellung aller Proteine ist der Median für den WT und die 3'MT sozusagen im "Schwerpunkt" der jeweiligen Violine zu erkennen (meist in der Mitte).

Im Weiteren wurden die Proteine betrachtet, welche im Vergleich zum WT signifikant an- oder abgereichert waren. Für eine erste Einordnung wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,1$ gewählt. Die daraus resultierenden 166 Proteine sind in **Abb. 25 B** als Violinplot dargestellt. Im Vergleich zu dem WT sind die Proteine der 3'MT größtenteils deutlich abgereichert. Es ist zu erkennen, dass sich die Form der Violinen, somit die Abundanz der Proteine der WT-Proben zwischen **A** und **B**, nicht prinzipiell verändert. Ebenso verbleibt der Median weitestgehend auf gleicher Höhe. Die 3'MT zeigt eine deutliche Verschiebung des Medians in den unteren Teil der Violinen, woran zu erkennen ist, dass der Großteil der gefundenen Proteine eine geringere Abundanz als $\log_2=10$ besitzt. Hieraus kann geschlossen werden, dass die meisten Proteine im Vergleich zum WT deutlich abgereichert sind.

Für den rechten Violinplot (**C**) wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ verringert. Unter diese Grenze fielen nur noch 92 verschiedene Proteine. Auch hier bleibt die Verteilung innerhalb der Replikate sehr ähnlich. Die Verteilung und Form der einzelnen Violinen sind sehr ähnlich zu der Verteilung der 166 Proteine. Analog zum mittleren Violinplot (**B**) lassen Lage des Medians und

Form der Violinen die Schlussfolgerung zu, dass die Proteine, die an die 3'UT RNA binden, gegenüber der WT-RNA weitestgehend abgereichert sind. Die Abundanz der verschiedenen Proteine fällt auch hier für den Großteil der Proteine in den Bereich unter $\log_2=10$.

Allgemein lässt sich die gute Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Proben durch die hohe Anzahl an Replikaten, welche eine natürliche biologische Varianz mit hinreichend gleichbleibender Verteilung aufweisen, und die sehr hohe Menge an gemessenem Gesamtprotein, mit ebenso gleicher Verteilung, bestätigen. Zur weiteren Analyse der Proben wurde ein Interaktionsnetzwerk der 166 Proteine aus **Abb. 25 B** mittels STRING-Datenbank angefertigt. Dies ist in **Abb. 26** abgebildet.



Top pathways (WikiPathways, STRING Clusters, KEGG)

Rank	Color	Term name	Description	FDR value	# Genes	# Background genes
1	Red	CL:2329	mRNA processing, and RNA recognition motif domain	5,73E-20	21	82
2	Blue	WP477	Cytoplasmic ribosomal proteins	5,53E-16	18	88
3		CL:2337	Mixed, incl. Zinc finger, CHHC-type, and Multisystem proteinopathy	1,69E-09	9	26
4		WP4290	Metabolic reprogramming in colon cancer	5,44E-09	10	42
5		hsa01200	Carbon metabolism	9,57E-09	13	116
28		WP107	Translation factors	3,60E-03	5	50

Abb. 26: Die Mutation der GBE beeinträchtigt die Interaktionen von Proteinen, die an RNA-Translation und Metabolismus beteiligt sind. Virale Reporter-RNA mit 3'-Biotin-Markierung wurde als Wildtyp und 3'-MT mittels Elektroporation in HeLa Zellen transfiziert. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert, die biotinylierte RNA an High Capacity NeutrAvidin-Beads gebunden und aufgereinigt. Die RNA gebundenen Proteine wurden mittels 1 % SDS mit 100 mM NaCl abgelöst und mittels LC-MS/MS analysiert. Dargestellt ist das Netzwerk der Proteininteraktionen der 166 gewählten Proteine. Graue Linien stellen experimentell nachgewiesene physische Bindungen der Proteine nach STRING Datenbank Version 12.0 dar. Weiter wurden die Proteine in Gruppen gefasst. Unter den an- und abgereicherten Proteinen waren zwei Gruppen stark repräsentiert. Ribosomale Proteine sind blau und Proteine der mRNA Prozessierung sind rot dargestellt. Zusätzlich sind an- und abgereicherte Translationsinitiationsfaktoren grün und Elongationsinitiationsfaktoren orange dargestellt. Das dargestellte Interaktionsnetzwerk basiert auf den Datenbanken von WikiPathways, STRING Clusters und KEGG. In der untenstehenden Tabelle sind die am stärksten vertretenen Pathways gelistet. Bereitgestellt von Dr. Axel Weber.

Unterhalb des Interaktionsnetzwerkes in Abb. 26 sind die am stärksten repräsentierten Pathways gelistet. Auf Platz eins finden sich 21 verschiedene Proteine der mRNA Prozessierung und Erkennung (rot) und auf Platz zwei 18 verschiedene cytoplasmatische ribosomale Proteine (Blau). Auch vertreten, aber auf einer niedrigeren Position, sind Proteine der Translationsinitiation (grün) und Elongationsinitiation (orange). Ebenso konnte durch die Massenspektrometrie eine vierfach geringere GARS-Menge in den Proben der 3' MT detektiert werden.

Um einen Teil der Daten vollständig darzustellen, wurde eine weitere Analyse mit gezielt ausgewählten Proteingruppen durchgeführt. In **Abb. 27** ist der Vergleich der Anreicherung und Abreicherung von cytoplasmatischen ribosomalen Proteinen (**A & B**), RNA-Bindeproteinen (**C**), Initiationsfaktoren (**D**) und Elongationsfaktoren (**E**) abgebildet. Zum Vergleich wurden Proteine der 5' MT (5'-mt) und 3' MT (3'-mt) normalisiert auf den WT dargestellt. Jeder Punkt entspricht dem Quotienten der Bindung eines bestimmten Proteins an die beiden RNAs (MT/WT), und die Gesamtzahl der Proteine innerhalb einer Gruppe ist mit „n =“ gelistet. Allgemein ist zu erkennen, dass alle Proteingruppen im Durchschnitt, verglichen mit dem WT, abgereichert sind und dass die Bindung der Proteine an die 3' MT immer stärker reduziert ist als die Bindung an die 5' MT. Bis auf die Elongationsfaktoren (**E**) zeigen alle anderen abgebildeten Proteingruppen einen signifikanten Unterschied (* bis ****).

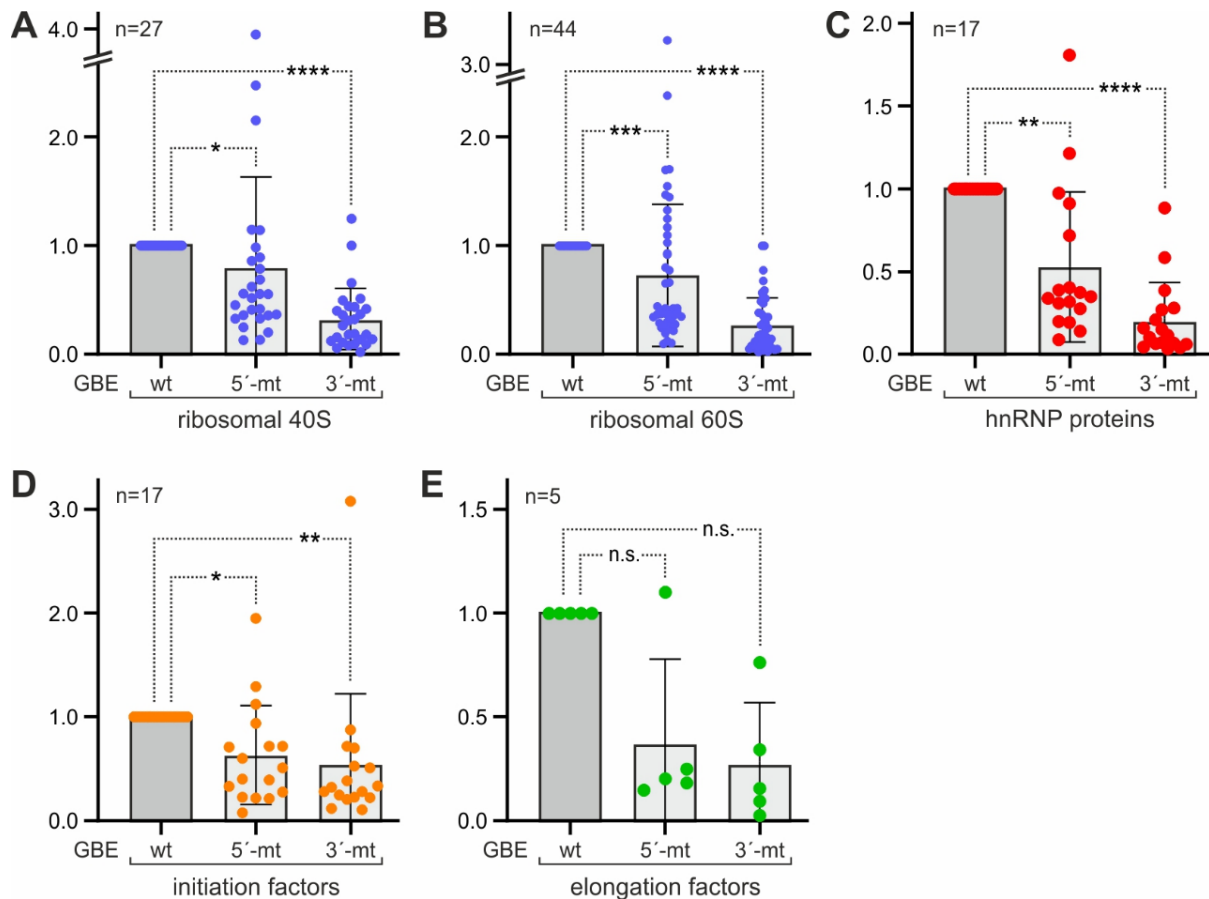


Abb. 27: Ausgewählte Proteingruppen mit überwiegend verringerter Abundanz in den Proben der GARS-Mutanten. Dargestellt sind ausgewählte Proteingruppen, welche bei Mutation des GBE der 3'-UTR (3'-mt) und des GBE der 5'-UTR (5'-mt) im Vergleich zum Wildtyp (wt) eine verringerte Bindung aufweisen. Reporter-RNA (80 pmol) mit 3'-Biotin-Markierung wurde in HeLa-Zellen (10 Millionen) transfiziert, lysiert, die biotinylierte RNA über High Capacity NeutrAvidin-Beads aufgereinigt und die gebundenen Proteine mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Auswahl dieser Proteine stammt aus der Analyse der Daten der Massenspektrometrie. Die Daten wurden auf den Wildtyp normalisiert. Jeder Punkt zeigt die relative Abundanz eines Proteins der entsprechenden Gruppe im Vergleich zum Wildtyp. **A** zeigt Proteine der ribosomalen 40S-Untereinheit, **B** der ribosomalen 60S-Untereinheit, **C** zeigt RNA-Bindeproteine (hnRNP), **D** Initiationsfaktoren und **E** Elongationsfaktoren. Die Anzahl der Proteine in den jeweiligen Gruppen ist mit n angegeben. Die Signifikanz ist über den Balken in Sternen dargestellt: n.s. = nicht signifikant | * = $p < 0,05$ | ** = $p < 0,01$ | *** = $p < 0,001$ | **** = $p < 0,0001$. Bereitgestellt von Michael Niepmann.

A zeigt Proteine der ribosomalen 40S Untereinheit. Von den 27 gefundenen Proteinen sind in der 5'MT 22 Proteine leicht bis stark abgereichert und zwei Proteine weisen eine minimal höhere Abundanz als im WT auf. Zusätzlich wurden nur drei Proteine zwei bis vierfach häufiger gefunden als im WT. Bei der 3'MT dagegen sind die Proteine durchschnittlich stärker abgereichert. Von den 27 verglichenen Proteinen ist lediglich eins ohne Veränderung und ebenso nur eins mit leicht stärkerer Bindung im Vergleich zum WT zu erkennen.

Ein ähnliches Bild zeigt sich für die 44 Proteine der ribosomalen 60S Untereinheit (**B**). Die Proteine beider Mutanten sind im Durchschnitt abgereichert, die 3'MT ist stärker betroffen. Für die 5'MT sind 11 Proteine zu erkennen welche angereichert sind, zwei davon sogar mehr als 2,5-fach. Der Rest der analysierten 60S Proteine ist leicht bis stark herabreguliert. Im Gegensatz dazu finden sich bei der 3'MT nur zwei Proteine, welche unverändert bleiben, die restlichen Proteinen sind großteils stark reduziert bis sogar gar nicht detektierbar.

Die in Teil **C** dargestellten hnRNP Proteine zeigen, wie bereits erwähnt, wieder das gleiche Muster. Bei der 5'MT gibt es von den 17 gefundenen Proteinen nur zwei Proteine, welche in der Mutante häufiger gefunden wurden als im Wildtyp, drei sind minimal weniger vorhanden und der Großteil ist bei der Mutante in zweifach geringerer Menge detektierbar. Bei der 3'MT sind alle Proteine abgereichert, 15 der 17 Proteine sogar mehr als zweifach weniger bis nahezu gar nicht detektierbar.

Auch für die Initiationsfaktoren in (**D**) bleibt das Muster gleich. Beide Mutanten weisen weniger gebundene Proteine als der Wildtyp auf. Erneut gibt es bei der 5'MT wenige Ausreißer. Von den 17 gefundenen Proteinen ist eines fast zweifach und zwei nur minimal erhöht vorhanden. Der Rest ist weitestgehend stark reduziert. Die 3'MT zeigt bis auf ein Protein, welches dreifach häufiger gefunden wurde, wieder eine starke Reduktion der Bindung der betrachteten Proteine.

Die Elongationsfaktoren (**E**) sind mit 5 Proteinen die kleinste vertretene Gruppe von Proteinen und weisen keinen signifikanten Unterschied auf, wurden aber dennoch betrachtet und dargestellt. Die Probe der 5'MT zeigt ein Protein, welches minimal erhöht gefunden wurde, und vier Proteine, die nur noch halb so oft vorhanden sind. Bei der 3'MT waren alle detektierten Proteine abgereichert, von einem leicht reduzierten bis zu vier Proteinen, welche mindestens zweifach reduziert vorkommen, zusätzlich noch eines, welches nicht detektierbar ist.

Die abgereicherten Proteine der ribosomalen Untereinheiten, der Translationsinitiation und Elongation sprechen für eine entscheidende Rolle von GARS bei der Rekrutierung dieser Proteine an die virale RNA. Zudem ist der unterschiedliche Effekt der Mutation der GBEs zu erkennen.

Fazit:

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass gruppenübergreifend bei der 3'MT hochsignifikant weniger Proteine detektierbar waren als beim WT. Auch bei der 5'MT konnten signifikant weniger Proteine detektiert werden als beim WT, jedoch mit geringerer Differenz als bei der 3'MT. Dies spricht für die Vermutung, dass beide GBEs eine Rolle in der Regulation der

Translation des Mengovirus durch GARS spielen, das 3'-GBE scheint hierbei, schlussfolgernd aus der Proteinabundanz, einen größeren Einfluss auf die Rekrutierung der Proteine zu haben als das 5'-GBE.

3.8 Auswertung des iCLiP2 Versuchs

Mithilfe des iCLiP2-Experiments wurde untersucht, welche Abschnitte der viralen RNA mit GARS binden. Zudem kann mittels iCLiP2 die exakte Bindestelle auf ein Nukleotid genau bestimmt werden. Dies kann helfen, den Effekt des Zielproteins auf posttranskriptionaler Ebene besser zu verstehen. Für eine optimale Versuchsdurchführung wurden die Versuchsbedingungen im Vorfeld getestet. Die Vorversuche und deren Ergebnisse sind in **6.8 Test IP (pre-test-CLIP)** und **6.9 Test CLIP** in beschrieben.

Für diesen Versuch wurde, wie zuvor, die virale Reporter-RNA in ihren vier Varianten (siehe **Abb. 8**) verwendet. Zu Beginn wurde die virale RNA (MV GBE 5'-3': WT-WT, MT-WT, WT-MT, MT-MT) und eine Kontrolle ohne RNA (-IVT) in HeLa-Zellen transfiziert. Nach kurzer Inkubation wurden mittels UV-Bestrahlung die zu diesem Zeitpunkt bestehenden RNA-Protein-Komplexe kovalent vernetzt. Danach wurden die Zellen lysiert und die RNA teilweise verdaut. An Stellen, an welchen Proteine an die RNA gebunden waren, blieb die RNA unverdaut. Diese kleinen RNA-Protein-Komplexe wurden im Anschluss mit GARS-Antikörpern, welche an Beads gebunden waren, inkubiert. Alle anderen Bestandteile außer den RNA-GARS-Komplexen wurden durch mehrfaches Waschen entfernt. Danach wurde an das 3'-Ende der RNA ein 20 nt langer Adapter für eine Reverse Transkriptase ligiert. Im nächsten Schritt wurden die RNA-Fragmente am 5'-Ende mit einer radioaktiven Markierung versehen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Hierbei verblieben alle restlichen, nicht proteingebundenen RNAs im Gel. Durch die radioaktive Markierung konnte der RNA-GARS-Komplex visualisiert und ausgeschnitten werden, um die RNA anschließend in cDNA revers zu transkribieren. Die erhaltene cDNA wurde mit einem weiteren Linker für die darauffolgenden Barcodes ligiert und nach der Barcode-Ligation mittels PCR und Gelelektrophorese auf eine einheitliche Konzentration eingestellt und zur Sequenzierung gegeben. Eine schematische Darstellung des iCLiP2 Verfahrens ist in **Abb. 28** dargestellt.

Dieses Experiment wurde von mir in der AG Rossbach mit Unterstützung von Yannic Noe durchgeführt. Die Sequenzierung wurde von der AG Bartkuhn durchgeführt und die Analyse der Rohdaten von Patrick Barth und der AG Goesmann.

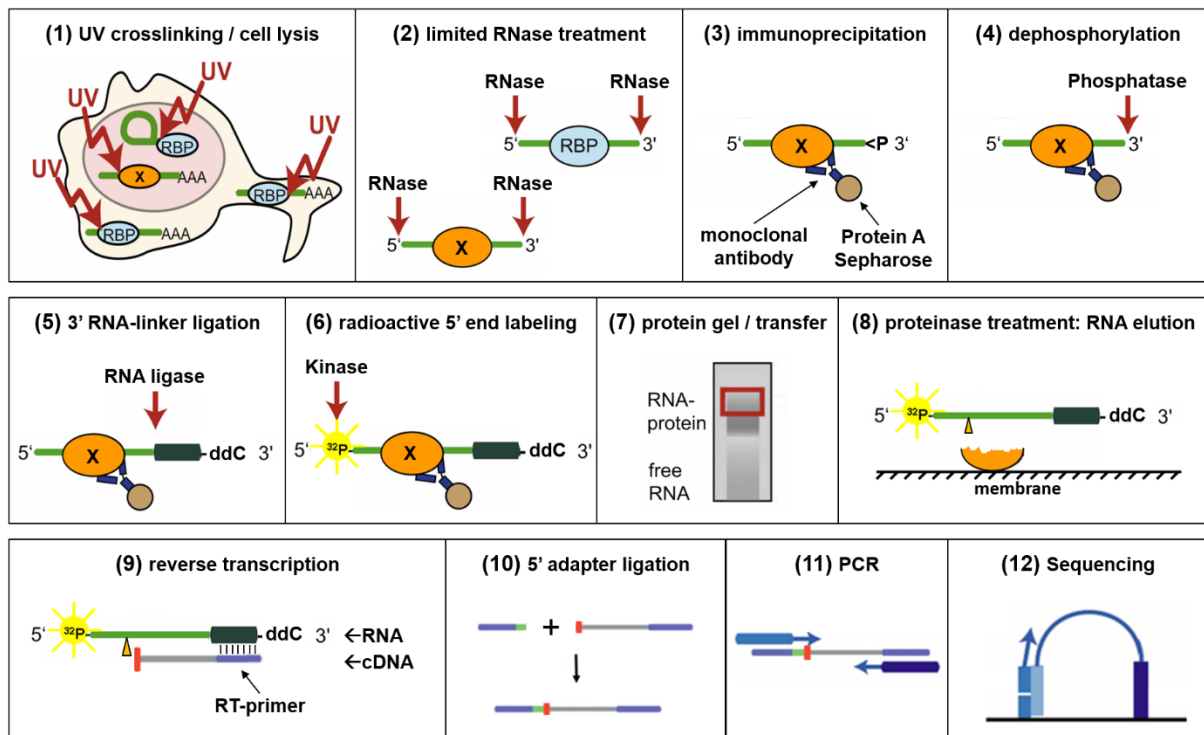


Abb. 28: Schematische Darstellung des iCLiP2 Verfahrens. Schritt 1 zeigt das UV-Crosslinking der RNA-Bindeproteine (RBP & X = Ziel RBP) an die RNAs in der Zelle. In 2 werden die proteingebundenen RNAs mittels RNase fragmentiert. Anschließend wird in 3 die Immunpräzipitation über das Zielprotein dargestellt und in 4 die Dephosphorylierung des 3'-Endes der RNA. Danach folgt die Ligation des Linkers für die Reverse Transkriptase (5) und die radioaktive Markierung des 5'-Endes mittels Gamma-ATP (6). Über die Auftrennung und den Transfer der Proteine mit der gebundenen RNA wird ungebundene RNA entfernt (7), und anschließend wird die markierte RNA von dem membrangebundenen Protein gelöst (8). Anschließend folgt die reverse Transkription (9) und die Ligation des 5'-Adapters an die cDNA (10). Zum Schluss wird die cDNA mittels PCR vermehrt (11) und sequenziert (12). Erstellt von Oliver Rossbach, nach (Buchbender et al. 2020).

Ein entscheidender Schritt in der Aufbereitung der Proben war die Gewinnung der an das Zielprotein (GARS) gebundenen RNAs. Hierfür wurden die auf die Nitrocellulose geblotteten RNA-Proteinkomplexe oberhalb des Zielproteins ausgeschnitten, in diesem Falle oberhalb von 83 kDa (GARS). Hierbei galt es zu beachten, dass nur Komplexe gewählt wurden, welche mindestens 16,5 kDa oberhalb der GARS-Bande lagen. Dies war durch die Ligation des RT-Linkers und der Mindestlänge der RNA-Fragmente (30 nt) begründet. Das Gewicht der gesamten 50 Basen aus Linker und RNA entspricht 16,5 kDa. Fragmente ohne diesen Linker konnten im nächsten Schritt nicht zu cDNA revers transkribiert werden und waren somit nicht zu gebrauchen. Für die korrekte Auswahl wurde ein Röntgenfilm auf die radioaktive Membran gelegt, entwickelt und anhand der Banden eine Schablone zum Ausschneiden der RNA-GARS-Komplexe erstellt. Im Anschluss wurde die restliche Membran entwickelt, um zu überprüfen, dass GARS immer noch auf der Membran vorhanden und verblieben war. Eine

Zusammenfassung der Auswahl der ausgeschnittenen Bereiche ist in **Abb. 29** zu sehen. Im oberen Teil sind die verschiedenen RNAs mit allen Replikaten, dem verwendeten Antikörper für die IP und die verwendete RNase-Konzentration gezeigt. Die Autoradiographie zeigt das Ergebnis des auf die radioaktive Membran aufgelegten Röntgenfilms. Durch die eingefügten weißen Kästen sind die im weiteren Verfahren ausgeschnittenen Membranstücke dargestellt. Der untere Teil zeigt den zum Schluss visualisierten Western Blot mit GARS-Banden für alle mit dem GARS-Antikörper aufgereinigten Proben. Zwischen dem WT und der 5'MT sowie zwischen der 5'MT und der 3'MT sind im Western Blot und Autoradiographie ebenfalls leichte Banden zu erkennen. Diese sind auf leicht überlaufene Taschen bei der Beladung des Gels zurückzuführen. Die Banden auf Höhe des 55 kDa-Markers in der Autoradiographie und dem Western Blot sind auf die Beads gebundenen IP-Antikörper zurückzuführen. Genauer gesagt handelt es sich hierbei um die schwere Kette der Antikörper. Durch diese Überprüfung lässt sich anschließend sagen, dass die passenden Membranstücke für die RNA-Rückgewinnung ausgeschnitten wurden.

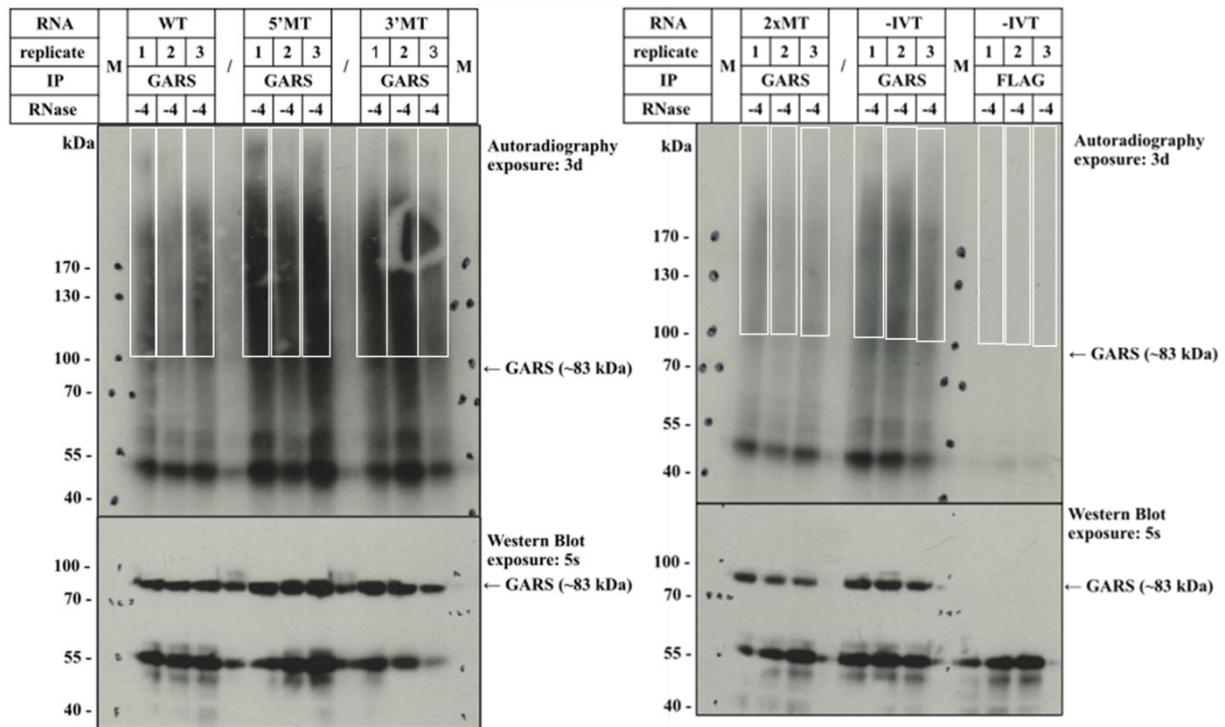


Abb. 29: Kontrolle zur Auswahl der GARS gebundenen RNAs aus der WB-Membran. Wie für den Pull-Down wurden 80 pmol der viralen Reporter-RNA (WT, 5'MT, 3'MT, 2xMT) und eine Kontrolle ohne RNA (-IVT) mittels Elektroporation in je 10 Millionen HeLa-Zellen transfiziert und nach 1 h Inkubation lysiert. Mittels UV-Crosslinking wurden die Proteine in dem Lysat an die RNAs gebunden und die RNA mit RNase (10^{-4}) fragmentiert. Anschließend wurden die GARS gebundenen RNA-Fragmente mittels IP (GARS-Antikörper, Kontrolle: FLAG) aufgereinigt und mit einem 20 nt Linker für die Reverse Transkriptase ligiert. Im nächsten Schritt wurden die aufgereinigten RNAs mittels Gamma-ATP markiert und mittels NuPAGE Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Entfernung der restlichen freien RNAs wurden die GARS gebundenen RNAs auf eine Nitrocellulosemembran geblotet. Um ausschließlich die GARS gebundenen RNAs zu erhalten, wurde ein Röntgenfilm auf die Membran aufgelegt und entwickelt (die hier gezeigte Autoradiographie). Anhand der Autoradiographie wurden dann die Bereiche aus der Membran geschnitten, auf welchen RNA-GARS Komplexe vorliegen. Hierfür wird ~15 kDa (auf Grund des 20 nt Linkers) oberhalb der erwarteten GARS-Bande ausgeschnitten (weiße Kästen). Aus diesen Membranstücken werden dann die RNA-GARS Komplexe für den weiteren Versuchsablauf gewonnen. Zur Kontrolle wird der Rest der Membran ebenfalls noch entwickelt (Western Blot), hier ist GARS deutlich zu erkennen.

3.8.1 Überblick der alignierten Daten

In den folgenden Abbildungen (**Abb. 30 & Abb. 31 & Abb. 32**) sind die GARS-RNA Interaktionen als Peaks dargestellt. Je höher der Peak, desto mehr Protein ist an der Stelle der RNA gebunden. Es ist jedoch zu erwähnen, dass durch das UV-Crosslinken nicht jeder Peak einer länger dauernden Bindung entspricht, es könnte sich auch nur um situative Momentaufnahmen während der UV-Exposition handeln, da sowohl kurzlebige als auch langlebige Bindungen durch den Crosslink fixiert werden. Weiter besitzen die verschiedenen Basen unterschiedliche Effizienzen bei dem Crosslinken. So ist Uracil beispielsweise die Base mit der höchsten Effizienz. Schließlich hängt die Effizienz des Crosslinking auch stark davon ab, ob sich bei der Bindung des Proteins an die RNA eine reaktive Aminosäure des Proteins in direkter räumlicher Nähe eines reaktiven Nukleotids befindet (Smith, 1976; Han *et al.*, 2022). Die Stelle des effizientesten Crosslinks in einer Region, in der ein Protein bindet, muss daher nicht unbedingt auch der genauen Stelle der stärksten Interaktion von Proteins und RNA entsprechen.

Die Abbildungen zeigen die Peaks der Alignements der viralen Reporter-RNA. Die RNA-Proben wurde für die Darstellung jeweils nur gegen ihre eigene Sequenz (z.B. WT-Probe mit WT-RNA oder 3'MT-Probe nur gegen 3'MT-RNA) aligniert. Betrachtet man den allgemeinen Überblick in **Abb. 30**, fällt zunächst die Ähnlichkeit der Crosslinking-Sites auf. Alle vier Klone zeigen zwar eine unterschiedliche Höhe der Peaks, aber ein ähnliches Muster in der Verteilung der Peaks. Für die Darstellung wurde die Skala aller Proben an die Probe mit dem höchsten Peak angepasst. Sortiert von maximal bis minimal zeigt die 5'MT mit bis zu 3931 Bindungen die meisten Reads, gefolgt von der 3'MT mit einem Maximum von 3230 Reads, danach folgt der Wildtyp mit 1579 Reads und zum Schluss die 2xMT mit maximal 536 Reads. Daher wurde die Skala basierend auf der 5'MT für alle Proben auf 4.000 angepasst. In den folgenden Abbildungen (**Abb. 31 & Abb. 32**) wird eine Vergrößerung der beiden GBE-Regionen gezeigt, hier wurde die Skala auf die gleiche Weise auf den jeweils höchsten Wert des betrachteten Bildabschnitts angepasst.

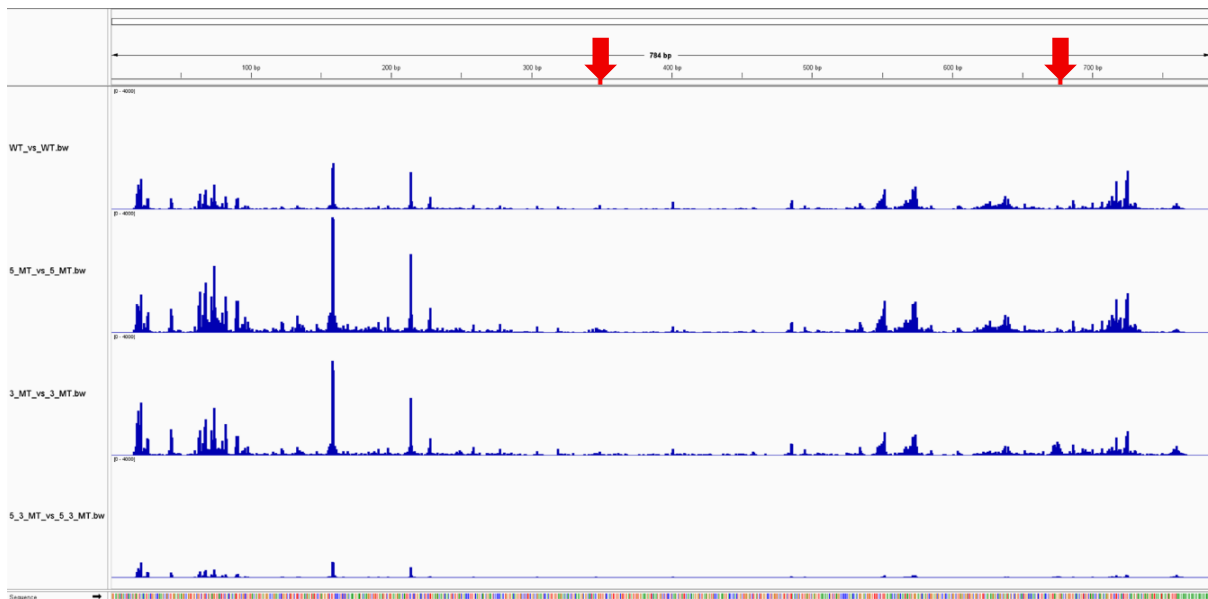


Abb. 30: Überblick der iCLiP2 Daten für die transfizierten Mengovirus-Reporter-RNA-Konstrukte. Reporter-RNA (80 pmol) wurde mittels Elektroporation in HeLa Zellen (10 Mio.) transfiziert und anschließend mittels iCLiP2 Verfahren prozessiert. Für die Aufreinigung mittels Immunpräzipitation wurde der aus den Western Blots bekannte GARS-Antikörper verwendet. Nach der Prozessierung wurden die Proben mittels der Illumina NovaSeq 6000-Plattform sequenziert und die Daten gemäß **6.12 Verarbeitung der iCLiP2 Daten** bearbeitet. Für das Alignment wurde jeweils nur die der Probe entsprechende Sequenz verwendet. Am oberen Rand ist die Länge der Reporter-RNA dargestellt. Hier ist die Position beider GBEs mit einem roten Pfeil markiert. Für den Versuch wurden alle vier Klone der Reporter-RNA verwendet. Die Skalierung aller Proben ist an den höchsten Wert im Bildabschnitt angepasst (4000). Die Sequenz der WT-RNA ist unterhalb als Farbcode dargestellt (A grün, T rot, C blau, G gelb).

Wie erwähnt, zeigt der Überblick der Crosslinking-Sites über das ganze Genom ein recht ähnliches Verhältnis zwischen den Proben. Als Zweites fällt auf, dass die Peaks in den mit rot markierten GBEs nur einem Bruchteil der Höhe der restlichen Peaks entsprechen. Des Weiteren lässt sich beobachten, dass die Maximalwerte von 5' MT und 3' MT den Wert des WT um mindestens das Doppelte überragen. Werden die höchsten Peaks, welche in allen Proben an der gleichen Stelle sind, genauer betrachtet, fällt auf, dass die entsprechenden Sequenzabschnitte sehr reich an Thymin (RNA: Uracil) sind und oftmals sogar mehrere Thymine nacheinander besitzen. Die Auswertung in Nukleotid-Auflösung (s.u.) ergibt zudem, dass die sieben höchsten Peaks der Proben immer auf einem Thymin liegen.

3.8.2 Zoom der 5'-GBE

Im nächsten Schritt wird das 5'-GBE genauer betrachtet. In der maximalen Vergrößerung des 5'-GBE (**Abb. 31**) erkennt man im Wildtyp einen klaren Peak auf dem Cytosin in der Mitte des GBE. Auch die 3'MT, mit intakter 5'-GBE, zeigt an der gleichen Stelle einen deutlichen, wenn auch nicht so klar isolierten Peak. Für die beiden Proben mit mutierter 5'-GBE (5'MT & 5'3'MT = 2xMT) ist erneut, auch wenn hier nicht so klar erkennbar, das gleiche Muster in der Verteilung der Peaks zu erkennen. Die 2xMT hat lediglich einem Gesamtwert von 13 % der 5'MT, was erklärt, warum dies in dieser Darstellung nicht klar erkennbar ist. Bei der 5'MT sind hier klare, aber nicht isolierte Ausschläge neben und nicht auf dem GBE zu erkennen. Am unteren Ende der Abbildung ist die Sequenz der GBE von WT (oben) und MT (unten) abgebildet. Hier ist zu erkennen, dass durch die Mutation der GBE zwei neue Thymine in die Sequenz eingebracht wurden, auf welchen die Crosslinking-Signale jeweils auch ausschlagen. Zudem ist in diesem Loop trotz Mutation in umgekehrte Richtung (3' - 5') immer noch ein CCA enthalten. Dieses „falsche“ CCA ist in allen Proben vorhanden und zeigt in allen Proben einen zumindest kleinen Peak.

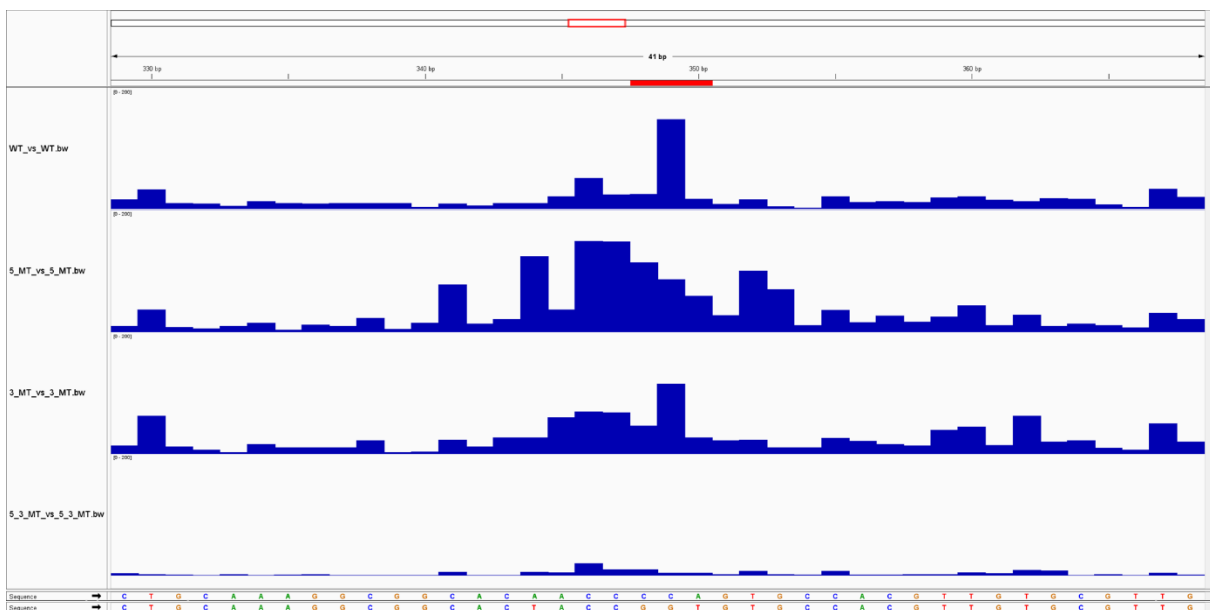


Abb. 31: Zoom des 5'-GBEs der iCLiP2 Daten. Reporter-RNA (80 pmol) wurde mittels Elektroporation in HeLa Zellen (10 Mio.) transfiziert und anschließend mittels iCLiP2 Verfahren prozessiert. Für die Aufreinigung mittels Immunpräzipitation wurde der aus den Western Blots bekannte GARS-Antikörper verwendet. Nach der Prozessierung wurden die Proben mittels der Illumina NovaSeq 6000-Plattform sequenziert und nach **6.12 Verarbeitung der iCLiP2 Daten** bearbeitet. Für das Alignment wurde jeweils nur die der Probe entsprechende Sequenz verwendet. Am oberen Rand ist der betrachtete Abschnitt der Reporter-RNA dargestellt. Hier ist die Position des 5'-GBEs mit einer kleinen roten Box markiert. Für den Versuch wurden alle vier Klone der Reporter-RNA verwendet. Die Skalierung aller Proben ist an den höchsten Wert im Bildabschnitt angepasst (200). Die Sequenz der WT-RNA (oben) und die Sequenz der 5'-GBE-MT (unten) ist unterhalb dargestellt.

3.8.3 Zoom der 3'-GBE

Nachfolgend wird das GBE in der 3'-UTR betrachtet. Im Gegensatz zum 5'-GBE, ist bei der 3'-GBE (**Abb. 32**) selbst im WT kein starker Peak zu erkennen. Der größte Peak liegt einige Basen weiter Richtung 3'-Ende zwischen zwei Thyminen. Dieser Peak, genauer die jeweiligen Regionen am 5'- und 3'-Ende aller Proben im Bildabschnitt, zeigen erneut ein ähnliches Muster. Wie zuvor, ist dies in der 2xMT auf Grund der allgemein geringeren Werte nicht so deutlich zu erkennen. Wie bereits angemerkt, ist beim Wildtyp exakt am GBE kein klarer Peak, sondern nur ein kleiner Ausschlag über das gesamte GBE zu erkennen. Die Proben mit intakter 3'-GBE (WT & 5'MT) zeigen eine nahezu identische Verteilung und Höhe der Peaks über die 3'-GBE. Die 3'MT zeigt einen breiten Peak, welcher sich über fünf Basen, angefangen bei dem eingebauten Thymin bis zum ersten Cytosin der GBE, erstreckt.

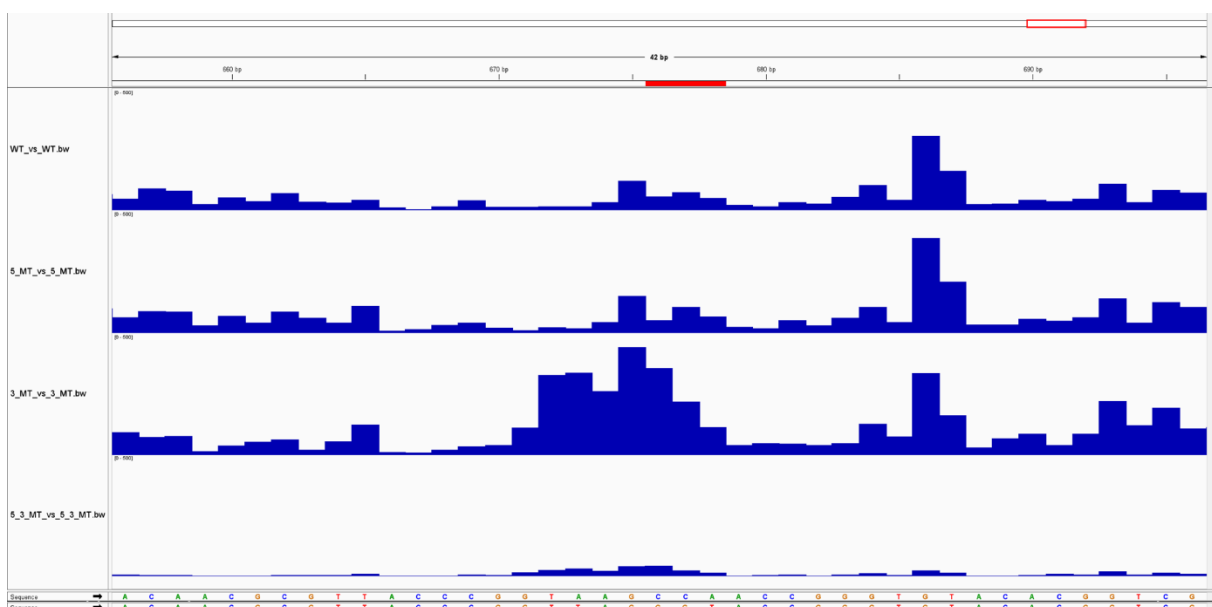


Abb. 32: Zoom des 3'-GBEs der iCLiP2 Daten. Reporter-RNA (80 pmol) wurde mittels Elektroporation in HeLa Zellen (10 Mio.) transfiziert und anschließend mittels iCLiP2 Verfahren prozessiert. Für die Aufreinigung mittels Immunpräzipitation wurde der aus den Western Blots bekannte GARS-Antikörper verwendet. Nach der Prozessierung wurden die Proben mittels der Illumina NovaSeq 6000-Plattform sequenziert und nach **6.12 Verarbeitung der iCLiP2 Daten** bearbeitet. Für das Alignment wurde jeweils nur die der Probe entsprechende Sequenz verwendet. Am oberen Rand ist der betrachtete Abschnitt der Reporter-RNA dargestellt. Hier ist die Position der 3'-GBE mit einer kleinen roten Box markiert. Für den Versuch wurden alle vier Klone der Reporter-RNA verwendet. Die Skalierung aller Proben ist an den höchsten Wert im Bildabschnitt angepasst (500). Die Sequenz der WT-RNA (oben) und die Sequenz der 3'-GBE-MT (unten) ist unterhalb dargestellt.

Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei einem Großteil der Peaks wahrscheinlich nicht um die Identifikation der stärksten GARS-Bindungsstellen handelt, da die Peaks in allen Proben gleich verteilt sind und vor allem, weil diese Peaks auf oder um sehr thyminreiche Regionen

sitzen. Hierbei ist zu bemerken, dass Thymin mit Abstand die höchste Crosslinking-Effizienz der 4(5) Basen besitzt (Smith, 1976; Han *et al.*, 2022). Zudem wird durch das Crosslinken eine Art Momentaufnahme zum Zeitpunkt der UV-Bestrahlung erstellt. Auch scheint es auffällig, dass die 5'MT und die 3'MT in der Spitze doppelt so viele Crosslinking-Sites besitzt wie der WT. Diese Beobachtung wird im nachfolgenden Abschnitt dieser Arbeit diskutiert.

Fazit:

Abschließend muss festgestellt werden, dass sich die Crosslink-Methode – wahrscheinlich wegen der fehlenden räumlichen Nähe reaktiver Aminosäuren des Proteins zu reaktiven Nukleotiden in der RNA - leider nicht gut zum Nachweis der GARS-GBE-Interaktion eignet. Das ist ein Ergebnis, das sich ohne exakte Kenntnis der räumlichen Kontakte zwischen Protein und RNA nicht vorhersagen, sondern nur durch das Experiment feststellen lässt.

4. Diskussion

4.1 Nachweis und Analyse der GARS-Bindung an die GBEs

Bereits 2012 konnte die Bindung von GARS an eine virale IRES beobachtet werden. Hier zeigte D. Andreev, dass die Zugabe von in Zellen rekombinant exprimierten GARS zu Poliovirus (PV)-RNA mit Fluc Reporter in *rabbit reticulocyte lysate* (RRL) bei deletierter GARS ABD (Anticodon Binding Domain) eine deutlich geringere Fluoreszenz im Vergleich zu GARS ohne Deletionen zeigt. Im weiteren Verlauf wurden Mutanten mit Deletionen der verschiedenen Domänen der PV-5'-UTR verwendet, um die Bindungspartner zu identifizieren. Hierbei fanden Andreev et al heraus, dass ein Protein mit der Größe von 83 kDa bei der Bindung an eine Poliovirus IRES RNA mit einer Deletion der IRES Domäne V fehlte. Dieses Protein konnte die Gruppe im Weiteren als GARS identifizieren (Andreev *et al.*, 2012). Doch nicht nur im PV, sondern auch in weiteren Enteroviren konnte eine Bindung von GARS an Bereiche der viralen IRES gefunden werden (Nikonova *et al.*, 2018). In beiden Veröffentlichungen wird beschrieben, dass virale IRES-Elemente die Struktur der tRNA^{Gly} nachahmen (Andreev *et al.*, 2012; Nikonova *et al.*, 2018). Basierend darauf wurde bioinformatisch nach weiteren GBEs in allen positiven einzelsträngigen RNA-Viren gesucht und in Cardioviren gefunden (Droß et al. unveröffentlicht; Markus Fricke und Muriel Ritsch, ehem. AG Marz, Jena). Diese Ergebnisse und die daraus resultierenden Fragen stellen die Grundlage meiner Arbeit dar.

Durch die bioinformatische Suche nach GBEs fiel das Augenmerk zunächst auf die konservierten Bindestellen in den 3'-UTRs der Cardioviren. Diese Bindestelle befindet sich in einem Stem mit einem Loop aus sechs Basen, 5'-NNNCCA-3', von welchen GARS 5'-(N)CCA-3' erkennt, wobei das 3'-A stark konserviert ist und in direktem Kontakt zur ABD steht (Saks & Conery, 2007; Jühling *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2016; Westhof *et al.*, 2022; Giegé & Eriani, 2023; Yu *et al.*, 2023). Daraufhin wurde die Bestätigung und Analyse dieser Bindestelle im Mengovirus zum Forschungsziel der AG Niepmann. Allgemein wurde für die Untersuchungen der GBE virale RNA mit WT GBE (5'-GGTAAGCCAACC-3') oder mutiertem GBE (5'-GGTTAGGGTACC-3') verwendet. Das hierfür erarbeitete Protokoll für das Pull-Down-Verfahren wurde Schritt für Schritt angepasst und überprüft. Der Erfolg der Methode ist im Ergebnisteil schrittweise dargestellt. Zunächst wird die gelungene und effiziente Biotinmarkierung am 3'-Ende der viralen RNA durch den Streptavidin-Shift (**Abb. 13**) bestätigt. Der deutliche Versatz des Großteils der markierten RNA (WT, 5', 3', 2x) im Vergleich zur unmarkierten Kontroll-RNA (+; WT) ist hierfür eine eindeutige Bestätigung. Dieser beruht auf

der Komplexbildung des Biotins der markierten RNA mit Streptavidin, woraufhin die Migration der RNA im Gel eingeschränkt wird. Durch die Intensität der versetzten Banden lässt sich die effiziente Bindung nachweisen (Willkomm & Hartmann, 2012). Die Anpassung der Waschschriffe in der Aufreinigung der RNA-Protein-Komplexe während des Pull-Downs zeigt ihren Erfolg in **Abb. 11**. Hier wurden die Waschschriffe von drei auf vier erhöht, nach dem dritten Waschschriff wurde das Reaktionsgefäß gewechselt und dem Waschpuffer wurde Detergenz (NP-40, final 0,01 %) in geringer Konzentration hinzugegeben. Durch Zugabe des Detergenz und Erhöhung der Waschschriffe soll die unspezifische Bindung an die Beads gesenkt werden. Zudem soll das Detergenz falsche Signale durch die Haftung von RNA-Protein-Komplexen an die Wand der Reaktionsgefäße reduzieren. Der positive Effekt des Detergenz ist klar zu erkennen, wenn man die in der zuvor erwähnten Abbildung unterschiedlichen Ansätze 0 % R mit 0,01 % R vergleicht. Bereits mit der Zugabe von 0,01 % Detergenz ist keine RNA-Bande von der Probe der restlichen Beads (R) mehr zu erkennen. Um die RNA gebundenen Proteine zu schonen, wurde die geringere Konzentration gewählt. Zur weiteren Optimierung der Sensitivität wurde von nicht geblockten Streptavidin-Beads auf geblockte (tRNA, BSA, Glykogen) NeutrAvidin-Beads mit höherer Kapazität gewechselt. Die NeutrAvidin-Beads sollen laut Hersteller eine höhere Bindungsspezifität und eine wesentlich niedrigere Affinität für unspezifische Bindungen aufweisen. Durch das Blocken wurden die unspezifischen Bindungen weiter reduziert, und die Verwendung von Beads mit höherer spezifischer Bindungskapazität erlaubt bei gleichbleibender Gesamt-Bindungskapazität den Einsatz von geringeren Mengen an Beads, was wiederum zu einer Reduktion der unspezifischen Bindung von Proteinen an die Beads führt. Der Erfolg dieser Verbesserung ist im Vergleich zwischen **Abb. 18 & Abb. 20** klar zu erkennen, wenn man die Banden für GAPDH im Pull-Down betrachtet, welche in **Abb. 20** nicht mehr vorhanden sind. Somit lässt sich der Erfolg der Optimierung des Pull-Down-Verfahrens nachweisen, und die darauffolgenden Ergebnisse sind als zuverlässig zu betrachten.

Für den Nachweis der 3'-GBE des Mengovirus steht somit nicht nur die bioinformatische Suche zur Verfügung, welche unter anderem bereits bekannte Bindestellen aus Enteroviren aufzeigt (Andreev *et al.*, 2012; Nikonova *et al.*, 2018), sondern auch das für diese Arbeit notwendige zuverlässige und reproduzierbare Protokoll zum Erstellen von Western Blots (**Abb. 20, Abb. 21 & Abb. 40**). Diese Western Blots zeigen eine klare GARS-Bande für die Probe, in der das 3'-GBE in WT-Form vorliegt, für die 3'MT aber nicht. Das entsprechende Membranstück wurde nur mit GARS-Primärantikörper behandelt, und die Bande zeigt sich auf der erwarteten Höhe von 83 kDa. In **Abb. 20** ist zusätzlich eine schwache GARS-Bande für die Probe mit der

mutierten 3'-GBE zu erkennen, dieses Ergebnis wird nachfolgend noch genauer diskutiert. Zusätzlich findet sich das 3'-GBE des Theiler's Murine Encephalitis Virus (TMEV, ein Cardiovirus B), eines nahen Verwandten des Mengovirus, ebenso in den Ergebnissen der bioinformatischen Suche; die Bindung von GARS kann in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden (**Abb. 24, TMEV WT/MT**). Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse stützen also die Ergebnisse der bioinformatische Suche, welche bereits bestätigte Bindestellen identifiziert hat, und bestätigt diese GARS-Bindestellen auf experimenteller Ebene.

Neben dem theoretischen Fund der 3'-GBE im MV wurde über eine Vergrößerung des Loops der GBE von sechs auf sieben Basen noch ein zusätzliches GBE in der 5'-UTR des MV gefunden (Droß et al. Unveröffentlicht, Muriel Ritsch). Dieses GBE wurde ebenso experimentell überprüft. Dabei kommt die Frage auf, warum eine 5'-GBE gefunden wurde, jedoch in den ersten Western Blots, bei welchen nur das 3'-GBE verändert wurde, keine klare Bande in der 3'MT erkennbar ist. Eine Vermutung ist, dass, wenn zwei GBEs in MV existieren und nur ein GBE mutiert wird, das zweite dennoch funktional vorhanden bleibt und durch GARS-Bindung eine Bande im Western Blot erzeugen sollte. Hier bekommt die schwache GARS-Bande der Probe mit mutierter 3'-GBE aus **Abb. 20** eine Bedeutung. Diese schwache Bande beruht darauf, dass die 3'MT-Probe eine intakte 5'-GBE besitzt (3'MT = GBE WT – MT). Die schwache Bande lässt aber eine geringere Bindeeffizienz vermuten. Daher wurden, wie zuvor erwähnt, Western Blots mit allen vier Kombinationen der MV GBEs, (MV GBE 5'-3': WT-WT, MT-WT, WT-MT & MT-MT) angefertigt. Auf dem Western Blot in **Abb. 22** ist für den WT und die 5'MT eine eindeutige GARS-Bande zu erkennen, für die 3'MT und die 2xMT aber nicht. Speziell die Tatsache, dass die 5'MT eine Bande zeigt und die 3'MT nicht, spricht stark dafür, dass GARS an das gefundene 3'-GBE bindet. Für die Bindung an das 5'-GBE gibt es hier noch kein überzeugendes Argument. Die GARS-Banden in **Abb. 41** verdeutlichen die Bindung an das 3'-GBE mit dem gleichen Argument wie zuvor. Hier erkennt man auch eine schwache Bande in der 3'MT, welche die Bindung an die 5'-GBE vermuten lässt, genau wie es zuvor mit **Abb. 24** erwähnt wurde. Dies stützt den zuvor im Ergebnisteil erwähnten Gedanken, dass beide MV GBEs eine unterschiedliche Bindeeffizienz für GARS besitzen, da die Banden in den Western Blots unterschiedliche Intensitäten aufweisen. Diese Vermutung wird durch die Western Blots mit den reinen UTR-Fragmenten untermauert, da das alleinstehende 5'-GBE selbst als WT keine Bande (**Abb. 24**) oder eine Bande mit der gleichen Stärke wie ihre MT (**Abb. 42**) zeigt. Aus diesen Ergebnissen leitet sich die Frage ab, welchen Nutzen die Bindung von GARS an die GBEs für das Mengovirus mit sich bringt.

Für eine entsprechende Erklärung sind weitere, noch unveröffentlichte Daten aus der AG Niepmann hilfreich, die im Folgenden erläutert werden. Aus diesen Daten lässt sich die Auswirkung beider GBEs auf das virale Genom des Mengovirus erkennen. Dieser Effekt stützt erneut die Existenz der gefundenen GBEs und die Bindung von GARS an diese GBEs. So ist beispielsweise durch eine Lumineszenz Messung über den secNLuc Reporter eine geringere Lumineszenz in den GBE-Mutanten zu messen und somit auf eine Down-Regulation aller drei Mutanten zu schließen, die nicht auf die Stabilität der Mutanten zurückzuführen ist (**Abb. 33**, Droß et al. Unveröffentlicht, durchgeführt von Tim Gödert). T. Gödert zeigt hier (**Abb. 33 B**) die relative Lumineszenz der verwendeten RNAs (Translationsreporter mit secNLuc) normalisiert auf den WT. Aus den Daten geht hervor, dass das 5'-GBE eine stärkere Auswirkung auf die Translation des Mengovirus besitzt, da die relative Lumineszenz der 5'MT nur noch 37 % der des WT entspricht, die 3'MT weist 65 % des WT auf.

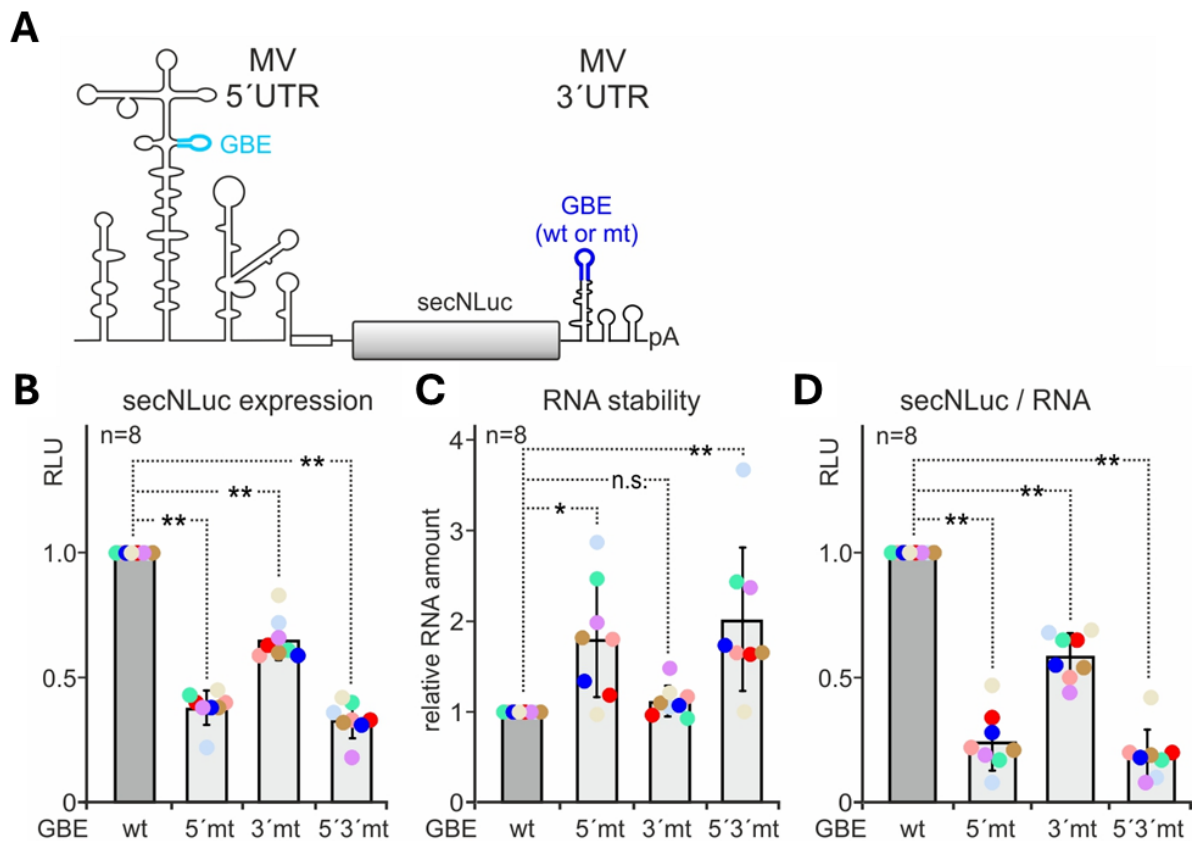


Abb. 33: Auswirkung des GBEs auf die Translation des Mengovirus. A zeigt schematisch die verwendete Translationsreporter-RNA mit beiden GBEs in der 5'-UTR und 3'-UTR. Zwischen den UTRs ist für die Messung der Translationseffizienz der Fluoreszenzreporter secretable NanoLuciferase (secNLuc) eingebaut. B zeigt die relative Lumineszenz vier Stunden nach Transfektion von HeLa Zellen mittels Elektroporation, normalisiert auf den Wildtyp. Die Stabilität der transfizierten RNA in Bezug auf den Wildtyp ist in C dargestellt. D zeigt die relative Lumineszenz, normalisiert auf den Wildtyp in Abhängigkeit der transfizierten RNA-Menge. Die Variante der Mutation der GBEs in beiden UTRs (wt/mt) ist unterhalb der Graphen abgebildet. Für die Darstellung wurden acht Replikate ($n = 8$) verwendet und jedes Replikat ist mit einem Punkt in einer individuellen Farbe markiert. Gleiche Farben stammen aus demselben Versuchsdurchlauf. N.s. = nicht signifikant, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$. Durchgeführt von Tim Gödert; Droß et al. unveröffentlicht.

Ebenso geht aus den noch unveröffentlichten Daten ein positiver Effekt von GARS auf die Replikation des Mengovirus hervor (Droß et al. unveröffentlicht; durchgeführt von Selena A. Fuchshuber). Hierfür transfizierte S. A. Fuchshuber Mengovirus full-length RNA mit HiBiT Reporter in den Varianten GBE WT und 3'MT in HeLa Zellen und betrachtete die Anzahl und Größe der entstehenden Plaques (Abb. 34). Der positive Effekt von GARS auf die gesamte Replikation des MV konnte so nachgewiesen werden, da die Plaque-Größe der 3'MT über 96 Stunden im Schnitt nur 66 % der Größe der WT-Plaques besitzt (Abb. 34 C) und der

Unterschied in der Anzahl der Plaques über die Versuchsdauer immer größer wird (bis zu ~ 50 %) (Abb. 34 D).

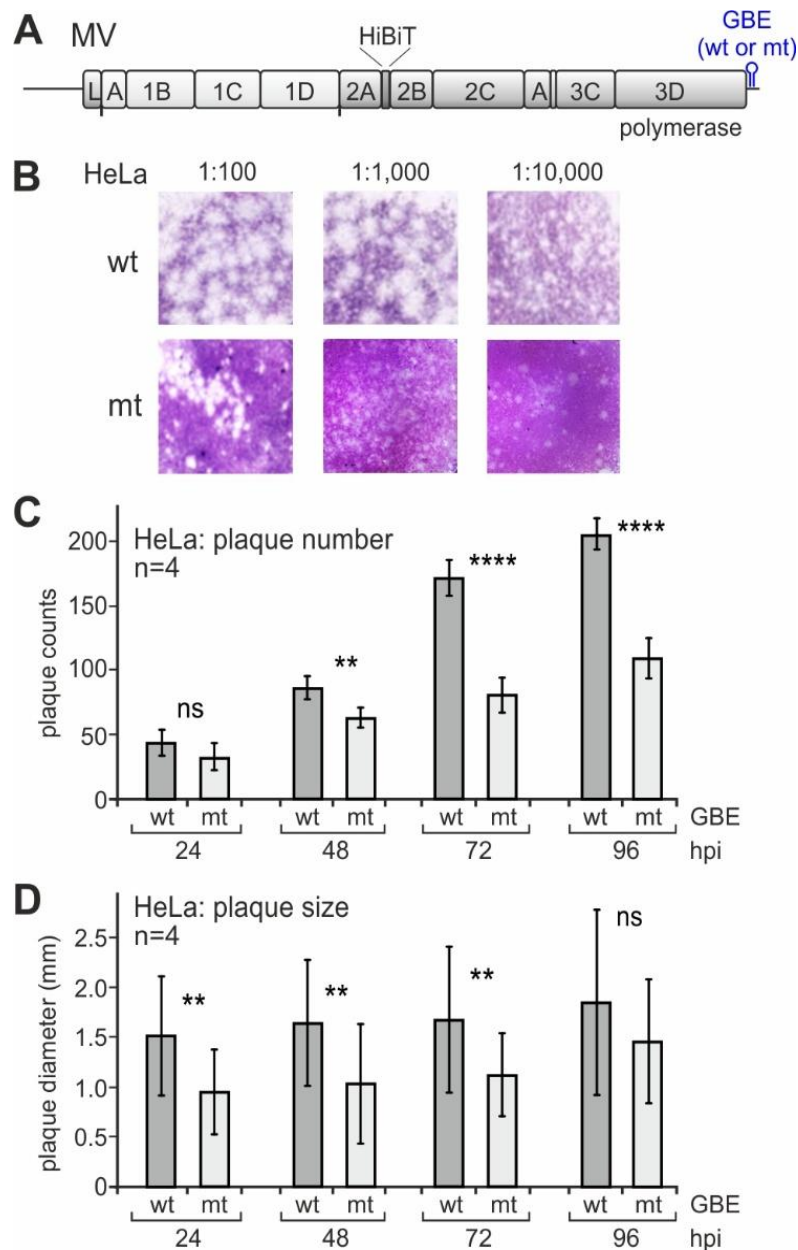


Abb. 34: GARS beeinflusst die Replikation des Mengovirus. In A ist das Genom der verwendeten full-length MV-RNA mit eingebautem HiBiT und des 3'-GBE (WT/MT) dargestellt. B zeigt die Auswirkung der Infektion von HeLa Zellen mit verdünnten (1:100 - 1:10.000) Medium mit Mengovirus. Die Anzahl der Plaques ist in C und die Größe der Plaques ist in D über die Versuchsdauer von 96 Stunden ausgewertet und dargestellt. hpi = Stunden nach Infektion. N.s. = nicht signifikant, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ & **** = $p < 0.0001$. Durchgeführt von Selena A. Fuchshuber; Droß et al. unveröffentlicht.

Diese Ergebnisse aus der AG Niepmann zeigen den positiven Effekt von GARS auf die Translation bis hin zur gesamten Replikation des Mengovirus. Weiter wird diese Aussage von den zu Beginn erwähnten Tatsachen gestützt, dass GARS an die IRES von Enteroviren, speziell Polio, bindet und dort den gleichen positiven Effekt auf die Replikation der Viren aufweist

(Andreev *et al.*, 2012; Nikonova *et al.*, 2018; Andreev *et al.*, 2022). Dass GARS die virale RNA bindet und einen positiven Effekt auf Replikation und Translation besitzt, konnte somit gezeigt werden. Im nächsten Gedankengang kommt die Frage auf, worauf der Effekt von GARS beruht.

In den gut untersuchten Polioviren mit Typ I IRES fördert die Bindung von GARS die Bindung weiterer Proteine an die IRES, was somit maßgeblich zu dem Zusammenbau des 48S-Initiationskomplexes beiträgt (Martínez-Salas *et al.*, 2015; Andreev *et al.*, 2022). Somit fällt der Blick als nächstes auf Ergebnisse der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Massenspektrometrie. Die Auswertung aller detektierten Proteine (**Abb. 26**) zeigt im Vergleich zum Wildtyp eindeutig, dass für die Proben mit mutierter 3'-GBE allgemein weniger verschiedene Proteine gefunden wurden. Zudem sind Proteine mit signifikantem Unterschied zum Wildtyp in deutlich geringerer Zahl vorhanden. Dies hängt damit zusammen, dass trotz mutiertem 3'-GBE das 5'-GBE in den ausgewerteten Proben immer noch intakt ist. Weiter wird noch die Annahme der unterschiedlichen Bindungsstärken beider GBEs gestärkt, wenn vermutet wird, dass auch hier die GARS-Bindung die Rekrutierung weiterer Proteine unterstützt. Die Auswertung der gezielt ausgewählten Proteine (**Abb. 27**) zeigt für beide Mutanten eine Verringerung der Bindung der betrachteten Proteine an die Mengovirus-RNA. Die Mutation der 3'-GBE hat hier eine stärkere Auswirkung. Mit der zuvor aufgestellten Annahme, dass die Bindung von GARS die Rekrutierung von Initiationsfaktoren, weiterer RNA-Bindeproteine und somit den Zusammenbau des Initiationskomplex unterstützt, zeigt sich auch hier ein Argument für die unterschiedliche Stärke beider GBEs. Zusätzlich ist in den Daten zu erkennen, dass eine Mutation der GBEs, sei es 5' oder 3', dazu führt, dass durch die Massenspektrometrie weniger bis teilweise gar keine der betrachteten Proteine gefunden wurden. Diese Tatsache bekräftigt die zuvor angenommene Vermutung, dass GARS auch in Mengoviren bei der Rekrutierung des Initiationskomplexes eine maßgebliche Rolle spielt. Somit ist GARS aufgrund des Translations-Assays (**Abb. 33**) und der Daten der Massenspektrometrie (**Abb. 27**) die Eigenschaft als Translation-Enhancer zuzuschreiben.

Basierend auf dieser Diskussion der vorliegenden Ergebnisse, stellt sich die Frage, warum GARS mit seiner Translations-Enhancer-Funktion stärker an die 3'-GBE bindet als an die 5'-GBE, aber der beobachtete Effekt auf die Translation stärker von der 5'-GBE beeinflusst wird.

Darüber kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Eine Antwort könnte sein, dass das 3'-GBE als Ankerpunkt für das GARS-Dimer dient. So bindet ein Teil des Dimers fest an das 3'-GBE, der zweite Teil bindet anschließend das 5'-GBE und sorgt für den Zusammenbau des Initiationskomplexes und den Start der Translation. Ist diese gestartet, entfernen sich die Initiationsfaktoren wieder von der 5'-UTR und dem Ribosom. Da das GARS-Dimer aber noch

an der 3'-GBE verankert ist, kann es erneut das 5'-GBE finden und den Zusammenbau des nächsten Ribosoms einleiten, was zu der beschriebenen Funktion mit der hohen Translation und Replikationsrate von Viren übereinstimmen würde. Dabei erlaubt die Tatsache, dass das GARS-Dimer an der 3'-UTR eher fester "verankert" ist und an der 5'-UTR eher schwächer, also vermutlich eher temporär bindet, ein Verbleiben des GARS-Dimers auf der viralen RNA, gleichzeitig aber die sterisch ungehinderte Initiation der Translation an der IRES, nachdem das GARS-Dimer die Rekrutierung von Translations-Faktoren und Ribosomen an die virale RNA begünstigt hat.

Ein weiterer Aspekt ist die Kontrolle der RNA-Integrität. Durch die Bindung eines GARS-Dimers an das GBE in der 3'-UTR und die gleichzeitige Interaktion des GARS-Dimers mit der 5'-UTR in *cis* wird signalisiert, dass die virale RNA intakt ist und eine Translation dieser RNA sinnvoll ist. Anders gesagt: bleibt die Bindung an das 3'-GBE aus, könnte dies ein Anzeichen dafür sein, dass die RNA zwischen 5'- und 3'-Ende degradiert ist, wodurch die viralen Proteine nicht vollständig translatiert werden könnten und kein funktionsfähiges Virus entstehen würde. Beide obigen Argumente lassen eine starke Bindung an das 3'-GBE als ersten Kontrollpunkt und die stärkere Auswirkung des 5'-GBE auf die Translation sinnvoll erscheinen.

Durch die Struktur von GARS als Homodimer (Eriani *et al.*, 1990; Delarue, 1995; Francklyn *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 2016; Kaiser *et al.*, 2018) und den zwei gefundenen GBEs (**Abb. 35**) ist es noch wahrscheinlicher, dass beide aufgeführten Annahmen zusammenspielen. Über das 3'-GBE wird als erstes die Integrität der RNA sichergestellt. Ist dies durch die Bindung gewährleistet, kann das 5'-GBE von dem Dimer durch den 3'-Anker vereinfacht gebunden werden. An der 5'-GBE wird dann die Funktion als Translations-Enhancer wirksam und mittels GARS wird der Zusammenbau des Initiationskomplex eingeleitet. Nach dem Zusammenbau und dem Start des Ribosoms kann durch die 3'-Verankerung die 5'-Bindung schnell wiederhergestellt werden, um ein weiteres Ribosom zu rekrutieren. Dies in Kombination sorgt für eine schnelle und effiziente Translation der vollständig intakten viralen RNA.

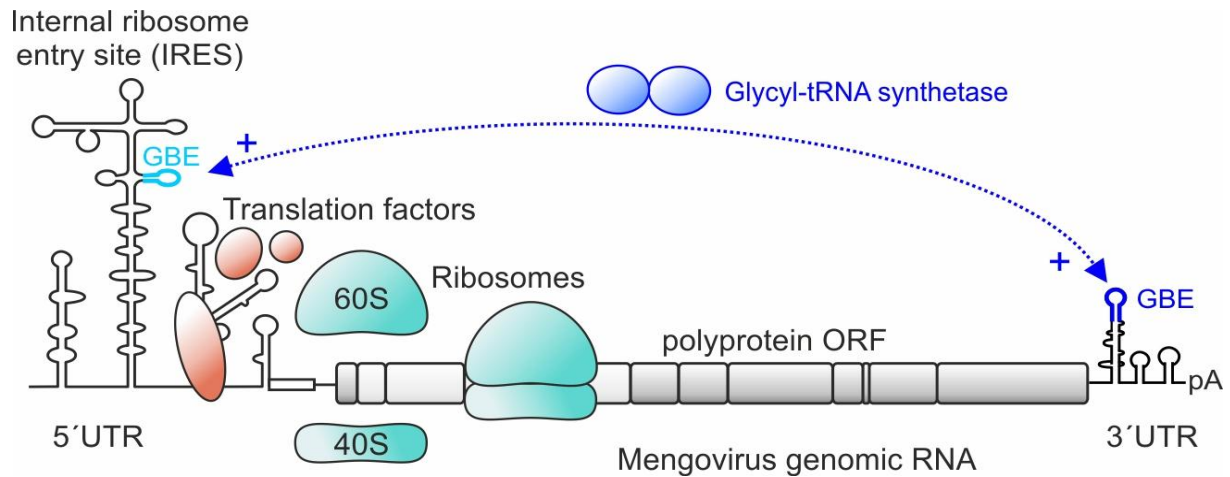


Abb. 35: Schematische Darstellung des GARS-Dimers und der Translationsinitiation. Das GARS-Dimer (blau) bindet die GBEs der Mengovirus-RNA in der 5' und der 3' UTR. Durch diese Bindung wird die Rekrutierung der Translationsinitiationsfaktoren (orange) verstärkt, was zu dem Zusammenbau des Ribosoms (petrol) führt. Ebenfalls in Petrol dargestellt ist die Translation des viralen Polyproteins durch das zusammengebaute Ribosom (Abbildung bereitgestellt von Michael Niepmann; Droß et al. unveröffentlicht).

4.2 Warum GARS?

Nach dem Nachweis der Bindung und der positiven Wirkung von GARS auf die virale RNA stellt sich die Frage - Warum GARS? Der folgende Abschnitt beruht auf den Ideen von D. E. Andreev (Andreev *et al.*, 2022). Es gibt einige grundlegende Faktoren, die für GARS in der beschriebenen Rolle und Funktionsweise sprechen. Als Aminoacyl-tRNA-Synthetase ist GARS in allen translatierenden Zellarten vorhanden. Damit ist gewährleistet, dass unabhängig davon, welche Zellen infiziert werden, die virale Replikation gesichert ist. Dies sollte sich auch in der Wahrscheinlichkeit des Nachweises von GBEs in weiteren Picornaviren zeigen. Doch GARS ist nicht nur in jedem translatierenden Zelltyp vorhanden, sondern ist auch für eine effiziente Translation in einer hohen Menge vorhanden. In Polioviren ist bekannt, dass GARS mit einer höheren Affinität an das virale GBE als an die Wirts-tRNA bindet (Andreev *et al.*, 2012). Es ist zu vermuten, dass dies ebenfalls für das Mengovirus GBEs der Fall ist. Durch die ausreichende Konzentration von GARS in der Zelle sollte trotz höherer Affinität zur viralen GBE die Translation in der Wirtszelle nicht gravierend verringert werden, allein schon, um die Produktion viraler Proteine während der Vermehrung der Viren zu gewährleisten. Diese Tatsachen sprechen nicht ausschließlich für GARS, sondern allgemein für Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRS). Hier kommt der Multi-Aminoacyl-tRNA-Synthetase Komplex (MARS) ins Spiel. GARS ist kein Bestandteil des MARS (Han *et al.*, 2003). Dieser Komplex ist mit 1,5 MDa etwa 18-fach so schwer wie GARS (83 kDa), was höchst wahrscheinlich zu strukturellen Problemen führen könnte, da die Größe des MARS die Bindung des Ribosoms an die virale RNA räumlich behindern würde.

4.3 Fehleranalyse des iCLiP2 Versuchs

Mittels iCLiP2 sollte die Bindung von GARS an die entsprechenden Basen des Loops beziehungsweise des GBE bestätigt und gegebenenfalls präzisiert werden, speziell in Bezug auf die genaue Basenposition der Bindung und den Unterschied zwischen Wildtyp und mutierter GBE. Hierzu lässt sich allerdings aus den Ergebnissen des GARS-iCLiP2 keine sichere Aussage treffen. Im Überblick der Crosslinking-Sites (**Abb. 30**) erkennt man, dass das rot markierten GBEs nur einen Bruchteil der Peaks ausmachen. Der Zoom des 5'-GBE (**Abb. 31**) lässt für den WT einen klar isolierten Peak erahnen, für das 3'-GBE (**Abb. 32**) zeigt der Zoom hingegen keinen klaren Peak. Im Folgenden wird dennoch eine Schlussfolgerung anhand der Zooms der GBEs gezogen, aber auch erklärt, warum diese mit Vorsicht zu betrachten ist. Darüber hinaus wird versucht, die höchsten Peaks zu erklären.

Die am ehesten relevante zugrundeliegende Information für diese Diskussion ist die unterschiedliche Crosslinking-Effizienz der vier RNA-Basen. Uracil weist mit Abstand die höchste Effizienz auf, an zweiter Stelle mit großem Abstand folgt Cytosin. Adenin und Guanin weisen die deutlich schlechtesten Effizienzen auf (Smith, 1976; Han *et al.*, 2022). Das bedeutet, dass es bei dem Crosslinken der Proteine an die virale RNA dazu kommen kann, dass trotz Vorliegen eines physikalischen Kontaktes zwischen RNA und Protein basierend auf der Base keine kovalente Bindung beim UV-Crosslink zustande kommt. Zudem findet durch das Crosslinken die Betrachtung der Kontakte nur genau in der Zeit der UV-Bestrahlung statt, vorausgesetzt es entsteht eine kovalente Bindung. Dabei ist es unabhängig davon, ob eine funktionelle (und damit oft eher stabilere) RNA-Protein-Bindung besteht oder zu diesem Zeitpunkt nur ein kürzerer oder spontaner (eher unspezifischer) Kontakt vorhanden war. Hierzu kommt die unterschiedliche Effizienz der Basen. Hierdurch kommt es an Uracil wesentlich häufiger zu Bindungen, die aus obigen Gründen meist nicht proportional zur Stärke der RNA-Protein-Bindung sind und daher nicht immer ein gutes Maß für eine funktionelle RNA-Protein-Bindung darstellen. Ein Nebenaspekt ist noch, dass Crosslinken weitestgehend nur an Einzelstrangregionen oder Loops funktioniert (Han *et al.*, 2022).

Aufgrund der verwendeten Mutationen stellt Uracil mit seiner hohen Crosslinking-Effizienz einen weiteren zu beachtenden Nachteil dar. Durch den Austausch der Basen in der GBE-Mutante wurden bei beiden GBEs zwei Uracil eingebaut, in der 3'-GBE kommt zudem bereits ein Uracil vor (**Tabelle 15**). Im Weiteren erkennt GARS die tRNA ähnlichen Loops der viralen UTRs. Eine genauere Betrachtung der größten Peaks zeigt, dass diese Regionen aus Loops mit uracilreichen Abschnitten bestehen. Oftmals finden sich mehrere Uracil direkt hintereinander oder sind nur durch zwei bis vier Basen getrennt. Zudem sitzen viele Peaks auch

exakt auf einem Uracil. Durch die Kombination aus Momentaufnahme, Erkennung von Loops und der stärksten Crosslinking-Effizienz von Uracil lässt sich somit vermuten, dass es sich bei den größten Peaks nicht um wirkliche GARS-Bindungen handelt (Fehlbindung). Unterstützt wird diese Annahme durch die Betrachtung der jeweiligen Proben mit eigener Skalierung, wo die Skala (Y-Achse) nur bis zu dem Maximalwert der jeweiligen Probe reicht (relative Darstellung). Hierbei fällt auf, dass die Verteilung und Höhe der Crosslinking-Sites allgemein, nicht nur der größten Peaks, nahezu identisch ist. Zusammenfassend muss also festgestellt werden, dass die Crosslink-Methode aus verschiedenen chemisch-technischen Gründen nicht sonderlich gut zur Analyse der GARS-RNA-Interaktionen geeignet ist und keine einfach darzustellenden klaren Ergebnisse liefert, die nicht einer aufwändigen und mit vielen Unsicherheiten behafteten Interpretation bedürften.

Dennoch ist in dem Zoom der 5'-GBEs ein Unterschied zwischen mutierter und Wildtyp GBE zu erkennen. Beide Proben mit intakte 5'-GBE (WT & 3'MT) zeigen einen isolierten Peak auf dem mittleren Cytosin des 5'-CCA-3', was im WT am deutlichsten zu erkennen ist. Dies könnte ein weiterer Hinweis für die Existenz der 5'-GBE sein. Der in 5'-Richtung verschobene Ausschlag der 5'MT lässt sich einmal mit dem dort eingebauten Uracil erklären, und für den Rest dieses Ausschlages könnte die Sequenz eine Begründung sein. Betrachtet man diese in 3'-5'-Richtung, fällt auf, dass in dieser Richtung ein CCA-Basentriplet vorhanden ist. Dieser Bereich ist als leichter Ausschlag in den Proben mit intaktem GBE und stark in den Proben mit mutiertem GBE zu erkennen. Wenige Basen in 3'-Richtung nach dem GBE findet sich noch eine 5'-CCA-3' Sequenz, diese befindet sich aber nicht mehr im Loop, sondern in dessen Stem. Somit ist dieses CCA nicht gut zugänglich für eine GARS-Bindung und auch nicht für ein mögliches Crosslinking. Für das 3'-GBE lässt sich keine Aussage treffen, und die obigen Annahmen zum 5'-GBE sind auch aus den zuvor erwähnten Gründen mit Vorsicht zu betrachten.

4.4 Ausblick und offene Fragen

Die Bestätigung der GBEs in MV und TMEV zusammen mit dem bekannten GBE in PV lässt vermuten, dass die Funde der GBEs in Picornaviren durch die bioinformatische Suche nicht nur als Sequenz, sondern als Bindestelle existieren. Weitere Untersuchungen der GBEs in den verschiedenen Picornaviren bleiben eine interessante Aufgabe.

Aus der Arbeit von D. Andreev geht hervor, dass die virale RNA GARS stärker bindet als die Wirts-tRNA (Andreev *et al.*, 2012). Zusammen mit der in dieser Arbeit beobachteten unterschiedlichen Affinität von 5'-GBE und 3'-GBE stellt sich die Frage, ob zumindest das 3'-GBE, oder sogar beide GBEs, GARS ebenfalls stärker binden als die Wirts-tRNA. Zudem könnte dies dann ebenfalls für GBEs in weiteren Picornaviren getestet werden.

Vorab könnte passend dazu überprüft werden, ob universell zwei GBEs in Picornaviren existieren, für Polio ist dies bereits bekannt (Andreev *et al.*, 2022). Wäre dies der Fall, sollte die Möglichkeit der unterschiedlichen Affinitäten beider GBEs getestet werden. Das Vorhandensein von (mindestens) zwei GBEs in einer viralen RNA würden die Aussage stützen, dass ein GBE als Ankerpunkt fungiert. Bei Mengovirus stützt die Aufteilung der GBEs auf beide UTRs die Hypothese, dass dadurch eine Kontrolle der RNA-Integrität erfolgen kann.

Der Effekt als Translation-Enhancer von GARS auf MV und PV ist ein regulatorischer Ansatz, der ebenfalls für weitere Picornaviren von Interesse ist und untersucht werden sollte. Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wäre einer der nächsten Schritte zur Untermauerung der Translation-Enhancer Hypothese ein Versuch zur Überprüfung, in welchem Rahmen GARS bei der Rekrutierung der Proteine des Initiationskomplexes unterstützend oder sogar direkt an der Bindung beteiligt ist.

Ein zusätzlicher Aspekt ist die mögliche Ausweitung der bioinformatischen Suchen von GBEs auf (-)ssRNA Viren. Ein erstes Indiz hierfür könnte der positive Effekt von GARS auf die Replikation des Influenza Virus sein (Zhang *et al.*, 2025).

5. Material

5.1 Geräte

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Geräte gelistet.

Tabelle 2: Geräte

Modell	Hersteller	Art
CB150	Binder	Inkubator
MB 102	Bioer	Mischblock
Gene Pulser X cell	BioRad	Elektroporator
ChemiDoc Imaging System	BioRad	ChemiDoc
PowerPac Basic	BioRad	Stromquelle
5417R	Eppendorf	Kühlzentrifuge
5427R	Eppendorf	Kühlzentrifuge
BioPhotometer	Eppendorf	Photometer
Duomax 1030	Heidolph	Schwenktisch
LaminAir HA2448BS	Heraeus	Flowbank
Mikro 200	Hettich	Tischzentrifuge
Loopster Basic	IKA	Rotationschüttler
Qubit 2.0	Invitrogen	Fluorometer
PCB 350-3	Kern	Feinwaage
AccuBlock Digitaly Dry Bath	Labnet	Heizblock
DM12	Leica	Mikroskop
91-D1100	peqLab	Heizblock
Vortex-Genie 2	Scientific Industries	Vortex
2-16 KL	Sigma	Zentrifuge
US152	Stuart	Magnetrührer
Mini-Star	VWR	Mini-Zentrifuge
PCR-Workstation	VWR	Sterilbank
pH 50+DHS	XS-Instruments	pH-Meter
BLX-254	Vilber	UV-Crosslinker

5.2 Chemikalien

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien gelistet.

Tabelle 3: Chemikalien

Substanz	Zusatz	Hersteller
Nonidet P-40		AppliChem
GeneRuler DNA-Leiter	6x, Niedriger Bereich 25 - 700 bp	Invitrogen
Glycoblue		Invitrogen
Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol	25:24:1, v/v	Invitrogen
Reducing agent	10x	Life Technologies
LDS Sample Buffer	4x	Life Technologies
RLT-Puffer		Life Technologies
PNK-Puffer	5x	NEB
PNK-Puffer	10x	NEB
RNA Ligase Puffer	10x	NEB
RNA Loading Dye	2x	NEB
T4 RNA-Ligase Puffer	10x	NEB
Color Prestained Protein Standard	Broad Range 10 – 250 kDa	NEB
T7 RNAPol Reaction Buffer	10x	NEB
peqGOLD, Protein Marker IV	10 - 170 kDa	Peqlab
cOmplete tablets, Mini, EDTA free	7x	Roche
Tris	> 99,9 %	Roth
NaCl	> 99,5 %	Roth
EDTA	> 99 %	Roth
Albumin Fraktion V (BSA)	> 98 %	Roth
SDS	> 99,5 %	Roth
TEMED	> 99 %	Roth
KCl	> 99,5 %	Roth
HEPES	> 99,5 %	Roth
MgCl ₂	> 99 %	Roth
Glycin	> 99 %	Roth

NaOH	> 98 %	Roth
TWEEN20		Roth
Methanol	> 99 %	Roth
Ethanol	> 99,8 %	Roth
ATP	100 mM	Roth
GTP	100 mM	Roth
CTP	100 mM	Roth
UTP	100 mM	Roth
Isopropanol	> 99,5 %	Roth
NaOAc	> 99 %	Roth
Rothiphorese Gel 40	29:1	Roth
LB-Medium		Roth
Milchpulver	Blotting Grade	Roth
Ethidiumbromid	1 %	Roth
DTT		Roth
NaF	> 99 %	Roth
Pefabloc SC-Protease-Inhibitor	> 95 %	Roth
NaBH ₄	> 97 %	Roth
NaOCl	12 %	Roth
Agarose	NEEO Ultra Qualität	Roth
Bromphenol Blau		Roth
CaCl ₂	> 98 %	Roth
Glycerol	> 99,5 %	Roth
H ₃ BO ₃	> 99,5 %	Roth
MgSO ₄	> 99 %	Roth
NaF	> 99 %	Roth
PEG400		Sigma Aldrich
PEG8000		Sigma Aldrich
β-Mercaptoethanol	> 99 %	Sigma Aldrich
Biotinamidohexansäurehydrazid	> 90 %	Sigma Aldrich
tRNA	aus <i>S. cerevisiae</i>	Sigma Aldrich
Glykogen	aus <i>Mytilus Genus</i>	Sigma Aldrich
Ethylen Glykol	> 99 %	Sigma Aldrich

Urea (Harnstoff)	> 98 %	Sigma Aldrich
KIO ₄	> 99,8 %	Sigma Aldrich
Amoniumpersulfat		Thermo Scientific
RT-Puffer	5x	Thermo Scientific

5.3 Enzyme

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme gelistet.

Tabelle 4: Enzyme

Name	Hersteller	Verwendung
Superscript III RT 200 U/μl	Thermo Scientific	iCLiP2
RNaseOUT 40 U/μl	Invitrogen	iCLiP2
T4 RNA Ligase 30.000 U/ml	NEB	iCLiP2
T4 PNK 10.000 U/ml	NEB	iCLiP2
RNase I 100 U/μl	Thermo Scientific	iCLiP2
High conc. RNA Ligase 10.000 U/ml	NEB	iCLiP2
2x Phusion HF PCR Master Mix	Thermo Scientific	iCLiP2
T7 Polymerase 5000 U/ml	NEB	IVT
Pyrophosphatase, inorganic (<i>E. coli</i>)	NEB	IVT
TURBO DNase 2 U/μl	Invitrogen	IVT/iCLiP2
RNase Inhibitor, Murine 40000 U/ml	NEB	IVT/WB
BciVI 10000 U/ml	NEB	Restriktionsverdau
BamHI 20000 U/ml	NEB	Restriktionsverdau
Trypsin 2,5 % (10x)	Gibco	Zellkultur

5.4 Kits

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Kits gelistet.

Tabelle 5: Kits

Name	Hersteller	Verwendung
Monarch RNA Clean up Kit 50 µg	NEB	RNA-Aufreinigung
NucleoBond Xtra Maxi Plus	Macherey-Nagel	Plasmidpräparation
Gene JET PCR Purification Kit	Thermo Scientific	DNA-Aufreinigung
ProNex® Size-Selective Purification System	Promega	Size Selection iCLiP2
ECL Detection Reagents	Amersham	Western Blot
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrat	Thermo Scientific	Western Blot

5.5 Beads

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Beads gelistet.

Tabelle 6: Beads

Name	Hersteller	Verwendung
Streptavidin Sepharose	Cytiva	WB
Pierce NeutrAvidin Agarose Resin	Thermo Scientific	WB
Pierce High Capacity NeutrAvidin Agarose Resin	Thermo Scientific	WB
Dynabeads Protein A	Invitrogen	iCLiP2
MyONE Silane Beads	Life Technologies	iCLiP2
ProNex Beads	Promega	iCLiP2

5.6 Antikörper

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper gelistet. Alle Primärantikörper sind monoklonal.

Tabelle 7: Antikörper

Name	Hersteller	Bestellnummer	Verwendung
eIF4G1	Proteintech	67199-1-Ig	1:10.000 WB
GARS	Proteintech	67893-1-Ig	1:20.000 WB & 3 µg iCLiP2 (IP)
PABPC1	Proteintech	66809-1-Ig	1:5.000 WB
eIF4G2/DAP5	Proteintech	67428-1-Ig	1:10.000 WB
FLAG	Sigma-Aldrich	F3165	3 µg iCLiP2 (IP)
GAPDH	Sigma-Aldrich	CB1001	1:5.000 WB
Anti-Mouse-IgG	Sigma-Aldrich	A9044	1:10.000 WB

5.7 Plasmide

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide gelistet.

Tabelle 8: Plasmide

Plasmide	Beschreibung
pUC18-MENGO-5'UTR-WT-3'UTR-WT-HIBIT	Mengovirus 5'-UTR GBE Wildtyp gefolgt von HiBiT, kurzem Linker und der Mengovirus 3'-UTR GBE Wildtyp unter der Kontrolle des T7 Promotors, Amp ^R
pUC18-MENGO-5'UTR-MT-3'UTR-WT-HIBIT	Mengovirus 5'-UTR GBE mutiert gefolgt von HiBiT, kurzem Linker und der Mengovirus 3'-UTR GBE Wildtyp unter der Kontrolle des T7 Promotors, Amp ^R
pUC18-MENGO-5'UTR-WT-3'UTR-MT-HIBIT	Mengovirus 5'-UTR GBE Wildtyp gefolgt von HiBiT, kurzem Linker und der Mengovirus 3'-UTR GBE mutiert unter der Kontrolle des T7 Promotors, Amp ^R
pUC18-MENGO-5'UTR-MT-3'UTR-MT-HIBIT	Mengovirus 5'-UTR GBE mutiert gefolgt von HiBiT, kurzem Linker und der Mengovirus 3'-UTR GBE mutiert unter der Kontrolle des T7 Promotors, Amp ^R
pUC57-MENGO-5'-UTR-WT	Mengovirus 5'-UTR GBE Wildtyp unter der Kontrolle des T7 Promotors, Amp ^R

pUC57-MENGO-5'-UTR-MT	Mengovirus 5'-UTR GBE mutiert unter der Kontrolle des T7 Promotors, Amp ^R
pUC57-MENGO-3'-UTR-WT	Mengovirus 3'-UTR GBE Wildtyp unter der Kontrolle des T7 Promotors, Amp ^R
pUC57-MENGO-3'-UTR-MT	Mengovirus 3'-UTR GBE mutiert unter der Kontrolle des T7 Promotors, Amp ^R
pUC57-TMEV-3'-UTR-WT	Theiler murine Virus 3'-UTR GBE Wildtyp unter der Kontrolle des T7 Promotors, Amp ^R
pUC57-TMEV-3'-UTR-MT	Theiler murine Virus 3'-UTR GBE mutiert unter der Kontrolle des T7 Promotors, Amp ^R

5.8 Zelllinien und Bakterienstämme

In den folgenden Tabellen werden die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Bakterienstämme gelistet.

Tabelle 9: Zelllinien

Zelllinie	Quelle	Herkunft
HeLa	Ralf Bartenschlager; Charles M. Rice	Humane Zervix-Epithelkarzinomzellen

Tabelle 10: Bakterienstämme

Stamm	Quelle	Genotyp
Escherichia coli 5α	NEB	<i>fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>

5.9 Kulturmedien

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien für die HeLa Zellen gelistet.

Tabelle 11: Kulturmedien

Medium	Hersteller
DMEM (1×) + GlutaMAX	Gibco
Opti-MEM	Gibco

5.10 Kulturmedien Zusätze

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Zusätze der Kulturmedien gelistet.

Tabelle 12: Kulturmedien Zusätze

Substanz	Endkonzentration	Medium
Ampicillin	100 µg/ml	LB-Medium
Penicillin	10 U/ml	DMEM (1×) + GlutaMAX
Streptomycin	10 µg/ml	DMEM (1×) + GlutaMAX
FBS Hi	10 %	DMEM (1×) + GlutaMAX

5.11 Radionuklide

In dieser Arbeit wurde nur ^{32}P - γ -ATP (SCP901) von Hartmann Analytic verwendet.

5.12 Oligonukleotide

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit für iCLiP2 verwendeten Oligonukleotide gelistet (Buchbender *et al.*, 2020).

Tabelle 13: Oligonukleotide

Bezeichnung	Name	Barcode	Sequenzen
i1	L01clip2.0	NNNNN,CGT GAT,NNNN	/5Phos/NNNNATCACGNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i2	L02clip2.0	NNNNN,AC ATCG,NNNN	/5Phos/NNNNCGATGTNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i3	L03clip2.0	NNNNN,GCC TAA,NNNN	/5Phos/NNNNTTAGGCNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i4	L04clip2.0	NNNNN,TGG TCA,NNNN	/5Phos/NNNNTGACCANNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i5	L05clip2.0	NNNNN,CAC TGT,NNNN	/5Phos/NNNNACAGTGNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i6	L06clip2.0	NNNNN,ATT GGC,NNNN	/5Phos/NNNNGCCAATNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i7	L07clip2.0	NNNNN,GAT CTG,NNNN	/5Phos/NNNNCAGATCNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i8	L08clip2.0	NNNNN,TCA AGT,NNNN	/5Phos/NNNNACTTGANNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i9	L09clip2.0	NNNNN,CTG ATC,NNNN	/5Phos/NNNNGATCAGNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i10	L10clip2.0	NNNNN,AA GCTA,NNNN	/5Phos/NNNNTAGCTTNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i11	L11clip2.0	NNNNN,GCT CAT,NNNN	/5Phos/NNNNATGAGCNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i12	L12clip2.0	NNNNN,TAC AAG,NNNN	/5Phos/NNNNCTTGTANNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i13	L13clip2.0	NNNNN,TTG ACT,NNNN	/5Phos/NNNNAGTCAANNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i14	L14clip2.0	NNNNN,GG AACT,NNNN	/5Phos/NNNNAGTTCCNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/

i15	L15clip2.0	NNNNN,TGA CAT,NNNN	/5Phos/NNNNATGTCANNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i16	L16clip2.0	NNNNN,GG ACGG,NNN N	/5Phos/NNNNCCGTCCNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i17	L17clip2.0	NNNNN,TAG TTG,NNNN	/5Phos/NNNNCAACTANNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i18	L18clip2.0	NNNNN,GC GGAC,NNN N	/5Phos/NNNNGTCCGCNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i19	L19clip2.0	NNNNN,TTT CAC,NNNN	/5Phos/NNNNGTGAAANNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i20	L20clip2.0	NNNNN,CCG GTG,NNNN	/5Phos/NNNNCACCGNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i21	L21clip2.0	NNNNN,CG AAAC,NNN N	/5Phos/NNNNGTTCGNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i22	L22clip2.0	NNNNN,CGT ACG,NNNN	/5Phos/NNNNCGTACGNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i23	L23clip2.0	NNNNN,ATC GTG,NNNN	/5Phos/NNNNCACGATNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i24	L24clip2.0	NNNNN,AG GAAT,NNNN	/5Phos/NNNNATTCTNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
i25	L25clip2.0	NNNNN,ATC AGT,NNNN	/5Phos/NNNNACTGATNNNNNAGATC GGAAGAGCGTCGTG/3ddC/
3'-RNA Linker	L3-App	-	/rApp/AGATCGGAAGAGCGGTTTCAG/ ddC/
RToligo	RT1	-	GGATCCTGAACCGCT
5'-Adapter	P5 Solexa	-	AATGATACGGCGACGTCCGAGATCT ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTT CCGATCT
3'-Adapter	P3 Solexa	-	AGATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGG AATGCCGAGACCGATCTCGTATGCC GTCTTCTGCTTG

6. Methoden

6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde vor allem verwendet, um den Zustand der in der IVT synthetisierten RNA zu überprüfen und zu dokumentieren. Hierfür wurde 1 % (w/v) Agarose mit 1x TBE aufgekocht. Für 1x TBE wurde 10x TBE (**Tabelle 14**) 1:10 mit ddH₂O gemischt. Sobald die aufgekochte Agarose auf ~ 60 °C abgekühlt war, wurde dem Gel Natriumhypochlorid (0,12 %) hinzugegeben. Dies bewirkte im Folgenden eine Denaturierung der RNA-Sekundärstrukturen und somit eine sauberere Auftrennung der RNAs. Während das Gel aushärtete (ca. 30 bis 60 min), wurde die Gelkammer mit 1x TBE befüllt. War das Gel ausgehärtet, wurde es in die Gelkammer mit Puffer gelegt, und der Kamm wurde gezogen. Zum Beladen der Gele wurden je Probe 150 bis 300 ng RNA, gemischt mit Ladepuffer (RNA Loading Dye, **Tabelle 3**), verwendet. Das Gel lief 60 min bei 90 V und wurde im Anschluss für ca. 10 min in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt und mittels UV-Licht und Kamera visualisiert und dokumentiert.

Tabelle 14: 10x TBE

Substanz	Konzentration
Tris	89 mM
H ₃ BO ₃	89 mM
EDTA·2H ₂ O	2 mM
ddH ₂ O	Ad. 1000ml

6.2 Erstellung viraler RNA

Die in dieser Arbeit verwendete virale Reporter-RNA wurde mittels *in vitro*-Transkription (IVT) synthetisiert. Hierfür wurde zunächst der Mengovirus Translationsreporter, bestehend aus der Mengovirus 5'-UTR, einem 11 Aminosäuren langen Linker (ATGGGAAGCAGATCTGGAGCGGCCGCCAGCGGC), dem ebenso 11 Aminosäuren langen HiBiT Fluoreszenz Reporter (GTGAGCGGCTGGCGGCTGTTCAAGAAGATCAGC) und der Mengovirus 3'-UTR in ein pUC18 Plasmid kloniert (Arbeit bei T. Gödert). Vor der 5'-UTR wurde ein T7-Promotor eingebaut, um die *in vitro*-Transkription zu ermöglichen. Bei der

Mengovirus 5'-UTR handelt es sich um die aus einer durch Deletion des Poly(C)-Traktes attenuierten Version aus Mengovirus (Ann C. Palmenberg). Von diesem Plasmid wurden vier verschiedene Versionen erstellt, basierend auf den GBEs in der 5'- und 3'-UTR, welche jeweils mutiert oder unverändert vorliegen. Zusätzlich wurden Konstrukte ausschließlich bestehend aus der jeweiligen 3'-UTR (UTR-Reporter) des Mengovirus oder des Theiler's Murine Encephalitis Virus verwendet. Die Sequenzen der WT und MT GBEs sind in **Tabelle 15** zu finden.

Tabelle 15: GBE-Sequenzen

Abschnitt	Sequenz 5' - 3'
MV 5'-GBE-WT	GCACAACCCCAGTGCC
MV 5'-GBE-MT	GCACT <u>ACC</u> GGTGTGCC
MV 3'-GBE-WT	CCGGTAAGCCAACCGG
MV 3'-GBE-MT	CCGGT <u>TAG</u> GGTACCGG
TMEV 3'-GBE-WT	CTAGAAGCCACTAGG
TMEV 3'-GBE-MT	CTAG <u>TAG</u> GGTCTAGG

Die entsprechenden Plasmide (**Tabelle 8**) wurden mittels Transformation in chemisch kompetente *E. coli* eingebracht, in LB-Medium mit dem Selektionsmarker Ampicillin vermehrt und mittels Kit zur Plasmidpräparation aufgereinigt. Für eine bessere Zugänglichkeit des T7-Promotors wurden die Plasmide linearisiert. Dies geschah mit dem Restriktionsenzym BciVI (bei den Translationsreportern) und BamHI (bei den UTR-Reportern). BciVI schneidet am Ende des im Plasmid kodierten Poly(A) Schwanzes so, dass am 3'-Ende der RNA keine anderen Nukleotide außer die Adenine des poly(A)-Schwanzes transkribiert werden. BamHI schneidet nach der letzten Base (T) der gewählten Sequenz. Die korrekte Prozessierung der Plasmide wurde anschließend auf einem Agarosegel überprüft. Anschließend wurde die geschnittene Plasmid-DNA mittels *in vitro*-Transkription in RNA überschrieben. Der IVT-Ansatz ist in der folgenden Tabelle (**Tabelle 16**) gelistet. Dieser Mix wurde bei 37 °C für 4 h inkubiert, anschließend wurde Turbo DNase (2 µl; 2 U/µl) hinzugegeben und bei 37 °C für weitere 30 min inkubiert. Zum Schluss wurde die erstellte RNA mittels MonarchKit aufgereinigt, die Konzentration per Qubit gemessen und die Integrität der RNA mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

Tabelle 16: IVT-Ansatz

Reagenzien	1x	Stock Konzentrationen
ATP	2 μ l	100 mM
GTP	2 μ l	100 mM
CTP	2 μ l	100 mM
UTP	2 μ l	100 mM
MgCl ₂	10 μ l	25 mM
RNA-Pol Buffer	5 μ l	10x
DTT	1 μ l	1 M
T7 RNA-Polymerase	2 μ l	50,000 u/ml
RNase Inhibitor	0.5 μ l	40,000 u/ml
IPP (E. coli)	0.5 μ l	100 u/ml
Plasmid DNA	1250 ng	
H ₂ O	Ad. 50 μ l	

6.3 RNA 3'-Biotinylierung und Streptavidin-Shift

Um die virale Reporter-RNA und ihre Bindungspartner gezielt aus einem Zelllysats aufzureinigen, wurde RNA am 3'-Ende mit Biotin markiert (Willkomm & Hartmann, 2012). Zunächst wurden 20 μ l aufgereinigte RNA aus der IVT mit 180 μ l KIO₄ (pH 7) eine Stunde lang bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der Reaktionsansatz eins zu eins mit Ethylenglycol (50 %) vermischt und die RNA anschließend wieder präzipitiert. Für diesen Schritt wurden zunächst 40 μ l NaOAc (3 M; pH 5,2) sowie 1 ml Ethanol (> 96 %) hinzugegeben und für 30 min bei < -20 °C inkubiert. Hierbei fiel die RNA aus, wurde anschließend für 30 min bei 4 °C mit 18.000 g pelletiert und danach dreimal mit 4 °C kaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Zum Pelletieren der RNA wurde 5 min bei 4 °C mit 18.000 g zentrifugiert. Unabhängig von der anfänglichen Skalierung wurde das RNA-Pellet von bis zu 3 nmol in 100 μ l Biotinamidocaproylhydrazide (10 mM) aufgenommen, gelöst und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Biotin wurde der Reaktion 100 μ l NaBH₄ (0,2 M) und 200 μ l Tris-HCl (1 M; pH 8,2) hinzugefügt und für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurde die nun 3'-Biotin-markierte RNA mittels MonarchKit aufgereinigt. Für den Nachweis der korrekten 3'-Biotinylierung wurde vor der Verwendung der Proben ein Streptavidin-Shift durchgeführt. Hierfür wurden 150 ng markierte RNA mit 0,5 bis 2 μ g flüssigem Streptavidin kombiniert. Zusätzlich musste die Reaktion noch 10 mM Tris

(pH 7,4), 2,5 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl enthalten. Dieser Ansatz wurde dann 15 min inkubiert, optional auf Eis (20 min), und am Ende wurde der Shift neben der unbehandelten RNA als Kontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Hierbei war es wichtig, intakte RNA sowie nach oben verschobene Banden der RNA gegenüber der Kontrolle ohne Streptavidin zu beobachten.

6.4 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden humane Zellen mit viraler Reporter-RNA transfiziert. Hierfür wurden HeLa Zellen, Epithelzellen aus einem Zervixkarzinom, verwendet. Die Inkubation der verwendeten Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer Zellkulturflasche (T175) mit einer Fläche von 175 cm² in einer einzelnen Zellschicht. Sobald die Zelldichte in der Flasche 80 % bis 90 % erreichte, waren die Zellen bereit, für Experimente verwendet zu werden oder mussten geteilt werden, um ein gesundes weiteres Wachstum der Zellen zu gewährleisten. Wurde eine Zelldichte von 90 % überschritten, war auf Dauer eine einzelne Zellschicht nicht mehr gewährleistet, und eine Kontaktinhibition der Zellen kann zum eingeleiteten Zelltod führen. Ebenso war es wichtig, mit dem Wechsel des Kulturmediums den Zellen regelmäßig neue Nährstoffe zu liefern. Die verwendeten HeLa Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % FBS und Penicillin (10 U/ml) /Streptomycin (10 µg/ml) (DMEM++) kultiviert. Zum Aufteilen aller Zellen einer Zellkulturflasche auf neue Flaschen wurde das Medium entfernt und die Flasche vorsichtig mit 10 ml PBS gespült, welches anschließend wieder entfernt wurde. Um die adhärenen Zellen von der Oberfläche abzulösen, wurde 4 ml Trypsin (0,25 %) mit EDTA (913 µM) gelöst in PBS auf die Zellen gegeben, durch Schwenken der Flasche verteilt und für 5 bis 7 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 6 ml DMEM++ hinzugegeben, um das Trypsin zu inaktivieren. Zellklumpen sollten durch auf und ab pipettieren vereinzelt werden, und zusätzlich sollte die gesamte innere Oberfläche der Flasche abgespült werden, um alle Zellen restlos in einer Suspension zu erhalten. Für ein einfacheres Vorgehen wurde das gesamte Gemisch in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Waren die Zellen aus mehrere Flaschen zu teilen, wurden alle Zellsuspensionen in einem Falcon-Röhrchen gesammelt, gut durchmischt und anschließend jeweils 1 ml wieder in jede benötigte Flasche überführt. Zum Schluss wurde jede Flasche, gefüllt mit 1 ml Zellsuspension, mit weiteren 24 ml DMEM++ aufgefüllt und für 2 bis 3 Tage bis zum nächsten Teilen oder bis zum Experiment im Brutschrank inkubiert.

6.5 Elektroporation und Pull-Down

Die HeLa Zellen wurden, wie zuvor beschrieben, in DMEM⁺⁺ kultiviert. Als erstes mussten die Zellen von der Flasche mittels Trypsin-EDTA abgelöst und gezählt werden. Pro Elektroporation wurden 10^7 Zellen benötigt, die zunächst in einem Falcon-Röhrchen mit 200 g für 5 min pelletiert wurden. Die Zellen wurden gewaschen, indem man den Überstand abkippte, das Pellet in 10 ml OptiMEM suspendierte und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugierte. Dies wurde dreimal wiederholt. Pro Reaktion wurden nun 600 µl OptiMEM auf das Zellpellet gegeben und das Pellet resuspendiert. Für die Elektroporation wurden Küvetten mit 4 mm Wandstärke verwendet, welche mit 600 µl der Zellsuspension (10^7 Zellen) und 80 pmol RNA befüllt wurden. Die Zellen wurden mit einem Strompuls mit der Spannung 240 V für 20 ms in einem „square wave“ Muster geschockt und so für die sich in der Küvette befindende RNA permeabel gemacht. Die elektroporierten Zellen wurden zunächst mit 1 ml DMEM⁺⁺ resuspendiert und in eine 15 cm² Zellkulturschale überführt. Zuletzt wurde nochmal 12 ml DMEM⁺⁺ hinzugegeben, und die Schalen wurden 1 h im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Nach der Inkubation von nur 1 h nach der Elektroporation waren noch nicht alle Zellen wieder adhäriert. Daher wurde das Medium mit den noch nicht adhärierten Zellen in der Flasche belassen, die schon adhären Zellen mit einem Zellschaber von der Schale gelöst und dann alle Zellen zusammen mit dem gesamten Medium in einem passenden Gefäß gesammelt, um alle Zellen zu pelletieren und 1 bis 2-mal mit PBS zu waschen. Die Zentrifugation zum Waschen sollte mit 200 g für 5 min erfolgen. Zwischen den Waschschrritten und am Ende wurde der Überstand vom Zellpellet abgekippt. Die nun gewaschenen Zellen wurden in 1 ml Lysepuffer (**Tabelle 17**) resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C rollend für 20 min inkubiert. Der Lysepuffer sollte einen Proteaseinhibitor enthalten, um die sensiblen Zielproteine zu schützen. Um die nun freie RNA aus dem Zytosol mit ihren Bindungspartnern von den restlichen Zelltrümmern zu trennen, wurde die gesamte Suspension für 10 min bei 4 °C mit 10.000 g zentrifugiert, um Kerne und Zelltrümmer zu pelletieren, und der Überstand, welcher die RNA mit Bindungspartnern enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Hiervon wurden 2,5 % des Volumens in ein weiteres neues Reaktionsgefäß überführt, dies diente später als Ladekontrolle (Input) für den Western Blot. Über die 3'-Biotin-Markierung konnte die virale Reporter-RNA mit ihren Bindungspartnern an Plastik Kügelchen, "Beads" (High Capacity NeutrAvidin-Beads), gebunden werden und somit hoch spezifisch isoliert werden. Um unspezifische Bindungen an die Beads zu reduzieren, wurden diese im Vorfeld geblockt. Pro Reaktion wurden 40 µl Beads in ein Reaktionsgefäß überführt und mit physiologischem Wasch Puffer (PWB; **Tabelle 18**) dreimal mit 10.000 g für 1 min gewaschen. Der Überstand wurde jedes Mal verworfen. Zum Blocken

der Beads wurde eine Mischung (**Tabelle 19**) aus Serumalbumin (Rind; BSA), tRNA und Glykogen verwendet, in welcher die Beads bei 4 °C rollend über Nacht inkubiert wurden. Vor der Verwendung mussten die Beads unter gleichen Bedingungen erneut, wie vor dem Blocken, dreimal mit PWB gewaschen werden. Die so geblockten und gereinigten Beads wurden mit dem abzentrifugierten Überstand nach Zellyse für 1 h bei 4 °C und mit Zugabe von Proteaseinhibitor (cOmplete tablets, Mini, EDTA free) inkubiert. Nach der Bindung der biotinylierten RNA an die Beads wurden diese viermal gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift wurde das gesamte Gemisch in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Waschen der RNA wurde PWB mit Proteaseinhibitor (cOmplete tablets, Mini, EDTA free) verwendet, und es wurde bei 4 °C mit 10.000 g für 2 min zentrifugiert. Nach dem Waschen sollte die Flüssigkeit vorsichtig und restlos von den Beads entfernt werden. Um dann die an die RNA gebundenen Zielproteine freizusetzen, wurde das Beads-RNA-Gemisch 1 min mit 30 µl SDS (1 %) und 100 mM NaCl inkubiert und dann erneut mit 10.000 g für 1 min zentrifugiert. Die gewünschten Proteine befanden sich jetzt im Überstand, welcher sofort in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Dieser Überstand wurde anschließend für Western Blot und MassSpec verwendet.

In dieser Arbeit wurden Elektroporation und Pull-Down in der doppelten Menge durchgeführt und die Proben nach der Freisetzung der Proteine 50/50 aufgeteilt, um dieselbe Probe für einen Western Blot und MassSpec nutzen zu können.

Tabelle 17: Lysispuffer

Substanz	Konzentration
Tris-HCl, pH 7.5	20 mM
NaCl	150 mM
Nonidet P-40	0,50 %
EDTA	2 mM
DTT	0,5 mM
NaF	1 mM
Pefabloc	1 mM

Tabelle 18: Physiologischer Waschpuffer (PWB)

Substanz	Konzentration
KCl	150 mM
HEPES pH 7,5	20 mM
DTT	1 mM
MgCl ₂	1 mM
Nonidet P-40	0,01 %

Tabelle 19: Blockinglösung für Beads

Substanz	Volumen	Konzentration	Final
PWB	200 µl		
tRNA	40 µl	5 mg/ml	200 µg/ml
BSA	10 µl	20 mg/ml	200 µg/ml
Glykogen	10 µl	20 mg/ml	200 µg/ml
DTT	10 µl	1 M	10 mM
ddH ₂ O	730 µl		

6.6 Western Blot (WB)

Um die aufgereinigten Proteine im Western Blot zu visualisieren, mussten diese erst der Größe nach über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Da sich die Zielproteine sehr stark in ihrer Masse (36 bis 250 kDa) unterscheiden, wurde für das Trenngel ein Gradientengel mit 6 bis 20 % Acrylamid verwendet (**Tabelle 21 & Tabelle 22**). Für die Erstellung des Gradientengels mussten zunächst zwei Trenngel-Lösungen mit 6 % und 20 % Acrylamid angesetzt werden. Um das Gradientengel zu gießen, wurden zuerst in einer mindestens 10 ml großen Pipette 4 ml der 6 %-igen Lösung aufgezogen, dann 4 ml der 20 %-igen Lösung. Anschließend wurde die Pipette in einem ca. 45° Winkel zum Tisch gehalten, und 1 bis 2 große Luftblasen wurden durch die Pipette gezogen. Hier sollte jetzt ein Mischen der beiden Lösungen erkennbar gewesen sein. Nachdem dies erfolgt war, wurde die gemischte Lösung langsam zwischen die Glasplatten gegossen und anschließend für eine gerade Kante mit 500 bis 1.000 µl Isopropanol überschichtet. War das Gradientengel ausgehärtet, wurde das Isopropanol entfernt, und ein 6 % Sammelgel (**Tabelle 24**) wurde auf das Gradientengel gegossen. Als Größenstandard (Proteinmarker) wurde Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10 - 250 kDa) von NEB

verwendet. Bevor die Proben aus dem Pull-Down aber zur Auftrennung auf das Gel geladen werden konnten, mussten die Proben zunächst mit 4x Laemmlipuffer (**Tabelle 25**) vermischt (final 1x) und anschließend 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht werden. Vor dem Laden wurden die Proben nochmals kurz abzentrifugiert, um eventuell noch vorhandene Beads oder Aggregate, welche nicht auf das Gel geladen werden sollten, zu sedimentieren. Pull-Down und Input-Proben wurden auf separaten Gelen laufen gelassen. Vom Proteinmarker wurden 3,3 µl und von den Proben 40 µl (30 µl Probe + 10 µl 4x Laemmlipuffer) geladen, die Kammer mit Laufpuffer (**Tabelle 27**) befüllt und bei 100 V für 30 min (bis das Sammelgel durchquert war) einlaufen gelassen. Für das Trenngel wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Optimalerweise sollte das Gel im Kühlraum laufen. Die Laufdauer war anhand der Banden des Proteinmarkers zu wählen. Für diesen Versuch wurde eine Zeit von ca. 3 h gewählt, bis mindestens die 17 kDa Bande des Proteinmarkers aus dem Gel gelaufen ist. Geblottet wurde in dem Wet-Blot System von Bio-Rad. Hier wurde der Blot wie folgt von schwarz nach transparent aufgebaut (**Abb. 36**): Schwamm, zwei Whatman Papiere, Gel, Nitrozellulosemembran (0,2 µm Porengröße), zwei Whatman Papiere und zuletzt nochmal ein Schwamm. Alle Komponenten wurden während des Zusammenbaus in kaltem Transferpuffer (**Tabelle 29**) eingeweicht. Der zusammengebaute Blot wurde mit einem Kühlakku versehen, mit Transferpuffer aufgefüllt und im Kühlraum bei einer Stromstärke von 280 mA für 90 min laufen gelassen. Pull-Down und Input-Proben wurden auf separaten Gelen laufen gelassen. Nach 90 min wurde die Membran entnommen und zum Blocken von unspezifischen Bindungen in 5 % Milchpulver, gelöst in PBS-T (0,1 % Tween20, **Tabelle 31**), entweder für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membran sollte immer schwenkend inkubiert oder gewaschen werden, um eine gleichmäßige Verteilung der entsprechenden Lösungen über der Membran zu gewährleisten. Die geblockte Membran wurde als nächstes für die spezifischen Antikörperfärbungen in unterschiedliche Fragmente geschnitten, um den Hintergrund der jeweiligen Membranen gering zu halten. In dieser Arbeit wurden Primärantikörper (**Tabelle 7**) gegen eIF4G1 (250 kDa; 1:10.000), GARS (83 kDa; 1:20.000), GAPDH (36 kDa; 1:5.000), PABP (71 kDa; 1:5.000) und DAP5 (97 kDa; 1:10.000) verwendet. Hierfür wurde zwischen den Proteinmarkerbanden 130 kDa und 95 kDa sowie zwischen 55 kDa und 43 kDa geschnitten. Die entsprechenden Membranstücke wurden in frischer Blocklösung und dem entsprechenden Antikörper für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranstücke mit PBS-T (0,1 % Tween20) dreimal für je 5 min gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper (α -Maus; 1:10.000; **Tabelle 7**) für 1 h bei RT inkubiert. Für die Visualisierung der HRP-konjugierten Antikörper wurde Chemilumineszenz-Substrat verwendet, wahlweise Substrat mit normaler Sensitivität (Amersham ECL Detection Reagents) oder Substrat mit hoher Sensitivität (Thermo

Scientific™ SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrat). Die Membranen wurden 5 min im Dunklen mit dem entsprechenden Substrat inkubiert, bevor sie mit dem ChemiDoc (Bio-Rad) visualisiert wurden. Für den Proteinmarker wurde eine Aufnahme mit Colorimetric und für die Antikörperbanden eine Aufnahme mit Chemilumineszenz angefertigt. Diese beiden Aufnahmen wurden anschließend von der Gerätesoftware automatisiert und positionskorrekt miteinander kombiniert, um Banden und Proteinmarker gemeinsam in einem Bild darzustellen.

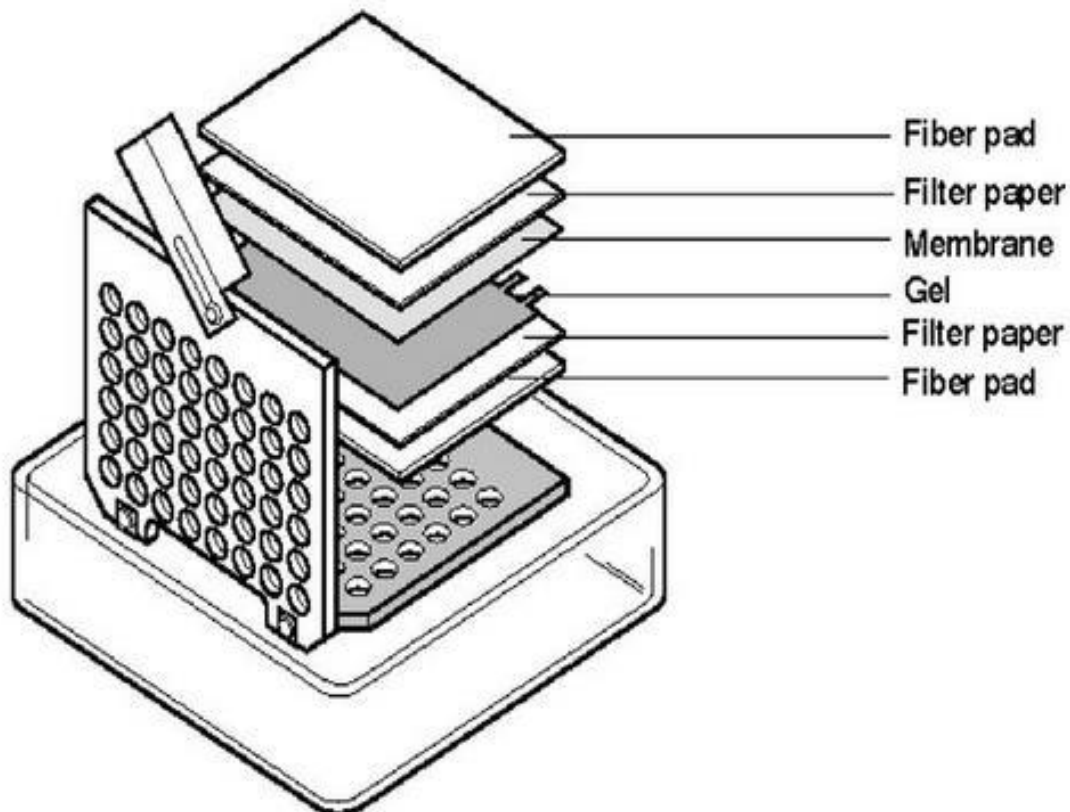


Abb. 36: Schematischer Zusammenbau eines Wet-Blot. Die Reihenfolge der Komponenten eines Wet-Blots des Bio-Rad Systems ist hier dargestellt.

Tabelle 20: Tris 1,5 M

Substanz	Menge
Tris	36,3 g
H ₂ O	200 ml
NaOH	pH 8,8

Tabelle 21: Trenngel 6 %

Substanz	Konzentration	Menge
dd H ₂ O		4,6 ml
Acrylamid	40 %	1,2 ml
Tris	1,5 M, pH 8,8	2 ml
SDS	10 %	80 µl
APS	10 %	80 µl
TEMED		8 µl

Tabelle 22: Trenngel 20 %

Substanz	Konzentration	Menge
dd H ₂ O		1,8 ml
Acrylamid	40 %	4 ml
Tris	1,5 M, pH 8,8	2 ml
SDS	10 %	80 µl
APS	10 %	80 µl
TEMED		8 µl

Tabelle 23: Tris 0,5 M

Substanz	Menge
Tris	12 g
H ₂ O	200 ml
mit HCl eingestellt auf:	
	pH 6,8

Tabelle 24: Sammelgel 6 %

Substanz	Konzentration	Menge
dd H ₂ O		2,9 ml
Acrylamid	40 %	0,75 ml
Tris	0,5 M, pH 6,8	1,25 ml
SDS	10 %	50 µl
APS	10 %	50 µl
TEMED		5 µl

Tabelle 25: 4x Lämmli-puffer (Proben-Auftragspuffer)

Substanz	Konzentration
Tris	0,25 M, pH 6,8
SDS	8 %
Glycerol	40 %
β-Mercaptoethanol	20 %
Bromphenol Blau	4 mg/ml

Tabelle 26: 10x Laufpuffer

Substanz	Menge
Tris	30,275 g
Glycin	144 g
SDS	1 %
H ₂ O	Ad. 1 l

Tabelle 27: 1x Laufpuffer

Substanz	Menge
10x Laufpuffer	100 ml
H ₂ O	900 ml

Tabelle 28: 10x Transferpuffer

Substanz	Menge
Tris	30,275 g
Glycin	144 g
H ₂ O	Ad. 1 l

Tabelle 29: 1x Transferpuffer

Substanz	Menge
10x Transferpuffer	100 ml
Methanol	200 ml
H ₂ O	700 ml

Tabelle 30: 10x PBS

Substanz	Konzentration
NaCl	1,37 M
Na ₂ HPO ₄	100 mM
KCl	27 mM
KH ₂ PO ₄	18 mM
mit HCl eingestellt auf:	
	pH 7,4
ddH ₂ O	ad 1 L

Tabelle 31: PBS-T

Substanz	Menge
10x PBS	100 ml
TWEEN20	1 ml
ddH ₂ O	900 ml

6.7 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ("MassSpec") Proben wurden, wie oben beschrieben, mit dem Biotin/Pull-Down-Verfahren aufgereinigt und vor der Weiterverarbeitung in Western Blot oder MassSpec 50/50 aufgeteilt. Parallel durchgeführte Western Blots und Massenspektrometrie-Analysen erhielten ihre Proben also aus exakt denselben optimierten Pull-Down-Experimenten. Die MassSpec Proben wurden bei -20 °C gelagert und zur weiteren Verarbeitung nach Marburg (PUM) an die Arbeitsgruppe von Dr. Uwe Linne gegeben. Die in 1 % SDS mit 100 mM NaCl gelagerten Proben wurden zur Reduktion 15 Minuten bei 90 °C mit 5 mM Tris-(2-Chlorethyl)-Phosphat inkubiert. Anschließend wurden die abgekühlten Proben abzentrifugiert und für weitere 30 Minuten bei RT im Dunkeln mit 10 mM Iodacetamid inkubiert. Zur weiteren Aufreinigung der Proben wurden verschiedene SP3 Beads (GE65152105050250 und GE45152105050250) zu gleichen Teilen kombiniert (je 20 µl). Die benötigten Beads wurden vor der Verwendung drei Mal zum Waschen mit je 200 µl Wasser gevortext und anschließend mittels Magneten vom Wasser getrennt. Die gewaschenen Beads wurden zum Schluss nochmals in 100 µl Wasser gelöst. Je 4 µl der Beadsuspension wurden mit 25 µl Probe und 29 µl Acetonitril bei RT schüttelnd für 15 Minuten inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Beads mittels Magneten immobilisiert und der Überstand wurde zum Waschen zweimal durch 500 µl Ethanol (70 %) ersetzt. Gefolgt darauf wurden die Beads noch zweimal mit 200 µl Acetonitril gewaschen und am Ende getrocknet. Die getrockneten Beads wurden in 100 µl Ammoniumbicarbonatpuffer (50 mM, pH 8,0) resuspendiert, mit Trypsin (0,1 µg in 50 µl Ammoniumbicarbonatpuffer) versetzt und bei 30 °C mit 1200 rpm über Nacht inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Beads erneut mittels Magneten von der Flüssigkeit getrennt und der entfernte Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die übrigen Beads wurden für 5 Minuten in einem Ultraschallbad mit 30 µl DMSO (2 %) inkubiert. Wie zuvor wurden die Beads erneut von der Flüssigkeit getrennt und der entfernte Überstand wurde zu dem vorher überführten Überstand zugegeben. Die Beads wurden im Anschluss in 30 µl Wasser mittels Vortexen suspendiert, wieder an einen Magneten gebunden, und das Wasser wurde entfernt und zu den beiden zuvor überführten Überständen beigegeben. Die kombinierten Überstände jeder Probe wurden mit 10 µl Trifluoressigsäure (5 %) ergänzt und vermischt. Mit Chromabond C18WP-Spinsäulen (Macherey-Nagel, Nr. 730522) wurden die Proben nach Herstellerprotokoll entsalzt und konzentriert. Zum Schluss wurden die Proben mit 10 µl Wasser mit Acetonitril (5 %) und Ameisensäure (0,1 %) eluiert.

Die Analyse der Proben wurde mittels timsTOF Pro mass spectrometer (Bruker Daltonic) durchgeführt. An das Massenspektrometer ist ein nanoElute HPLC-System (Bruker Daltonic)

mit einer Aurora C18 RP Säule (25 cm x 75 µm ID), gefüllt mit 1,7 µm Beads (IonOpticks), angeschlossen. Je Probe wurden 2 µl mit einem konstanten Druck von 800 bar geladen. Die Peptide wurden durch eine Säule mit der Temperatur von 60 °C und einem Gradienten von Wasser/0,1 % Ameisensäure (Lösung A) und Acetonitril/0,1 % Ameisensäure (Lösung B) mit einer Fließgeschwindigkeit von 400 nl/min getrennt. Lösung B wurde über 18 Minuten linear von 2 % auf 17 % erhöht, im Anschluss über weitere 9 Minuten linear auf 25 % erhöht, für weitere 3 Minuten dann linear auf 37 % erhöht und über weitere 10 Minuten auf finale 95 % erhöht. Diese 95 % werden dann für 10 min gehalten. Für die Messung wurde die von Breuker Daltonics entwickelte „DDA PASEFstandart_1.1sec_cycletime“ Methode verwendet.

Die Analyse und Visualisierung der MassSpec Daten erfolgte durch Dr. Axel Weber aus der AG von Prof. Dr. Michael Kracht (JLU). Hierfür wurde die MaxQuant Version 2.5.1.0 verwendet, und die Peptidsequenzen wurden auf alle humanen Proteine aus der Uniprot Datenbank (2024.04) gemappt (Tyanova, Temu & Cox, 2016). Um die Daten weiter zu verarbeiten, wurde Perseus Version 1.6.15 verwendet (Tyanova, Temu & Sinitcyn *et al.*, 2016). Die Proteinintensität wurde log₂-transformiert und mittels Violinplot in Graphpad Prism Version 9.5.1 visualisiert. Die Proben wurden nicht normalisiert. Um die Verhältnisse zwischen den Proben darzustellen, wurden fehlende Werte mit dem log₂ von 9 (~ 3,17) ersetzt, da dieser dem ersten ganzzahligen Wert unter dem am niedrigsten gemessenen Wert aller Proben entspricht. Um definitive Unterschiede zwischen den Proben im Vergleich zum Wildtyp zu finden, wurde ein Signifikanzniveau von $-\log_{10} > 1,3$ ($p < 0,05$ %) oder > 1 ($p < 0,1$ %) gewählt. Die Liste der Proteine wurde gefiltert, und eine Analyse des Proteinnetzwerks wurde mittels STRING (<https://string-db.org>, Version 12.0) durchgeführt. Zur Visualisierung der Proteinnetzwerke wurde Cytoscape Version 3.10.3 und StringApp Version 2.1.1 verwendet (Shannon *et al.*, 2003; Doncheva *et al.*, 2019).

6.8 Test IP (pre-test-CLIP)

Vor der Durchführung des CLIP mussten einige Versuchsbedingungen vorab experimentell getestet und bestimmt werden. Als erstes musste die NaCl Konzentration des Waschpuffers für die Immunpräzipitation (IP) zum Waschen der Proben getestet werden. Ziel war, mit höchster Stringenz zu waschen, ohne die gebundenen Proteine zu verlieren. Getestet wurden NaCl Konzentrationen von 600 mM (**Tabelle 32**), 800 mM (**Tabelle 33**) und 1.000 mM (**Tabelle 34**). Es wurden Dynabeads Protein A sowie ein GARS-Antikörper und als Kontrolle ein FLAG-Antikörper verwendet. Als erstes mussten 120 µl Beads, 20 µl pro Reaktion, zwei Mal

mit kaltem TBS150-T (0,05 % Tween20, **Tabelle 35**) gewaschen werden. Zum Waschen wurden die Reaktionsgefäße mit den Beads auf eine Haltevorrichtung mit Magneten fixiert. Die magnetischen Beads wurden von den Magneten immobilisiert und von der gesamten Flüssigkeit im Reaktionsgefäß getrennt, somit konnte die Flüssigkeit ersetzt werden, ohne die Beads und die daran gebundenen Antikörper zu entfernen. Um die gewünschten Antikörper an die Beads zu binden, wurden 50 % der Beads mit 9 µg GARS-Antikörper und die anderen 50 % der Beads mit dem FLAG-Antikörper (Kontrolle) mit je 300 µl TBS150-T für 2 h bei 4 °C rollend inkubiert. Während der Bindung der Antikörper an die Beads war das Zellysats vorzubereiten. Konfluente 15 cm² Schalen mit HeLa Zellen (ca. 6,6 x 10⁶ pro Probe) wurden zunächst vom Medium befreit, die Zellen mit einem Zellschaber von der Schale gekratzt und in 1 ml PBS aufgenommen. Die Zellen wurden mit 400 g bei 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde gewogen und RIPA-Puffer (**Tabelle 36**) wurde in der 4-fachen Menge (Gramm entspricht Milliliter) des Zellgewichtes hinzugegeben und die Zellen gründlich resuspendiert. Diese Suspension wurde 10 min auf Eis gelagert, dabei alle 3 min gevortext und anschließend 20 min bei 4 °C mit 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5 % des Volumens wurde als Ladekontrolle (Input) in einem zusätzlichen Reaktionsgefäß mit Laemmlipuffer für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und dann aufgehoben. Der RIPA-Suspension wurde das Doppelte ihres Volumens an RQ1-Puffer (**Tabelle 37**) hinzugefügt. Vor der Inkubation des Zellysats mit den Beads wurde der Suspension noch 1/50 ihres Gesamtvolumens an 5 M NaCl zugegeben, und der Ansatz wurde zentrifugiert, um eventuell mit überführte Zelltrümmer zu entfernen. Die Zentrifugation lief für 5 min bei 4 °C mit 25.000 g. Nun wurden die Beads (3 x GARS & 3 x FLAG) mit der RIPA-RQ1-Zellsuspension für 2 h bei 4 °C rollend inkubiert. Nach dem Binden an der Beads an die Antikörper mussten pro Antikörper drei Proben, eine für jede der drei NaCl-Konzentrationen, mit gleicher Ausgangsmenge an Zellen vorhanden sein. Pro Antikörper wurde jetzt je eine Probe mit 600 mM, eine mit 800 mM und eine mit 1.000 mM NaCl viermal gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift war das Reaktionsgefäß von jeder Probe zu wechseln. Der Waschpuffer war während des Waschens auf Eis zu lagern. Anschließend wurden die Beads noch zweimal mit PNK-Puffer (**Tabelle 38**) gewaschen und konnten dann mit Laemmlipuffer aufgeköcht werden. Jetzt waren die gebundenen Proteine von den Beads abgelöst und der Lämmliüberstand konnte für einen Westernblot (s.o.) auf ein SDS-Gel geladen werden. Zur Visualisierung wurde nur der GARS-Antikörper verwendet. Die schwere Kette der IP-Antikörper wurde vom Sekundärantikörper gebunden. Das Ziel war eine möglichst hohe NaCl Konzentration im IP-Waschpuffer, um unspezifisch gebundene Proteine möglichst gut wegzuwaschen, ohne aber die Bindung von Beads, Antikörper und Zielprotein zu

lösen. Hierfür ergab sich aus dem Test eine optimale Konzentration von 1.000 mM NaCl im Waschpuffer (**Abb. 37**).

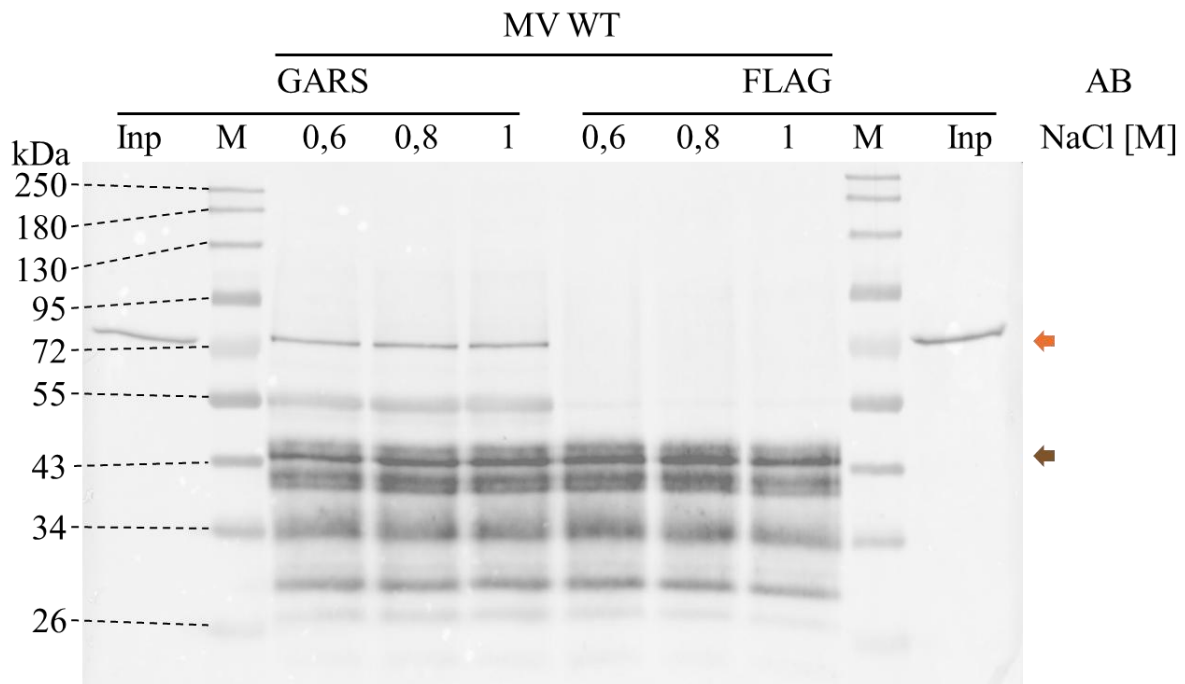


Abb. 37 Test IP zu Bestimmung der NaCl Konzentration des Waschpuffers. 80 pMol MV WT-RNA wurden mittels Elektroporation in 10 Mio. Zellen transfiziert und nach der Inkubation lysiert. Das Lysat wurde von Zellresten befreit und mit Dynabeads™ Protein A für Immunpräzipitation mit gebundenem GARS-Antikörper (3 µg/Probe) inkubiert. Um die Funktion des GARS-Antikörpers für die IP zu überprüfen, wurden zusätzlich Beads mit gebundenem FLAG-Antikörper (3 µg/Probe) verwendet. Zum Test der NaCl Konzentration wurden 600 mM, 800 mM und 1000 mM verwendet. Zur Kontrolle wurde vor der Inkubation mit den Beads eine Ladekontrolle (Inp) in Höhe von 5 % des Lysats aufgehoben. Das Bead-Antikörper-Lysat-Gemisch wurde mit den jeweiligen NaCl Konzentrationen und PNK-Lösung gewaschen, mit Ladepuffer gemischt, mittels SDS-Gel aufgetrennt und über einen Western Blot visualisiert. Die Konzentration von 1.000 mM NaCl erwies sich als optimal. Die GARS-Bande ist mit einem orangenen Pfeil markiert und die Bande der schweren Kette des IP-AK (55 kDa) ist mit einem braunen Pfeil markiert.

Nach der Bestimmung der optimalen NaCl Konzentration wurde der Versuch nochmals mit drei verschiedenen GARS-Antikörperkonzentrationen, 0,5 µg, 1 µg und 3 µg, wiederholt, diesmal ohne FLAG-Antikörper in der IP. Hier wurde die optimale Menge an GARS-IP-Antikörper getestet, um möglichst viel GARS an den Antikörper binden zu können, ohne schmierende Western Blot-Banden zu erzeugen. Die optimale Menge betrug 3 µg (**Abb. 38**).

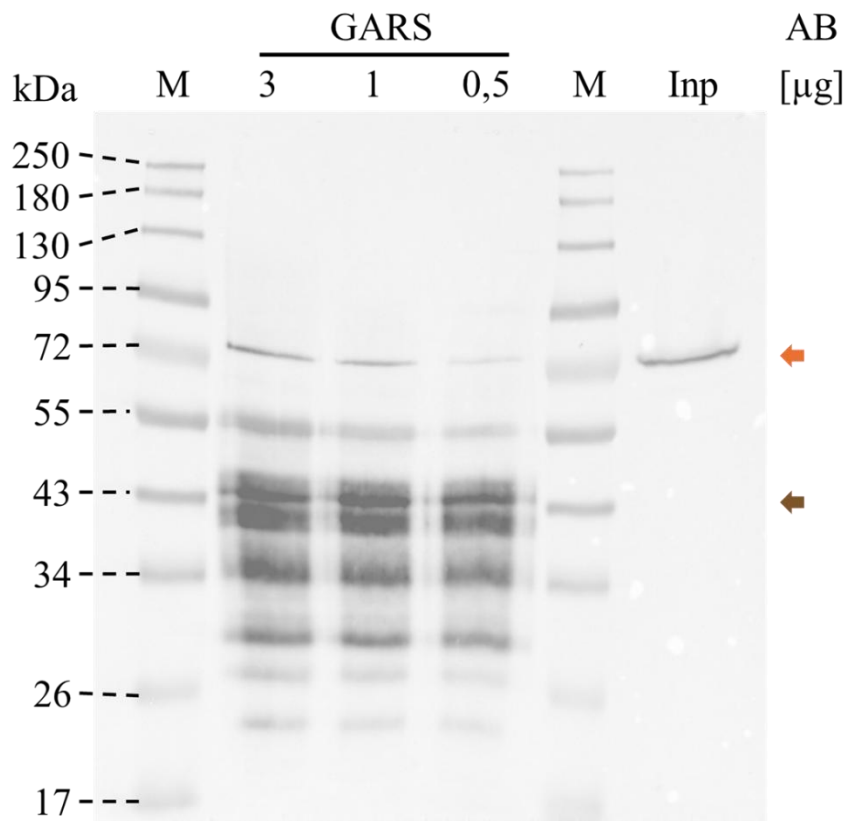


Abb. 38 Test IP zu Kontrolle des Antikörpers und der zu verwendenden Menge. 80 pMol MV WT-RNA wurden mittels Elektroporation in 10 Mio. Zellen transfiziert und nach der Inkubation lysiert. Das Lysat wurde von Zellresten befreit und mit Dynabeads™ Protein A für Immunpräzipitation mit gebundenem GARS-Antikörper inkubiert. Zum Test der GARS-Antikörper-Menge wurden 3, 1 und 0,5 µg Antikörper verwendet. Zur Kontrolle wurde vor der Inkubation mit den Beads eine Ladekontrolle (Inp) in Höhe von 5 % des Lysats aufgehoben. Das Beads-Antikörper-Lysat-Gemisch wurde mit 1000 mM NaCl und PNK-Lösung gewaschen, mit Ladepuffer gemischt, mittels SDS-Gel aufgetrennt und über einen Western Blot visualisiert. Die Menge von 3 µg GARS-AK zeigte sich als beste Wahl aufgrund der Bandenstärke. Die GARS-Bande ist mit einem orangen Pfeil markiert und die Bande der schweren Kette des IP-AK (55 kDa) ist mit einem braunen Pfeil markiert.

Tabelle 32: TBS600-T

Substanz	Konzentration
Tris pH 7,4	50 mM
NaCl	600 mM
TWEEN20	0,05 %

Tabelle 33: TBS800-T

Substanz	Konzentration
Tris pH 7,4	50 mM
NaCl	800 mM
TWEEN20	0,05 %

Tabelle 34: TBS1.000-T

Substanz	Konzentration
Tris pH 7,4	50 mM
NaCl	1 M
TWEEN20	0,05 %

Tabelle 35: TBS150-T

Substanz	Konzentration
Tris pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
TWEEN20	0,05 %

Tabelle 36: RIPA-Puffer

Substanz	Konzentration
Tris	50 mM
Nonidet P-40	1 %
SDS	0,1 %
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM
cOmplete tablets, Mini, EDTA free	1x

Tabelle 37: RQ1-Puffer

Substanz	Konzentration
Tris pH 8	40 mM
MgSO ₄	10 mM
CaCl ₂	1 mM

Tabelle 38: PNK-Puffer

Substanz	Konzentration
Tris pH 7,5	70 mM
MgCl ₂	10 mM
NP-40	0,05 %

6.9 Test CLIP

Der Test CLIP wurde unter Aufsicht von Yannic Noe im Labor der AG Roßbach angefertigt. Ziel des Test CLIPs war die experimentelle Bestimmung der benötigten RNase I Konzentration, um die RNA in passende Stücke zu fragmentieren. Zu Beginn wurden ähnlich zu der Test IP 240 µl Dynabeads Protein A (40 µl pro Reaktion) zweimal mit kaltem TBS150-T gewaschen. Anschließend wurden 50 % der Beads mit 9 µg GARS-Antikörper und 1 ml PBS, die restlichen 50 % mit 9 µg FLAG-Antikörper 1 ml PBS, rollend bei 4 °C für 2 h inkubiert. Pro Antikörper wurden insgesamt 20×10^7 Zellen mit je 40 µg viraler Reporter-RNA wie oben beschrieben elektroporiert und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer 15 cm² Schale inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit dem Medium in ein 50 ml Falcon überführt und wie oben beschrieben pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde restlos entfernt, das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und auf einer Zellkulturschale (8 cm²) gleichmäßig verteilt und in ein Eisbad gestellt. Die resuspendierten Zellen wurden dreimal mit UV-Licht (254 nm; 300 mJ/cm²) bestrahlt. Zwischen den einzelnen Bestrahlungen wurden die Zellen vorsichtig erneut resuspendiert und zum Schluss abgeschabt und bei 4 °C mit 400 g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde restlos entfernt. Die Pellets wurden, wie bei der Test IP, gewogen und zur Lyse mit dem vierfachen Volumen RIPA-Puffer versetzt, inkubiert und zuletzt die Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 5 % des Überstandes wurden als Input in ein separates Reaktionsgefäß überführt und mit LDS-Ladepuffer (**Tabelle 39**) vermischt. Der restlichen 95 % beider Proben wurden, wie aus der

Test IP bekannt, mit dem doppelten Volumen RQ1-Buffer vermischt. Anschließend wurde beiden Proben TURBO DNase (1:500 v) und RNase OUT (1:1.000 v) zugegeben.

Um die benötigte RNase I Menge zu testen, mussten die beiden Ansätze für die verschiedenen Antikörper gedrittelt und in neue Reaktionsgefäße überführt werden. Die RNase I (100 U/ml) wurde mit RQ1-Puffer auf 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} verdünnt. Pro Antikörperansatz wurde je eine Probe mit einer der RNase Verdünnungen (1:100 v) versetzt, dies entspricht den finalen RNase I Konzentration von 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} U/ml. Nach Zugabe der RNase wurden die Lysate 3 min bei 37 °C schüttelnd (800 rpm) inkubiert und direkt danach auf Eis gestellt (> 3 min). Bevor die Proben mit den entsprechenden Antikörper-Bead-Verbindungen inkubiert wurden, wurde noch 5 M NaCl (1:50 v) hinzugegeben und, wie in der Test IP, eventuell überführte Zelltrümmer erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit den entsprechenden Bead-Antikörper-Mischungen rollend für 2 h bei 4 °C inkubiert. Nach der Bindung an die Beads wurde erneut, wie für die Test IP beschrieben, viermal mit TBS1.000-T (1.000 mM NaCl, 0,05 % Tween20) und zweimal mit PNK-Puffer gewaschen. Der Puffer wurde restlos entfernt und die Beads in 10 µl PNK-Mix (**Tabelle 40**) suspendiert und bei 37 °C für 20 min inkubiert. Anschließend wurde erneut gewaschen, einmal mit TBS1.000-T und einmal mit PNK-Puffer. Die Proben wurden in 30 µl LDS-Ladepuffer aufgenommen und für 10 min bei 70 °C schüttelnd denaturiert, bevor sie auf ein 6 % bis 12 % Gradienten NuPAGE System Gel (Invitrogen) geladen wurden. Die Auftrennung der Proben fand für ungefähr 2 h bei 200 V statt. Nach dem Lauf wurden die aufgetrennten Proteine mit der gebundenen RNA von dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm Porengröße) geblottet (1 h, 30 V). Für die Visualisierung wurde die radioaktive Membran drei Tage auf Röntgenfilme aufgelegt. Hierbei wurde eine finale RNase I Konzentration von 0,1 U/ml bestimmt (**Abb. 39 B Probe 2**)

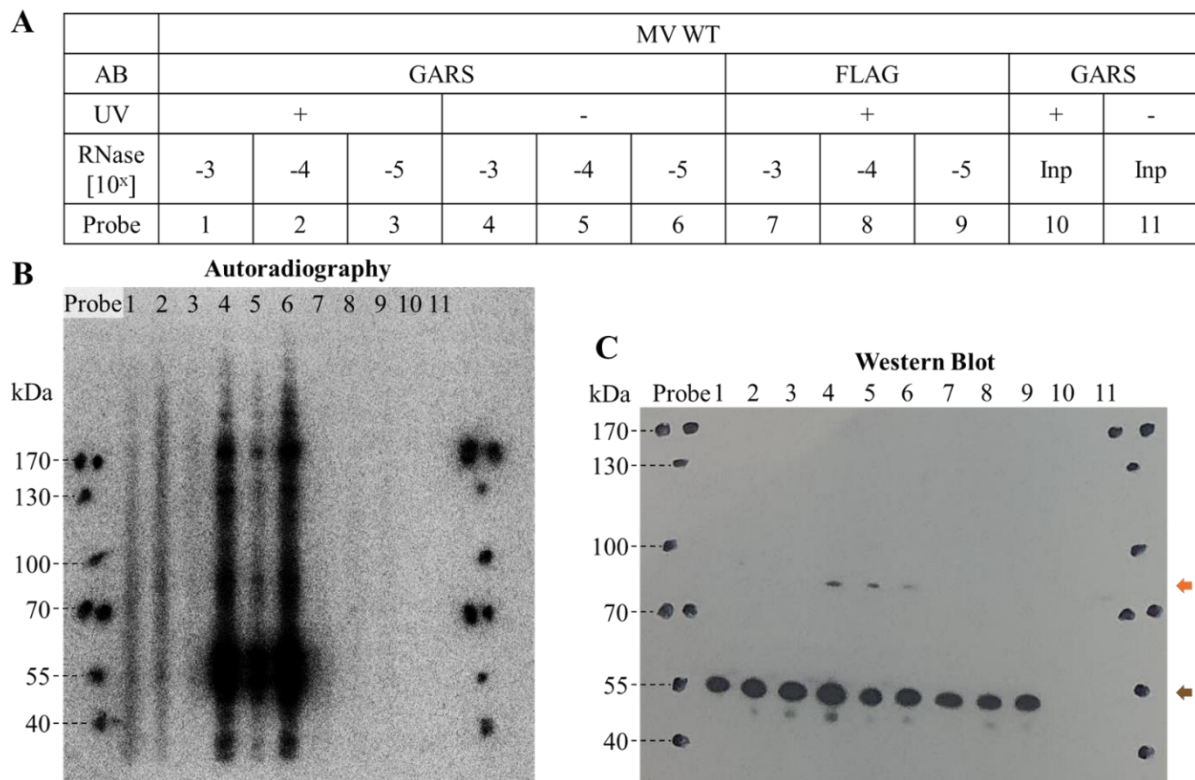


Abb. 39 Bestimmung der optimalen RNase Konzentration für iCLiP2. 80 pMol MV WT-RNA wurden mittels Elektroporation in 10 Mio. Zellen transfiziert und nach der Inkubation lysiert und mit UV bestrahlt (254 nm, 300 mJ/cm²). Als Kontrolle wurde ebenfalls ein Teil der Proben nicht mit UV behandelt. Nach der UV-Behandlung wurden die Proben resuspendiert und mit TURBO DNase (2 U/μl) und mit drei verschiedenen Konzentrationen (10⁻³, 10⁻⁴ und 10⁻⁵) RNase (100 U/μl) behandelt. Das Lysat wurde von Zellresten befreit und mit Dynabeads™ Protein A für Immunpräzipitation mit gebundenem GARS-Antikörper oder FLAG-Antikörper (beide 3 μg/Probe) inkubiert und mit NaCl (1.000 mM) und PNK gewaschen. Als Kontrolle (Inp) wurden 5 % des Lysats aufgehoben. Die Bead-gebundenen RNA-Fragmente wurden im Anschluss mit Gamma ATP markiert und über eine NuPAGE aufgetrennt. Die jeweilige Behandlung der Proben (1-11) ist in A gelistet. Danach wurde ein Röntgenfilm auf das radioaktive Gel aufgelegt und entwickelt (B, Autoradiography). Zum weiteren Test des iCLiP2 Verfahrens wurde das Gel auf eine Nitrozellulose Membran geblottet und ebenfalls durch Auflegen eines Röntgenfilms visualisiert (C, Western Blot). Im Western Blot ist die GARS-Bande mit einem orangen Pfeil markiert und die Bande der schweren Kette des IP-AK (55 kDa) ist mit einem braunen Pfeil markiert.

Tabelle 39: LDS-Ladepuffer

Substanz	Menge
4x LDS-Ladepuffer	7,5 μl
10x Reducing agent	3 μl
DMPC-Wasser	19,5 μl

Tabelle 40: PNK-Mix

Substanz	Menge
10x PNK-Puffer	1 μ l
Gamma-ATP (SCP801: 12,33 pmol/ μ l)	1 μ l
T4 PNK Enzym	0,5 μ l
RNaseOUT	0,25 μ l
DMPC-Wasser	7,25 μ l

6.10 iCLIP2

Der finale iCLIP2 Versuch wurde unter Anleitung von Yannic Noe im Labor der AG Roßbach durchgeführt. Verwendet wurden vier virale Reporter-RNAs, WT, 5' MT, 3' MT und die 2xMT, sowie eine Probe ohne RNA. Optimalerweise wurde mindestens mit Triplikaten gearbeitet. Hierbei handelte es sich genauer gesagt um zwei technische Replikate und ein biologisches Replikat. Beim Sammeln der Proben wurden Replikat 1 und 2 zwar getrennt elektroporiert, aber zusammen in einer Schale inkubiert. Daher handelte es sich hierbei um technische Replikate. Pro Probe wurden 10^7 Zellen mit 80 pmol RNA via Elektroporation transfiziert. Der IP Waschpuffer enthielt 1.000 mM NaCl, und es wurden pro Probe 3 μ g Antikörper verwendet. Für den präparativen Ansatz wurden pro Probe 50 μ l der Dynabeads Protein A verwendet. Die Methode wurde von Julian König entwickelt (Buchbender *et al.*, 2020).

Als erstes wurden pro Probe 50 μ l Beads zweimal mit kaltem PBS150-T gewaschen und mit je 3 μ g des entsprechenden Antikörpers für 2 h bei 4 °C rollend inkubiert. Während der Inkubation der Beads wurden HeLa Zellen wie zuvor beschrieben elektroporiert. Pro Elektroporation wurden 10^7 Zellen mit 80 pmol RNA elektroporiert und in 10 cm² Platten für 1 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen wie beschrieben pelletiert. Die pelletierten Zellen wurden in 1 ml PBS gelöst und in 8 cm² Schalen gegeben, welche zum Vernetzen der RNA und der gebundenen Proteine (Crosslinken) in ein Eisbad gestellt wurden. Die Zellsuspension wurde dreimal mit 254 nm UV-Licht mit 300 mJ/cm² bestrahlt und zwischen jeder Bestrahlung resuspendiert. Nach dem Crosslinken wurden die Zellen bei 4 °C mit 400 g für 5 min pelletiert und der gesamte Überstand wurde entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen gewogen und das Vierfache (μ g = μ l) an RIPA-Puffer hinzugegeben. Für die Lyse wurden die Zellen gründlich in dem Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert, während alle 3 min gründlich gevortext wurde. Um die Zelltrümmer zu entfernen, wurde die Suspension bei 4 °C für 20 min mit > 16.000 g zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. An dieser

Stelle wurden pro Probe 5 % des Volumens als Ladekontrolle (Input) für den späteren Western Blot aufgehoben und mit SDS-Ladepuffer vermischt und bei RT gelagert. Den restlichen 95 % der Probe wurde das doppelte ihres Volumens an RQ1-Puffer zugegeben.

Basierend auf dem RIPA-RQ1 Mix wurde anschließend Turbo DNase (1:500 v), RNase Inhibitor Murine (1:1.000 v) und 10^{-2} verdünnte RNase I (1:100 v; final 10^{-4} ; 0,1 U/ml) hinzugegeben. Damit RNase und DNase korrekt arbeiten konnten, wurde für 3 min bei 37 °C schüttelnd (800 rpm) inkubiert und direkt nach den 3 min Inkubation für >3 min auf Eis gestellt. Vor der Bindung an die Beads wurde noch 5 M NaCl (1:50 v) hinzugegeben und größere (unlösliche) Ribonukleoprotein-Aggregate bei 4 °C mit 25.000 g für 5 min abzentrifugiert. Parallel wurden die mit Antikörper inkubierten Beads zweimal mit kaltem PBS150-T gewaschen. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde mit den Beads gemischt und für 2 h rollend bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Gemisch mit TBS1.000-T mit der in der Test IP bestimmten NaCl Konzentration von 1.000 mM viermal gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift wurde das Reaktionsgefäß gewechselt und nach dem vierten Waschschrift mit TBS1.000-T wurde noch zweimal mit PNK-Puffer gewaschen.

Im nächsten Schritt mussten die Proben dephosphoryliert werden. Hierfür wurden die Beads in 20 µl Phosphatase Mix (**Tabelle 45**) resuspendiert und für 20 min bei 37 °C schüttelnd (1.000 rpm) inkubiert und im Anschluss zweimal mit TBS400-T (**Tabelle 46**) und zweimal mit PNK-Puffer gewaschen. Zwischen TBS400-T und PNK-Puffer wurden die Reaktionsgefäße gewechselt.

Die gewaschenen Beads wurden im nächsten Schritt in 20 µl Ligase-Mix (**Tabelle 47**), welcher den ersten 3'-RNA Linker (L3-App[®]: /rApp/AGATCGGAAGAGCGGTTCAG/ddC/) enthält, über Nacht bei 16 °C schüttelnd (1.000 rpm), inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ligase-Mix zweimal mit PNK-Puffer gewaschen und die Beads wurden für 20 min bei 37 °C im 10 µl PNK-Mix inkubiert, gefolgt von zwei erneuten Waschschriften, einer mit kaltem PBS150-T und einer mit kaltem PNK-Puffer. Der PNK-Mix enthielt radioaktives γ -ATP (12,33 pmol/ml).

Bevor die Proben nun auf ein Gel geladen werden konnten, wurden sie in 25 µl LDS-Ladepuffer gelöst und 10 min bei 70 °C rollend denaturiert. Als Gel wurde ein 6 % bis 12 % NuPAGE System von Invitrogen verwendet und bei 200 V für 2 h laufen gelassen. Im Anschluss an das Gel erfolgte ein Western Blot auf Nitrocellulose (0,45 µm Porengröße) bei 30 V für 1,5 h. Die Gele wurden ebenso noch visualisiert, indem sie auf einen Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt werden.

Aus der Nitrocellulose Membran wurden die beladenen Spuren 15 nt oberhalb des durch den verwendeten Antikörper erkannten Proteins (GARS 83 kDa, Schnitt ab 100 kDa) ausgeschnitten und pro Probe in je 400 µl PK-Puffer (**Tabelle 48**) plus 20 µl Proteinase K (20 mg/ml; Roth) für 20 min bei 37 °C schüttelnd (1.000 rpm) inkubiert. Nach der ersten Inkubation wurde dem Gemisch noch 400 µl PK-Puffer+Urea (7 M) (**Tabelle 49**) zugegeben und weiter schüttelnd für erneute 20 min, diesmal bei 55 °C inkubiert. Für die Isolation der RNA wurde im Anschluss 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben und für 5 min bei 30 °C schüttelnd (1.000 rpm) inkubiert. Um die RNA zu isolieren, wurde das gesamte Gemisch in ein *5Prime Phase lock heavy gel* Reaktionsgefäß gegeben und bei 4 °C mit 16.000 g für 5 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Rest verworfen. Die nun isolierte RNA wurde durch die Zugabe von 80 µl NaOAc (3 M, pH 5,5) und 616 µl Isopropanol (kalt, 70 % v) über Nacht bei -80 °C gefällt. Zum besseren Sichtbarmachen des RNA-Pellets wurde noch 1 µl Glycoblue hinzugegeben. Am nächsten Tag wurde die präzipitierte RNA bei > 30 min, 4 °C und mit > 20.000 g pelletiert und im Anschluss mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen (5 min, max. g und 4 °C). Die gewaschene und pelletierte RNA wurde für wenige Minuten offen bei RT getrocknet und dann in 12 µl reinem Wasser gelöst.

Für die folgende Reverse Transkription wurde zu der gelösten RNA 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl RT1 Oligo (0,5 pmol/µl) hinzugegeben und bei 70 °C für 5 min inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der RT-Mix (**Tabelle 50**) (je 6 µl) hinzugegeben und der gesamte Ansatz nochmal bei 25 °C für 5 min, dann 42 °C für 20 min, 50 °C für 40 min inkubiert und zum Schluss auf 4 °C gekühlt. Nach Abschluss der reversen Transkription wurde 1,65 µl 1 M NaOH hinzugegeben und 20 min bei 98 °C inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 20 µl HEPES-NaOH (1 M, pH 7,3).

Die im letzten Schritt erstellte cDNA durchlief eine erneute Aufreinigung. Hierfür wurden magnetische MyONE Silane Beads verwendet. Pro Reaktion wurden 10 µl Beads eingesetzt. Die Beads mussten vor Verwendung zunächst in 500 µl RLT-Puffer gewaschen und anschließend in 125 µl RLT-Puffer resuspendiert und zu den Proben gegeben werden. Weitere 150 µl Ethanol (100 %) wurden hinzugegeben, es wurde vorsichtig durchmischt, 5 min bei RT inkubiert, nochmals vorsichtig durchmischt und weitere 5 min inkubiert. Die gesamte Flüssigkeit wurde abgenommen, mit 1 ml Ethanol (80 %) ersetzt und mit den Beads in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in welchem die Beads noch zweimal mit Ethanol (80 %) gewaschen wurden. Bevor die Beads zum Entfernen des Wasch-Ethanol mit einem Magnet immobilisiert werden konnten, wurde das Gemisch jedes Mal 30 s bei RT inkubiert. Am Ende wurde der Ethanolüberstand restlos abgenommen und die Beads wurden am Magneten trocknen gelassen, bis Risse im Pellet

sichtbar wurden (ca. 5 min). War dies der Fall, wurden die Beads in 5 µl Wasser resuspendiert und vor weiterer Verwendung 5 min bei RT inkubiert.

Für die weitere Verarbeitung der Proben blieben die Beads in dem Reaktionsmix. Um die Proben sequenzieren zu können musste die cDNA mit individuellen 3'-Linkern (Barcodes) ligiert werden. Die verwendeten Linker sind in **Tabelle 13** zu finden. Die gelöste cDNA wurde mit 2 µl der individuellen Linker (10 µM) und 1 µl DMSO (100 %) für 2 min bei 75 °C inkubiert und anschließend direkt für > 1 min auf Eis gestellt. Dann wurde dem Reaktionsansatz der 12 µl des cDNA 3'-Linker Ligation Mix (**Tabelle 51**) zugegeben und gründlich, aber vorsichtig durchmischt. Zuletzt wurde nochmals 1 µl RNA-Ligase (30,000 Units/ml, NEB) hinzugegeben, bevor der Reaktionsansatz über Nacht bei RT schüttelnd (1.100 rpm) inkubiert wurde. Nach der über Nacht Inkubation erfolgte eine erneute Aufreinigung mit den am Vortag verwendeten MyONE Beads. Pro Reaktion wurden 5 µl der Beads mit 500 µl RLT-Puffer gewaschen und die Beads am Ende in je 60 µl RLT-Puffer resuspendiert. Diese 60 µl wurden zu den Proben gegeben und der Ansatz wurde gründlich durchmischt. Weitere 60 µl Ethanol (100 %) wurden hinzugegeben, es wurde vorsichtig gemischt und wie zuvor, 5 min bei RT inkubiert, nochmals vorsichtig gemischt und erneut 5 min bei RT inkubiert. Die Beads wurden an einem Magneten fixiert und der Überstand wurde entfernt. Zum Waschen wurden die Beads in 1 ml Ethanol (80 %) resuspendiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und noch zweimal mit Ethanol (80 %) gewaschen, während zwischen jedem Waschschrift 30 Sekunden gewartet wurde, bevor die Beads am Magneten fixiert wurden. Am Ende wurde der gesamte Überstand entfernt, die Beads bei RT (ca. 5 min) getrocknet, bis sie Risse aufwiesen, und zum Schluss in 23 µl Wasser resuspendiert und ohne Magneten bei RT 5 min inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Beads erneut mittels Magneten fixiert, und 22,5 µl des Überstandes wurden mit 27,5 µl pre-Amplification PCR-Mix (**Tabelle 52**) vermischt, und eine pre-Amplification PCR wurde gestartet. Die Schritte der pre-Amplification PCR sind in der folgenden **Tabelle 41** zu finden.

Tabelle 41: pre-Amplification PCR

98 °C	30 s	
98 °C	10 s	
65 °C	30 s	6 Zyklen
72 °C	30 s	
72 °C	3 min	
16 °C	∞	

Nach der PCR-Reaktion wurde der PCR-Ansatz (50 µl) mit 147,5 µl ProNex Chemistry (Beads) vermischt (1:2,95 v/v). Die ProNex Beads sollten vorab auf RT aufgewärmt werden. Beads und PCR inkubierten 10 min bei RT, bevor die Beads mit Magneten fixiert wurden. Um möglichst keine Beads zu verlieren, wurde 2 min gewartet, bevor der Überstand verworfen wurde. Die ProNex Beads bleiben im Gegensatz zu allen anderen magnetischen Beads während des Waschens permanent an den Magneten fixiert. Die Beads wurden zweimal mit 300 µl ProNex Waschpuffer gewaschen. Bevor der Waschpuffer wieder abgenommen und verworfen wurde, sollten die Beads 60 s mit Waschpuffer bedeckt sein. Der Waschpuffer wurde final abgenommen und die Beads wurden an der Luft so lange getrocknet, bis sich Risse in der Masse zeigen (< 60 min). Zum Eluieren der Proben von den Beads wurde alles in 23 µl ProNex Elutionspuffer resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert, die Beads am Magneten fixiert und das Eluat (saubere cDNA) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im nächsten Schritt musste getestet werden, welche Probe wie viele PCR-Zyklen benötigt, um in jeder Probe weitestgehend die gleiche Menge cDNA zu erhalten. Hierfür wurde eine Optimierungs-PCR angewendet und die PCR-Produkte wurden auf einem 7 % PAA -TBE-Gel aufgetrennt. Für diese PCR wurde lediglich ein Teil der 23 µl cDNA verwendet. Der Optimierungs-PCR-Mix (**Tabelle 53**; je 18 µl) wurde mit 2 µl cDNA vermischt und unter folgenden PCR-Bedingungen (**Tabelle 42**) inkubiert.

Tabelle 42: Optimierungs PCR

98 °C	30 s	
98 °C	10 s	
65 °C	30 s	10 - 17 Zyklen
72 °C	30 s	
72 °C	3 min	
16 °C	∞	

Nach der PCR wurden 10 µl des Produkts mit 2 µl 6x TBE-Ladepuffer (XCN + BPB) vermischt und 6 µl davon auf das 7 % PAA-Gel geladen. Das Gel wurde 30 min bei 200 V laufen gelassen und anschließend 10 min in Ethidiumbromid gefärbt, bevor es mittels UV-Licht visualisiert wird. In dieser Arbeit wurden, um die PCR-Produkte aufeinander abzustimmen, zwei Optimierungs-PCRs angefertigt. Nachdem die Menge der PCR-Produkte anhand der Zyklen equilibriert wurde, wurde die präparative PCR (**Tabelle 54**) durchgeführt. Hier wurden 10 µl der cDNA mit 30 µl des präparativen PCR-Mix unter den folgenden PCR-Bedingungen (**Tabelle 43**) inkubiert.

Tabelle 43: präparative PCR

98 °C	30 s	
98 °C	10 s	
65 °C	30 s	10 - 13 Zyklen
72 °C	30 s	
72 °C	3 min	
16 °C	∞	

Nach der PCR wurden 5 µl des Produkts mit 1 µl des 6x TBE-Ladepuffers zur Kontrolle auf ein Gel aufgetragen. Das Gel wurde erneut mit 200 V für 30 min laufengelassen, bevor es für 10 min in EtBr eingefärbt und mittels UV-Licht visualisiert wurde. Als letzten Schritt des iCLIP2, bevor die Proben sequenziert werden konnten, wurde das präparative PCR-Produkt nochmal mit den oben beschriebenen ProNex Beads aufgereinigt. Vorab wurde aber noch von jeder Probe 1 % des Volumens als Ladekontrolle (Input) in ein gemeinsames Reaktionsgefäß überführt. Die restlichen 34,5 µl des präparativen PCR-Produktes wurden 1:2,4 v/v mit ProNex Beads (25 °C) vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Beads mit Magneten fixiert und nach 2 min Wartezeit wurde der Überstand verworfen. Die Proben wurden wie oben beschrieben zweimal mit 300 µl ProNex Waschpuffer gewaschen und dann an der Luft getrocknet, bis die Beadsmasse Risse aufwies (< 60 min). Die Beads wurden von dem Magneten entfernt und vorsichtig in 20 µl ProNex Elutionspuffer resuspendiert. Nach 5 min bei RT wurden die Beads wieder mit dem Magneten fixiert und die eluierte cDNA wurde vorsichtig ohne Beads in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die aufgereinigte cDNA wurde erneut 50/50 aufgeteilt, und ein Teil (10 µl) jeder Probe wurde zusammen in einem Reaktionsgefäß kombiniert. Die kombinierten Inputs und die kombinierte cDNA wurde auf einem 7 % PAA-Gel analysiert, um sicherzustellen, dass Primerrückstände aus der präparativen PCR mittels ProNex Beads entfernt wurden. Die restlichen 10 µl jeder Probe wurden zum Sequenzieren an die AG Prof. Dr. M. Bartkuhn im Institut für Lungenforschung der JLU Gießen übergeben.

Tabelle 44: 5x PNK dePPL Puffer

Substanz	Konzentration
Tris pH 6,5	350 mM
MgCl ₂	50 mM
DTT	5 mM

Tabelle 45: Phosphatase-Mix

Substanz	Menge
5x PNK dePPL Puffer	4 μ l
T4 PNK Enzym	0,5 μ l
RNaseOUT (40 U/ μ l)	0,5 μ l
DMPC-Wasser	15 μ l

Tabelle 46: TBS400-T

Substanz	Konzentration
Tris pH 7,4	50 mM
NaCl	400 mM
TWEEN20	0,05 %

Tabelle 47: Ligase-Mix

Substanz	Menge
Pre-adenylated L3-App	1 μ l
10x T4 RNA-Ligase Puffer	2 μ l
T4 RNA Ligase	1 μ l
RNaseOUT (40 U/ μ l)	0,5 μ l
PEG400	4 μ l
DMPC-Wasser	11,5 μ l

Tabelle 48: PK-Puffer

Substanz	Konzentration
Tris pH 7,4	100 mM
NaCl	50 mM
EDTA	10 mM
SDS	1 %

Tabelle 49: PK-Puffer + Urea

Substanz	Konzentration
Tris pH 7,4	100 mM
NaCl	50 mM
EDTA	10 mM
Urea	7 M

Tabelle 50: RT-Mix

Substanz	Menge
5x RT-Puffer	4 µl
DTT 0,1 M	1 µl
Superscript III RT (200 U/µl)	0,5 µl
RNaseOUT	0,5 µl

Tabelle 51: Linker Ligation

Substanz	Menge
DMPC-Wasser	0,3 µl
10x NEB RNA Ligase Puffer	2 µl
ATP 100 mM	0,2 µl
50 % PEG 8000	9 µl
High conc. RNA-Ligase	0,5 µl

Tabelle 52: pre-Amplification PCR-Mix

Substanz	Menge
cDNA library	22,5 µl
P5Solexa 10 mM	1,25 µl
P3Solexa 10 mM	1,25 µl
2x Phusion HF PCR MasterMix	25 µl

Tabelle 53: Optimierungs PCR Mix

Substanz	Menge
cDNA library	2 μ l
P5Solexa 10 mM	0,5 μ l
P3Solexa 10 mM	0,5 μ l
2x Phusion HF PCR MasterMix	10 μ l
DMPC-Wasser	7 μ l

Tabelle 54: Präparativer PCR-Mix

Substanz	Menge
cDNA library	10 μ l
P5Solexa 10 mM	1 μ l
P3Solexa 10 mM	1 μ l
2x Phusion HF PCR MasterMix	20 μ l
DMPC-Wasser	8 μ l

6.11 Sequenzierung

Die iCLIP2 Libraries wurden vom Institut für Lungenforschung (ILH) – Genomik und Bioinformatik – an der Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen (Deutschland) in der AG von Prof. Dr. M. Bartkuhn sequenziert. Nach der Qualitätskontrolle der Libraries mittels Kapillarelektrophorese (4200 TapeStation, Agilent) erfolgte die Sequenzierung auf der Illumina NovaSeq 6000-Plattform mit 75 bp langen Single-End-Reads. Die Proben wurden auf einem SP Flow Cell Kit 100 Cycles mit 5 % PhiX und dem XP-Workflow sequenziert.

6.12 Verarbeitung der iCLIP2 Daten

Das Trimmen der Adapter wurde anhand der Rohdaten mit TrimGalore (Version 0.6.7) (<https://zenodo.org/record/5127899>; (Felix Krueger *et al.*, 2021)) durchgeführt, das auf cutadapt (Version 4.2) (Martin, 2011) basiert. Basen mit geringer Qualität wurden mit fastq_quality_filter aus dem FASTX-Toolkit (Version 0.0.14) (https://github.com/agordon/fastx_toolkit; (Gordon *et*

al., 2014)) aussortiert, wobei Basen mit einer Qualität unter 20 und Reads mit weniger als 90 % ihrer Basen oberhalb dieses Qualitätswerts herausgefiltert wurden. Zufällige Barcode-Sequenzen wurden mit *umi tools* (Version 1.1.4) (Smith *et al.*, 2017) extrahiert. Nachdem die zufälligen Barcodes herausgefiltert wurden, wurden die Reads mit *fastx_barcode_splitter* aus dem FASTX-Toolkit den entsprechenden Proben zugeordnet. Hierdurch wurde je eine FASTQ-Datei pro Experiment erstellt, die von diesem Schritt an parallel verarbeitet wurden. Daraufhin wurden die experimentellen Barcodes mit dem *fastx_trimmer* aus dem FASTX-Toolkit entfernt. Die verbleibenden Reads wurden mit *Bowtie2* (Version 2.5.1) (Langmead & Salzberg, 2012), an die entsprechenden Referenzgenome (**8.2 Referenzgenome**) angeglichen, um die PCR-Duplikate mit *umi_tools dedup* entfernen zu können. Ausrichtungen mit geringer Qualität (*mapq*-Score unter 2) und mehrfach zugeordnete Ausrichtungen wurden entfernt. Die Cross-Link-Stellen wurden für Vorwärtsausrichtungen 1 Nukleotid stromaufwärts der Startposition und für Rückwärtsausrichtungen 1 Nukleotid stromabwärts der Endposition bestimmt. Diese Positionen wurden dann für jedes der Nukleotid summiert, um die so ausgewählten Peaks zu erzeugen. An jeder Position wurde der arithmetische Mittelwert berechnet, um auf diese Weise die Replikate zusammenzufassen. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurde die IGV (Integrative Genomics Viewer) (<https://www.nature.com/articles/nbt.1754>) (Robinson *et al.*, 2011) Software verwendet.

7. Quellen

- Abdullah, S. W., Wu, J., Wang, X., Guo, H. & Sun, S. (2023).** Advances and Breakthroughs in IRES-Directed Translation and Replication of Picornaviruses. *mBio* **14**, e0035823.
- Al-Sunaidi, M., Williams, C. H., Hughes, P. J., Schnurr, D. P. & Stanway, G. (2007).** Analysis of a new human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the identification of RNA structural domains. *Journal of Virology* **81**, 1013–1021.
- Ambros, V. & Baltimore, D. (1978).** Protein is linked to the 5' end of poliovirus RNA by a phosphodiester linkage to tyrosine. *The Journal of Biological Chemistry* **253**, 5263–5266.
- Ambros, V. & Baltimore, D. (1980).** Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. *The Journal of Biological Chemistry* **255**, 6739–6744.
- Aminev, A. G., Amineva, S. P. & Palmenberg, A. C. (2003).** Encephalomyocarditis viral protein 2A localizes to nucleoli and inhibits cap-dependent mRNA translation. *Virus Research* **95**, 45–57.
- Andino, R., Rieckhof, G. E., Trono, D. & Baltimore, D. (1990).** Substitutions in the protease (3Cpro) gene of poliovirus can suppress a mutation in the 5' noncoding region. *Journal of Virology* **64**, 607–612.
- Andreev, D. E., Fernandez-Miragall, O., Ramajo, J., Dmitriev, S. E., Terenin, I. M., Martinez-Salas, E. & Shatsky, I. N. (2007).** Differential factor requirement to assemble translation initiation complexes at the alternative start codons of foot-and-mouth disease virus RNA. *RNA (New York, N.Y.)* **13**, 1366–1374.
- Andreev, D. E., Hirnet, J., Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Niepmann, M. & Shatsky, I. N. (2012).** Glycyl-tRNA synthetase specifically binds to the poliovirus IRES to activate translation initiation. *Nucleic Acids Research* **40**, 5602–5614.
- Andreev, D. E., Niepmann, M. & Shatsky, I. N. (2022).** Elusive Trans-Acting Factors Which Operate with Type I (Poliovirus-like) IRES Elements. *International Journal of Molecular Sciences* **23**.
- Antonellis, A., Ellsworth, R. E., Sambuughin, N., Puls, I., Abel, A., Lee-Lin, S.-Q., Jordanova, A., Kremensky, I. & Christodoulou, K. & other authors (2003).** Glycyl tRNA

synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *American Journal of Human Genetics* **72**, 1293–1299.

Aviner, R., Li, K. H., Frydman, J. & Andino, R. (2021). Cotranslational prolyl hydroxylation is essential for flavivirus biogenesis. *Nature* **596**, 558–564.

Baggen, J., Thibaut, H. J., Strating, J. R. P. M. & van Kuppeveld, F. J. M. (2018). The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nature Reviews. Microbiology* **16**, 368–381.

Balvay, L., Soto Rifo, R., Ricci, E. P., Decimo, D. & Ohlmann, T. (2009). Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1789**, 542–557.

Barton, D. J., Morasco, B. J. & Flanagan, J. B. (1999). Translating ribosomes inhibit poliovirus negative-strand RNA synthesis. *Journal of Virology* **73**, 10104–10112.

Barton, D. J., O'Donnell, B. J. & Flanagan, J. B. (2001). 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *The EMBO Journal* **20**, 1439–1448.

Bassili, G., Tzima, E., Song, Y., Saleh, L., Ochs, K. & Niepmann, M. (2004). Sequence and secondary structure requirements in a highly conserved element for foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site activity and eIF4G binding. *The Journal of General Virology* **85**, 2555–2565.

Belsham, G. J., McInerney, G. M. & Ross-Smith, N. (2000). Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *Journal of Virology* **74**, 272–280.

Bergelson, J. M. (2010). Receptors. In *The Picornaviruses*, pp. 73–86. Edited by E. Ehrenfeld, E. Domingo & R. P. Roos. Washington, DC, USA: ASM Press.

Blobel, G. (1973). A protein of molecular weight 78,000 bound to the polyadenylate region of eukaryotic messenger RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**, 924–928.

Bonderoff, J. M., Larey, J. L. & Lloyd, R. E. (2008). Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C proteinase inhibits viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Journal of Virology* **82**, 9389–9399.

Borovjagin, A., Pestova, T. & Shatsky, I. (1994). Pyrimidine tract binding protein strongly stimulates in vitro encephalomyocarditis virus RNA translation at the level of preinitiation complex formation. *FEBS letters* **351**, 299–302.

Brown, D. M., Cornell, C. T., Tran, G. P., Nguyen, J. H. C. & Semler, B. L. (2005). An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *Journal of Virology* **79**, 11962–11973.

Buchbender, A., Mutter, H., Sutandy, F. X. R., Körtel, N., Hänel, H., Busch, A., Ebersberger, S. & König, J. (2020). Improved library preparation with the new iCLIP2 protocol. *Methods (San Diego, Calif.)* **178**, 33–48.

Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) (2018). TRBA 462 „Einstufung von Viren in Risikogruppen“. https://sicheresarbeitenimlabor.de/dokumente/vorschriften/trba_462.pdf, accessed January 18, 2025.

Burness, A. T. & Pardoe, I. U. (1983). A sialoglycopeptide from human erythrocytes with receptor-like properties for encephalomyocarditis and influenza viruses. *The Journal of General Virology* **64**, 1137–1148.

Cader, M. Z., Ren, J., James, P. A., Bird, L. E., Talbot, K. & Stammers, D. K. (2007). Crystal structure of human wildtype and S581L-mutant glycyl-tRNA synthetase, an enzyme underlying distal spinal muscular atrophy. *FEBS letters* **581**, 2959–2964.

Cameron, C. E., Oh, H. S. & Moustafa, I. M. (2010). Expanding knowledge of P3 proteins in the poliovirus lifecycle. *Future Microbiology* **5**, 867–881.

Carocci, M. & Bakkali-Kassimi, L. (2012). The encephalomyocarditis virus. *Virulence* **3**, 351–367.

Cho, M. W., Teterina, N., Egger, D., Bienz, K. & Ehrenfeld, E. (1994). Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* **202**, 129–145.

Choi, K., Kim, J. H., Li, X., Paek, K. Y., Ha, S. H., Ryu, S. H., Wimmer, E. & Jang, S. K. (2004). Identification of cellular proteins enhancing activities of internal ribosomal entry sites by competition with oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Research* **32**, 1308–1317.

Collis, P. S., O'Donnell, B. J., Barton, D. J., Rogers, J. A. & Flanagan, J. B. (1992). Replication of poliovirus RNA and subgenomic RNA transcripts in transfected cells. *Journal of Virology* **66**, 6480–6488.

Delarue, M. (1995). Aminoacyl-tRNA synthetases. *Current Opinion in Structural Biology* **5**, 48–55.

- Dick, G. W. A., Smithburn, K. C. & Haddow, A. J. (1948).** Mengo Encephalomyelitis Virus. Isolation and Immunological Properties. *British Journal of Experimental Pathology* **29**, 547–558.
- Doncheva, N. T., Morris, J. H., Gorodkin, J. & Jensen, L. J. (2019).** Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. *Journal of Proteome Research* **18**, 623–632.
- Duke, G. M., Osorio, J. E. & Palmenberg, A. C. (1990).** Attenuation of Mengo virus through genetic engineering of the 5' noncoding poly(C) tract. *Nature* **343**, 474–476.
- Duque, H. & Palmenberg, A. C. (2001).** Phenotypic characterization of three phylogenetically conserved stem-loop motifs in the mengovirus 3' untranslated region. *Journal of Virology* **75**, 3111–3120.
- Dvorak, C. M., Hall, D. J., Hill, M., Riddle, M., Pranter, A., Dillman, J., Deibel, M. & Palmenberg, A. C. (2001).** Leader Protein of Encephalomyocarditis Virus Binds Zinc, Is Phosphorylated during Viral Infection, and Affects the Efficiency of Genome Translation. *Virology* **290**, 261–271.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. & Moras, D. (1990).** Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* **347**, 203–206.
- Felix Krueger, Frankie James, Phil Ewels, Ebrahim Afyounian & Benjamin Schuster-Boeckler (2021). *FelixKrueger/TrimGalore: v0.6.7 - DOI via Zenodo: Zenodo*.
- Ferguson, F., McLennan, A. G., Urbaniak, M. D., Jones, N. J. & Copeland, N. A. (2020).** Re-evaluation of Diadenosine Tetraphosphate (Ap₄A) From a Stress Metabolite to Bona Fide Secondary Messenger. *Frontiers in Molecular Biosciences* **7**, 606807.
- Flanegan, J. B. & Baltimore, D. (1977).** Poliovirus-specific primer-dependent RNA polymerase able to copy poly(A). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 3677–3680.
- Flanegan, J. B., Petterson, R. F., Ambros, V., Hewlett, N. J. & Baltimore, D. (1977).** Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 961–965.
- Francisco-Velilla, R., Embarc-Buh, A., Abellan, S. & Martinez-Salas, E. (2022).** Picornavirus translation strategies. *FEBS open bio* **12**, 1125–1141.

Francklyn, C., Musier-Forsyth, K. & Martinis, S. A. (1997). Aminoacyl-tRNA synthetases in biology and disease: new evidence for structural and functional diversity in an ancient family of enzymes. *RNA (New York, N.Y.)* **3**, 954–960.

Gamarnik, A. V. & Andino, R. (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes & Development* **12**, 2293–2304.

Gerber, K., Wimmer, E. & Paul, A. V. (2001). Biochemical and genetic studies of the initiation of human rhinovirus 2 RNA replication: identification of a cis-replicating element in the coding sequence of 2A(pro). *Journal of Virology* **75**, 10979–10990.

Giegé, R. & Eriani, G. (2023). The tRNA identity landscape for aminoacylation and beyond. *Nucleic Acids Research* **51**, 1528–1570.

Gingras, A. C., Raught, B. & Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual Review of Biochemistry* **68**, 913–963.

Gingras, A. C., Svitkin, Y., Belsham, G. J., Pause, A. & Sonenberg, N. (1996). Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5578–5583.

Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Richardson, A., Meredith, J., Almond, J. W., Barclay, W. & Evans, D. J. (2000). Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *Journal of Virology* **74**, 4590–4600.

Gordon, A., Plessy, C. & Shemyak, K. (2014). *FASTX Toolkit*.

Gradi, A., Foeger, N., Strong, R., Svitkin, Y. V., Sonenberg, N., Skern, T. & Belsham, G. J. (2004). Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4GII within foot-and-mouth disease virus-infected cells: identification of the L-protease cleavage site in vitro. *Journal of Virology* **78**, 3271–3278.

Groppo, R. & Palmenberg, A. C. (2007). Cardiovirus 2A protein associates with 40S but not 80S ribosome subunits during infection. *Journal of Virology* **81**, 13067–13074.

Guo, M. & Schimmel, P. (2013). Essential nontranslational functions of tRNA synthetases. *Nature Chemical Biology* **9**, 145–153.

Guo, R.-T., Chong, Y. E., Guo, M. & Yang, X.-L. (2009). Crystal structures and biochemical analyses suggest a unique mechanism and role for human glycyl-tRNA synthetase in Ap4A homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 28968–28976.

- Han, J. M., Kim, J. Y. & Kim, S. (2003).** Molecular network and functional implications of macromolecular tRNA synthetase complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **303**, 985–993.
- Han, Y., Guo, X., Zhang, T., Wang, J. & Ye, K. (2022).** Development of an RNA-protein crosslinker to capture protein interactions with diverse RNA structures in cells. *RNA (New York, N.Y.)* **28**, 390–399.
- Hato, S. V., Ricour, C., Schulte, B. M., Lanke, K. H. W., Bruijini, M. de, Zoll, J., Melchers, W. J. G., Michiels, T. & van Kuppeveld, F. J. M. (2007).** The mengovirus leader protein blocks interferon-alpha/beta gene transcription and inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *Cellular microbiology* **9**, 2921–2930.
- Heim, A. (2020).** Picornaviren. In *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, pp. 595–606. Edited by S. Suerbaum, G.-D. Burchard, S. H. E. Kaufmann & T. F. Schulz. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Helwig, F. C. & Schmidt, C. H. (1945).** A FILTER-PASSING AGENT PRODUCING INTERSTITIAL MYOCARDITIS IN ANTHROPOID APES AND SMALL ANIMALS. *Science (New York, N.Y.)* **102**, 31–33.
- Herold, J. & Andino, R. (2001).** Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Molecular Cell* **7**, 581–591.
- Huber, S. A. (1994).** VCAM-1 is a receptor for encephalomyocarditis virus on murine vascular endothelial cells. *Journal of Virology* **68**, 3453–3458.
- Hulo, C., Castro, E. de, Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I. & Le Mercier, P. (2011).** ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Research* **39**, D576-82.
- Ito, M., Yanagi, Y. & Ichinohe, T. (2012).** Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome. *PLoS Pathogens* **8**, e1002857.
- Jackson, R. J., Hunt, S. L., Gibbs, C. L. & Kaminski, A. (1994).** Internal initiation of translation of picornavirus RNAs. *Molecular Biology Reports* **19**, 147–159.
- Jackson, T. & Belsham, G. J. (2021).** Picornaviruses: A View from 3A. *Viruses* **13**.
- Jang, S. K., Kräusslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C. & Wimmer, E. (1988).** A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *Journal of Virology* **62**, 2636–2643.

- Jang, S. K. & Wimmer, E. (1990).** Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. *Genes & Development* **4**, 1560–1572.
- Jiang, P., Liu, Y., Ma, H.-C., Paul, A. V. & Wimmer, E. (2014).** Picornavirus morphogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* **78**, 418–437.
- Jin, Y. M., Pardoe, I. U., Burness, A. T. & Michalak, T. I. (1994).** Identification and characterization of the cell surface 70-kilodalton sialoglycoprotein(s) as a candidate receptor for encephalomyocarditis virus on human nucleated cells. *Journal of Virology* **68**, 7308–7319.
- Jühling, F., Mörl, M., Hartmann, R. K., Sprinzl, M., Stadler, P. F. & Pütz, J. (2009).** tRNADB 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic Acids Research* **37**, D159–62.
- Kafasla, P., Morgner, N., Pöyry, T. A. A., Curry, S., Robinson, C. V. & Jackson, R. J. (2009).** Polypyrimidine tract binding protein stabilizes the encephalomyocarditis virus IRES structure via binding multiple sites in a unique orientation. *Molecular Cell* **34**, 556–568.
- Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M.-N. & Sonenberg, N. (2005).** Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes & Development* **19**, 104–113.
- Kaiser, F., Bittrich, S., Salentin, S., Leberecht, C., Haupt, V. J., Krautwurst, S., Schroeder, M. & Labudde, D. (2018).** Backbone Brackets and Arginine Tweezers delineate Class I and Class II aminoacyl tRNA synthetases. *PLoS Computational Biology* **14**, e1006101.
- Kaminski, A., Hunt, S. L., Patton, J. G. & Jackson, R. J. (1995).** Direct evidence that polypyrimidine tract binding protein (PTB) is essential for internal initiation of translation of encephalomyocarditis virus RNA. *RNA (New York, N.Y.)* **1**, 924–938.
- Kieft, J. S. (2008).** Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends in Biochemical Sciences* **33**, 274–283.
- Kirkegaard, K. & Semler, B. L. (2010).** Genome Replication II: the Process. In *The Picornaviruses*, pp. 127–140. Edited by E. Ehrenfeld, E. Domingo & R. P. Roos. Washington, DC, USA: ASM Press.
- Kolupaeva, V. G., Hellen, C. U. & Shatsky, I. N. (1996).** Structural analysis of the interaction of the pyrimidine tract-binding protein with the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and foot-and-mouth disease virus RNAs. *RNA (New York, N.Y.)* **2**, 1199–1212.

- Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V., Hellen, C. U. & Shatsky, I. N. (1998).** Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 18599–18604.
- Kuhn, R. J. & Wimmer, E. (1987).** *The replication of picornaviruses.*
- Lamphear, B. J., Yan, R., Yang, F., Waters, D., Liebig, H. D., Klump, H., Kuechler, E., Skern, T. & Rhoads, R. E. (1993).** Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A proteases from human Coxsackievirus and rhinovirus. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 19200–19203.
- Langmead, B. & Salzberg, S. L. (2012).** Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* **9**, 357–359.
- Lee, K.-M., Chen, C.-J. & Shih, S.-R. (2017).** Regulation Mechanisms of Viral IRES-Driven Translation. *Trends in Microbiology* **25**, 546–561.
- Lee, Y. F., Nomoto, A., Detjen, B. M. & Wimmer, E. (1977).** A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 59–63.
- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G. & Smith, D. B. (2018).** Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research* **46**, D708-D717.
- Levy, H. C., Bostina, M., Filman, D. J. & Hogle, J. M. (2010).** Cell entry: a biochemical and structural perspective. In *The Picornaviruses*, pp. 87–104. Edited by E. Ehrenfeld, E. Domingo & R. P. Roos. Washington, DC, USA: ASM Press.
- Li, W., Ross-Smith, N., Proud, C. G. & Belsham, G. J. (2001).** Cleavage of translation initiation factor 4AI (eIF4AI) but not eIF4AII by foot-and-mouth disease virus 3C protease: identification of the eIF4AI cleavage site. *FEBS letters* **507**, 1–5.
- Lin, J.-Y., Chen, T.-C., Weng, K.-F., Chang, S.-C., Chen, L.-L. & Shih, S.-R. (2009).** Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *Journal of Biomedical Science* **16**, 103.
- Lin, J.-Y., Li, M.-L., Huang, P.-N., Chien, K.-Y., Horng, J.-T. & Shih, S.-R. (2008).** Heterogeneous nuclear ribonuclear protein K interacts with the enterovirus 71 5' untranslated region and participates in virus replication. *The Journal of General Virology* **89**, 2540–2549.
- Liu, Y., Wimmer, E. & Paul, A. V. (2009).** Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses. *Biochimica et Biophysica Acta* **1789**, 495–517.

- Lobert, P. E., Escriou, N., Ruelle, J. & Michiels, T. (1999).** A coding RNA sequence acts as a replication signal in cardioviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 11560–11565.
- López de Quinto, S., Lafuente, E. & Martínez-Salas, E. (2001).** IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *RNA (New York, N.Y.)* **7**, 1213–1226.
- López de Quinto, S. & Martínez-Salas, E. (2000).** Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *RNA (New York, N.Y.)* **6**, 1380–1392.
- Lozano, G., Fernandez, N. & Martinez-Salas, E. (2014).** Magnesium-dependent folding of a picornavirus IRES element modulates RNA conformation and eIF4G interaction. *The FEBS Journal* **281**, 3685–3700.
- Luo, M., Vriend, G., Kamer, G., Minor, I., Arnold, E., Rossmann, M. G., Boege, U., Scraba, D. G., Duke, G. M. & Palmenberg, A. C. (1987).** The atomic structure of Mengo virus at 3.0 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)* **235**, 182–191.
- Luz, N. & Beck, E. (1991).** Interaction of a cellular 57-kilodalton protein with the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology* **65**, 6486–6494.
- Martin, M. (2011).** Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j.* **17**, 10.
- Martínez-Salas, E., Francisco-Velilla, R., Fernandez-Chamorro, J., Lozano, G. & Diaz-Toledano, R. (2015).** Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions. *Virus Research* **206**, 62–73.
- Mason, P. W., Bezborodova, S. V. & Henry, T. M. (2002).** Identification and Characterization of a cis -Acting Replication Element (cre) Adjacent to the Internal Ribosome Entry Site of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Journal of Virology* **76**, 9686–9694.
- McKnight, K. L. & Lemon, S. M. (1998).** The rhinovirus type 14 genome contains an internally located RNA structure that is required for viral replication. *RNA (New York, N.Y.)* **4**, 1569–1584.
- Meyer, K., Petersen, A., Niepmann, M. & Beck, E. (1995).** Interaction of eukaryotic initiation factor eIF-4B with a picornavirus internal translation initiation site. *Journal of Virology* **69**, 2819–2824.
- Michel, Y. M., Borman, A. M., Paulous, S. & Kean, K. M. (2001).** Eukaryotic initiation factor 4G-poly(A) binding protein interaction is required for poly(A) tail-mediated stimulation of

picornavirus internal ribosome entry segment-driven translation but not for X-mediated stimulation of hepatitis C virus translation. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 4097–4109.

Mikitas, O. V., Ivin, Y. Y., Golyshev, S. A., Povarova, N. V., Galkina, S. I., Pletjushkina, O. Y., Nadezhdina, E. S., Gmyl, A. P. & Agol, V. I. (2012). Suppression of injuries caused by a lytic RNA virus (mengovirus) and their uncoupling from viral reproduction by mutual cell/virus disarmament. *Journal of Virology* **86**, 5574–5583.

Montagnier, L. & Sanders, F. K. (1963). Replicative Form of Encephalomyocarditis Virus Ribonucleic Acid. *Nature* **199**, 664–667.

Nayak, A., Goodfellow, I. G. & Belsham, G. J. (2005). Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *Journal of Virology* **79**, 7698–7706.

Ng, C. S., Jogi, M., Yoo, J.-S., Onomoto, K., Koike, S., Iwasaki, T., Yoneyama, M., Kato, H. & Fujita, T. (2013). Encephalomyocarditis virus disrupts stress granules, the critical platform for triggering antiviral innate immune responses. *Journal of Virology* **87**, 9511–9522.

Niepmann, M. (2009). Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochimica et Biophysica Acta* **1789**, 529–541.

Nikonova, E. Y., Mihaylina, A. O., Nemchinova, M. S., Garber, M. B. & Nikonov, O. S. (2018). Glycyl-tRNA Synthetase as a Potential Universal Regulator of Translation Initiation at IRES-I. *Molekuliarnaiia Biologiia* **52**, 10–18.

Novak, J. E. & Kirkegaard, K. (1994). Coupling between genome translation and replication in an RNA virus. *Genes & Development* **8**, 1726–1737.

Oberste, M. S., Gotuzzo, E., Blair, P., Nix, W. A., Ksiazek, T. G., Comer, J. A., Rollin, P., Goldsmith, C. S., Olson, J. & Kochel, T. J. (2009). Human febrile illness caused by encephalomyocarditis virus infection, Peru. *Emerging Infectious Diseases* **15**, 640–646.

Oprescu, S. N., Chepa-Lotrea, X., Takase, R., Golas, G., Markello, T. C., Adams, D. R., Toro, C., Gropman, A. L. & Hou, Y.-M. & other authors (2017). Compound heterozygosity for loss-of-function GARS variants results in a multisystem developmental syndrome that includes severe growth retardation. *Human Mutation* **38**, 1412–1420.

Palmenberg, A., Neubauer, D. & Skern, T. (2010). Genome Organization and Encoded Proteins. In *The Picornaviruses*, pp. 3–17. Edited by E. Ehrenfeld, E. Domingo & R. P. Roos. Washington, DC, USA: ASM Press.

- Park, M. C., Kang, T., Da Jin, Han, J. M., Kim, S. B., Park, Y. J., Cho, K., Park, Y. W. & Guo, M. & other authors (2012).** Secreted human glycyl-tRNA synthetase implicated in defense against ERK-activated tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, E640-7.
- Parks, G. D., Baker, J. C. & Palmenberg, A. C. (1989).** Proteolytic cleavage of encephalomyocarditis virus capsid region substrates by precursors to the 3C enzyme. *Journal of Virology* **63**, 1054–1058.
- Paul, A. V., Peters, J., Mugavero, J., Yin, J., van Boom, J. H. & Wimmer, E. (2003).** Biochemical and Genetic Studies of the VPg Uridylylation Reaction Catalyzed by the RNA Polymerase of Poliovirus. *Journal of Virology* **77**, 891–904.
- Paul, A. V., Rieder, E., Kim, D. W., van Boom, J. H. & Wimmer, E. (2000).** Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *Journal of Virology* **74**, 10359–10370.
- Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D. & Wimmer, E. (1998).** Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* **393**, 280–284.
- Paul, A. V. & Wimmer, E. (2015).** Initiation of protein-primed picornavirus RNA synthesis. *Virus Research* **206**, 12–26.
- Pelletier, J. & Sonenberg, N. (1988).** Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**, 320–325.
- Pérez-Bercoff, R., Cioé, L., Meo, P., Carrara, G., Mechali, M., Falcoff, E. & Rita, G. (1974).** Infectivity of mengovirus replicative form. Relationship to cellular transcription. *The Journal of General Virology* **25**, 53–62.
- Pfister, T., Jones, K. W. & Wimmer, E. (2000).** A cysteine-rich motif in poliovirus protein 2C(ATPase) is involved in RNA replication and binds zinc in vitro. *Journal of Virology* **74**, 334–343.
- Pilipenko, E. V., Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Khitrina, E. V., Poperechnaya, A. N., Agol, V. I. & Hellen, C. U. (2000).** A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes & Development* **14**, 2028–2045.
- Pilipenko, E. V., Viktorova, E. G., Guest, S. T., Agol, V. I. & Roos, R. P. (2001).** Cell-specific proteins regulate viral RNA translation and virus-induced disease. *The EMBO Journal* **20**, 6899–6908.

- Porter, F. W. & Palmenberg, A. C. (2009).** Leader-induced phosphorylation of nucleoporins correlates with nuclear trafficking inhibition by cardioviruses. *Journal of Virology* **83**, 1941–1951.
- Qin, X., Deng, X., Chen, L. & Xie, W. (2016).** Crystal Structure of the Wild-Type Human GlyRS Bound with tRNA(Gly) in a Productive Conformation. *Journal of Molecular Biology* **428**, 3603–3614.
- Qin, X., Hao, Z., Tian, Q., Zhang, Z., Zhou, C. & Xie, W. (2014).** Cocrystal structures of glycyl-tRNA synthetase in complex with tRNA suggest multiple conformational states in glycylation. *The Journal of Biological Chemistry* **289**, 20359–20369.
- Rieder, E., Paul, A. V., Kim, D. W., van Boom, J. H. & Wimmer, E. (2000).** Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *Journal of Virology* **74**, 10371–10380.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G. & Mesirov, J. P. (2011).** Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* **29**, 24–26.
- Rodríguez Pulido, M., Serrano, P., Sáiz, M. & Martínez-Salas, E. (2007).** Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a,b, and PABP RNA-binding proteins. *Virology* **364**, 466–474.
- Romanova, L. I., Lidsky, P. V., Kolesnikova, M. S., Fominykh, K. V., Gmyl, A. P., Sheval, E. V., Hato, S. V., van Kuppeveld, F. J. M. & Agol, V. I. (2009).** Antiapoptotic activity of the cardiovirus leader protein, a viral "security" protein. *Journal of Virology* **83**, 7273–7284.
- Rothberg, P. G., Harris, T. J., Nomoto, A. & Wimmer, E. (1978).** O⁴-(5'-uridylyl)tyrosine is the bond between the genome-linked protein and the RNA of poliovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 4868–4872.
- Sachs, A. B., Davis, R. W. & Kornberg, R. D. (1987).** A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Molecular and Cellular Biology* **7**, 3268–3276.
- Sáiz, M., Gómez, S., Martínez-Salas, E. & Sobrino, F. (2001).** Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *The Journal of General Virology* **82**, 93–101.
- Saks, M. E. & Conery, J. S. (2007).** Anticodon-dependent conservation of bacterial tRNA gene sequences. *RNA (New York, N.Y.)* **13**, 651–660.

- Seipelt, J., Guarné, A., Bergmann, E., James, M., Sommergruber, W., Fita, I. & Skern, T. (1999).** The structures of picornaviral proteinases. *Virus Research* **62**, 159–168.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. & Ideker, T. (2003).** Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* **13**, 2498–2504.
- Skern, T., Sommergruber, W., Auer, H., Volkmann, P., Zorn, M., Liebig, H. D., Fessl, F., Blaas, D. & Kuechler, E. (1991).** Substrate requirements of a human rhinoviral 2A proteinase. *Virology* **181**, 46–54.
- Smith, K. C. (1976).** The Radiation-Induced Addition of Proteins and Other Molecules to Nucleic Acids. In *Photochemistry and photobiology of nucleic acids*, pp. 187–218. New York: Acad. Pr.
- Smith, T., Heger, A. & Sudbery, I. (2017).** UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome Research* **27**, 491–499.
- Son, K.-Y., Kim, D.-S., Kwon, J., Choi, J.-S., Kang, M.-I., Belsham, G. J. & Cho, K.-O. (2014).** Full-length genomic analysis of Korean porcine Sapelovirus strains. *PLoS ONE* **9**, e107860.
- Sonenberg, N. & Hinnebusch, A. G. (2009).** Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**, 731–745.
- Song, Y., Tzima, E., Ochs, K., Bassili, G., Trusheim, H., Linder, M., Preissner, K. T. & Niepmann, M. (2005).** Evidence for an RNA chaperone function of polypyrimidine tract-binding protein in picornavirus translation. *RNA (New York, N.Y.)* **11**, 1809–1824.
- Sun, Y., Guo, Y. & Lou, Z. (2014).** Formation and working mechanism of the picornavirus VPg uridylylation complex. *Current Opinion in Virology* **9**, 24–30.
- Toyoda, H., Nicklin, M. J., Murray, M. G., Anderson, C. W., Dunn, J. J., Studier, F. W. & Wimmer, E. (1986).** A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell* **45**, 761–770.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. & Nomoto, A. (1992).** Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology* **66**, 1476–1483.
- Tyanova, S., Temu, T. & Cox, J. (2016).** The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols* **11**, 2301–2319.

- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M. & Cox, J. (2016).** The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods* **13**, 731–740.
- Vallejos, M., Ramdohr, P., Valiente-Echeverría, F., Tapia, K., Rodriguez, F. E., Lowy, F., Huidobro-Toro, J. P., Dangerfield, J. A. & López-Lastra, M. (2010).** The 5'-untranslated region of the mouse mammary tumor virus mRNA exhibits cap-independent translation initiation. *Nucleic Acids Research* **38**, 618–632.
- van der Schaar, H. M., Dorobantu, C. M., Albulescu, L., Strating, J. R. P. M. & van Kuppeveld, F. J. M. (2016).** Fat(al) attraction: Picornaviruses Usurp Lipid Transfer at Membrane Contact Sites to Create Replication Organelles. *Trends in Microbiology* **24**, 535–546.
- van Ooij, M. J. M., Vogt, D. A., Paul, A., Castro, C., Kuijpers, J., van Kuppeveld, F. J. M., Cameron, C. E., Wimmer, E., Andino, R. & Melchers, W. J. G. (2006).** Structural and functional characterization of the coxsackievirus B3 CRE(2C): role of CRE(2C) in negative- and positive-strand RNA synthesis. *The Journal of General Virology* **87**, 103–113.
- Walter, B. L., Nguyen, J. H., Ehrenfeld, E. & Semler, B. L. (1999).** Differential utilization of poly(rC) binding protein 2 in translation directed by picornavirus IRES elements. *RNA (New York, N.Y.)* **5**, 1570–1585.
- Wen, S.-Y., Qadir, J. & Yang, B. B. (2022).** Circular RNA translation: novel protein isoforms and clinical significance. *Trends in Molecular Medicine* **28**, 405–420.
- Westhof, E., Thornlow, B., Chan, P. P. & Lowe, T. M. (2022).** Eukaryotic tRNA sequences present conserved and amino acid-specific structural signatures. *Nucleic Acids Research* **50**, 4100–4112.
- Willkomm, D. K. & Hartmann, R. K. (2012).** 3'-Terminal Attachment of Fluorescent Dyes and Biotin. In *Handbook of RNA Biochemistry*, pp. 117–128. Edited by R. K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schön & E. Westhof, 2nd edn. Somerset: John Wiley & Sons Incorporated.
- Wimmer, E., Hellen, C. U. & Cao, X. (1993).** Genetics of poliovirus. *Annual Review of Genetics* **27**, 353–436.
- Wimmer, E. & Paul, A. V. (2010).** The Making of a Picornavirus. In *The Picornaviruses*, pp. 33–58. Edited by E. Ehrenfeld, E. Domingo & R. P. Roos. Washington, DC, USA: ASM Press.
- Yang, Y., Rijnbrand, R., McKnight, K. L., Wimmer, E., Paul, A., Martin, A. & Lemon, S. M. (2002).** Sequence requirements for viral RNA replication and VPg uridylylation directed by

the internal cis-acting replication element (cre) of human rhinovirus type 14. *Journal of Virology* **76**, 7485–7494.

Yang, Y., Yi, M., Evans, D. J., Simmonds, P. & Lemon, S. M. (2008). Identification of a Conserved RNA Replication Element (cre) within the 3D pol -Coding Sequence of Hepatoviruses. *Journal of Virology* **82**, 10118–10128.

Yin, C., Zhao, H., Xia, X., Pan, Z., Li, D. & Zhang, L. (2024). Picornavirus 2C proteins: structure-function relationships and interactions with host factors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **14**, 1347615.

Yogo, Y. & Wimmer, E. (1972). Polyadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**, 1877–1882.

Yu, Y., Abaeva, I. S., Marintchev, A., Pestova, T. V. & Hellen, C. U. T. (2011). Common conformational changes induced in type 2 picornavirus IRESs by cognate trans-acting factors. *Nucleic Acids Research* **39**, 4851–4865.

Yu, Z., Wu, Z., Li, Y., Hao, Q., Cao, X., Blaha, G. M., Lin, J. & Lu, G. (2023). Structural basis of a two-step tRNA recognition mechanism for plastid glycyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Research* **51**, 4000–4011.

Zell, R. (2018). Picornaviridae-the ever-growing virus family. *Archives of Virology* **163**, 299–317.

Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Hovi, T., King, A. M. Q., Knowles, N. J., Lindberg, A. M., Pallansch, M. A. & Palmenberg, A. C. & other authors (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *The Journal of General Virology* **98**, 2421–2422.

Zhang, J., Li, X., Liang, J., Meng, X., Zhu, C., Yang, G., Liang, Y., Zhou, Q. & Qin, Q. & other authors (2025). Glycyl-tRNA Synthetase as a Target for Antiviral Drug Screening Against Influenza Virus. *IJMS* **26**, 2912.

8. Anhang

8.1 Abbildungen

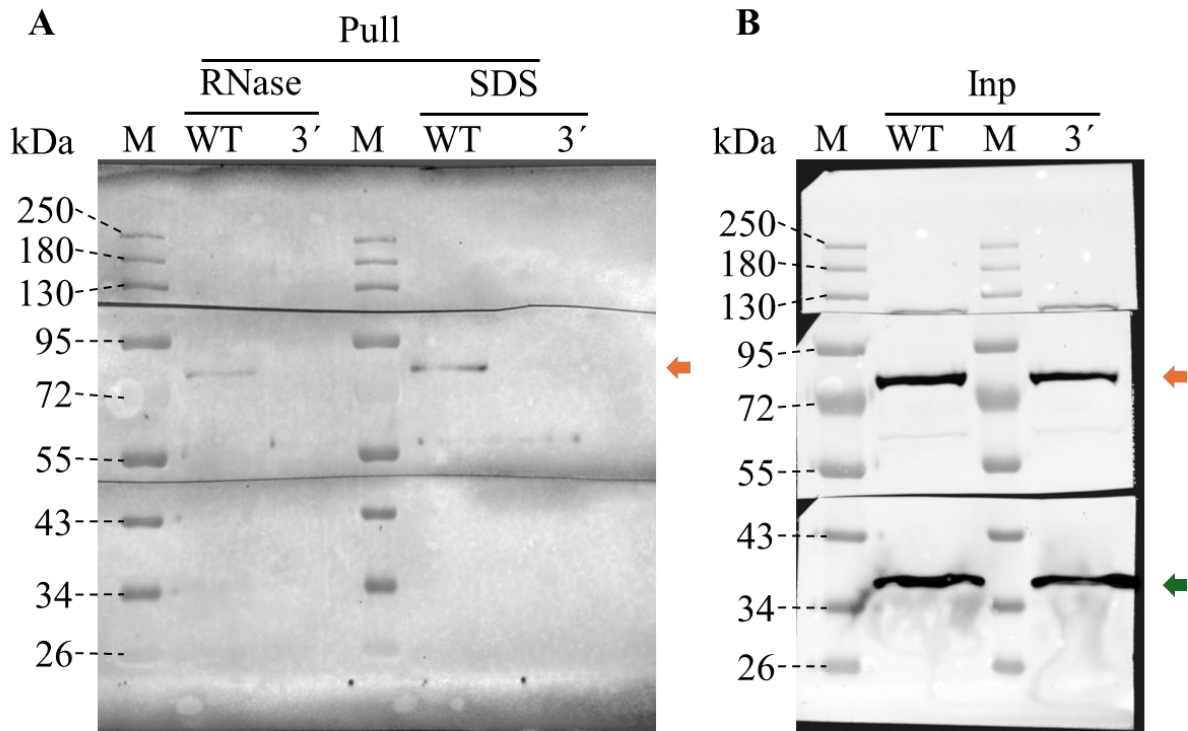


Abb. 40: Zweiter Western Blot zur Bestätigung der Bindung von GARS an die Mengovirus 3'-GBE. Western Blot mit dem finalen Pull-Down-Protokoll (**A**) mit geblockten High Capacity NeutrAvidin-Beads (oN, 4 °C). Die RNA mit 3'-Biotin-Markierung (20 µg) wurde mittels Elektroporation in HeLa-Zellen (10 Millionen) transfiziert, bevor sie nach Lyse der Zellen an die Beads (30 µl) gebunden wurde. Die Proteine wurden mittels 1 % SDS mit 100 mM NaCl (1 min) oder RNase A (250 µg/ml, 10 min) abgelöst und auf einem Gradienten-PAA Gel (6 bis 20 %) aufgetrennt. Verwendet wurden der Wildtyp (WT) und die 3'-GBE-Mutante (3') sowie ein Marker (M). Als Ladekontrolle wurden ein Input (Inp, **B**) in Höhe von 2,5 % der Menge des Pull-Down-Materials geladen. Die Membranen wurden entsprechend der Größe der verwendeten Primärantikörper in separate Teile geschnitten und nur mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Verwendet wurden eIF4G, GARS und GAPDH. Die GARS-Bande (83 kDa) ist mit einem orangen Pfeil markiert, und die GAPDH Bande (36 kDa) ist mit dunkelgrün markiert.

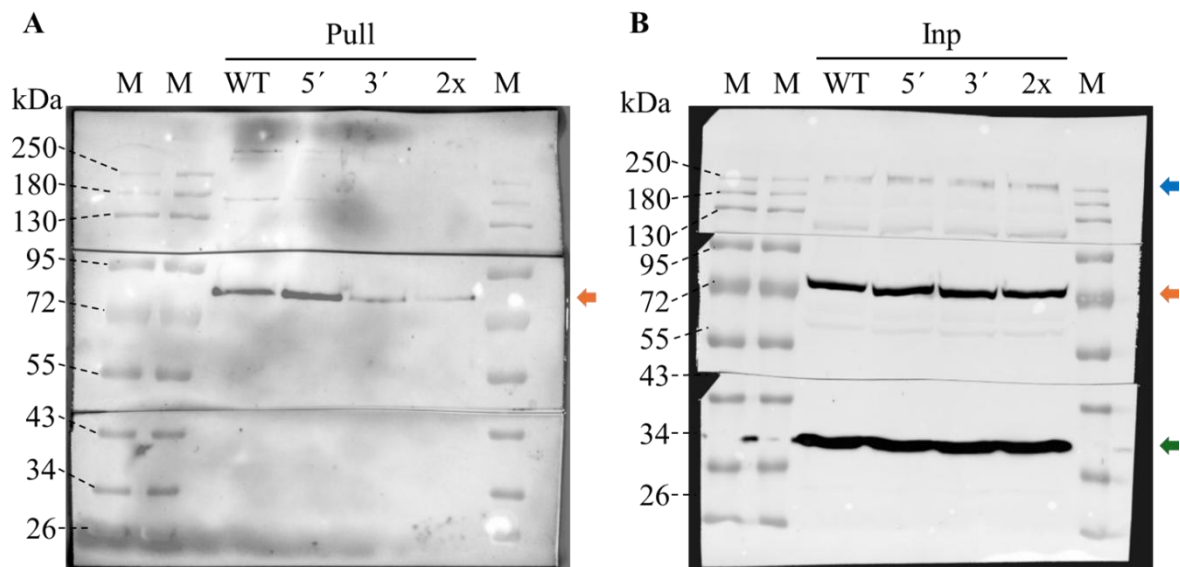


Abb. 41: Zweiter Western Blot zur Bestätigung der Bindung von GARS an die Mengovirus 5'-GBE. Western Blot mit dem finalen Pull-Down-Protokoll (**A**) mit geblockten High Capacity NeutrAvidin-Beads (oN, 4 °C). Die RNA mit 3'-Biotin Markierung (20 µg) wurde mittels Elektroporation in HeLa Zellen (10 Millionen) transfiziert, bevor sie an die Beads (30 µl) gebunden wurde. Die Proteine wurden mittels 1 % SDS mit 100 mM NaCl (1 min) abgelöst und auf einem Gradienten-PAA-Gel (6 bis 20 %) aufgetrennt. Verwendet wurden der Wildtyp (WT), 5'-GBE-Mutante (5'), 3'-GBE-Mutante (3') und 5'-3'-GBE-Mutante (2x) mit einem Marker (M). Als Ladekontrolle wurde ein Input (**B**) in Höhe von 2,5 % der Menge des Pull-Down-Materials geladen. Die Membranen wurden entsprechend der Größe der verwendeten Primäantikörper in separate Teile geschnitten und nur mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Verwendet wurden eIF4G, GARS und GAPDH. Die eIF4G Bande (250 kDa) ist mit einem blauen Pfeil markiert, die GARS-Bande (83 kDa) ist mit einem orangen Pfeil markiert, und die GAPDH Bande (36 kDa) ist mit dunkelgrün markiert.

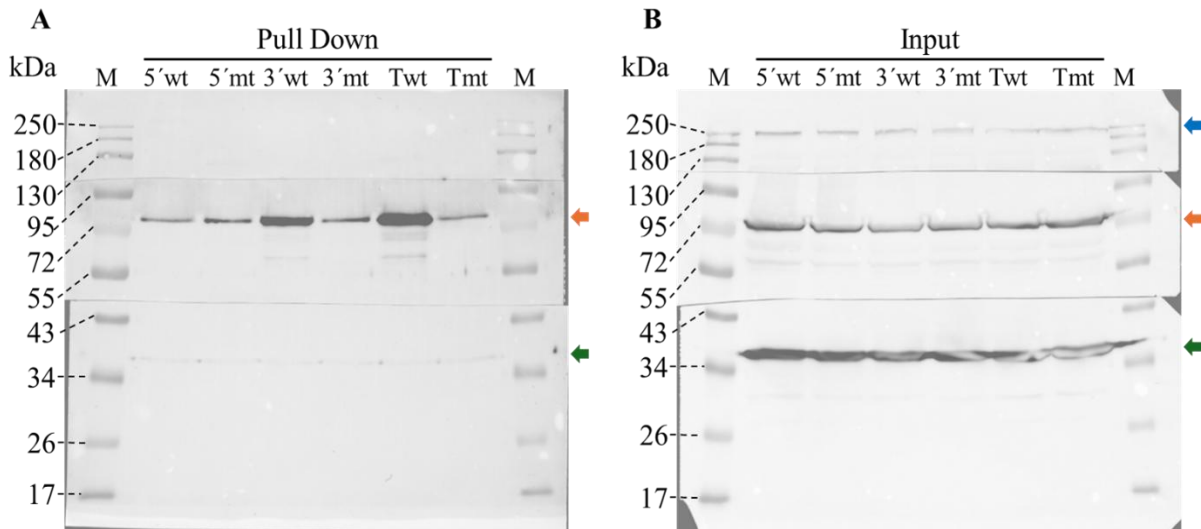


Abb. 42: Bindungsintensität der einzelnen MV UTRs und Bindungsnachweis eines nahen Verwandten Replikat 2. Western Blot mit dem finalen Pull-Down-Protokoll (A) mit geblockten High Capacity NeutrAvidin-Beads (oN, 4 °C). Die RNA mit 3'-Biotin-Markierung (80 pmol) wurde mittels Elektroporation in HeLa Zellen (10 Millionen) transfiziert, bevor sie an die Beads (30 µl) gebunden wurde. Die Proteine wurden mittels 1 % SDS mit 100 mM NaCl (1 min) abgelöst und auf einem Gradienten-PAA Gel (6 bis 20 %) aufgetrennt. Verwendet wurden Konstrukte bestehend aus den UTRs mit GBE von Mengovirus und Theiler murine Virus (TMEV = T) in GBE WT und GBE MT Varianten. Dem entsprechend wurden die MV-5'-UTR-GBE-WT/MT (5'wt/5'mt), die MV-3'-UTR-GBE-WT/MT (3'wt/3'mt) und die TMEV-3'-UTR-GBE-WT/MT (Twt/Tmt) mit einem Marker (M) verwendet. Als Ladekontrolle wurde ein Input (B) in Höhe von 2,5 % der Menge des Pull-Down-Materials geladen. Die Membranen wurden entsprechend der Größe der verwendeten Primäntikörper in separate Teile geschnitten und nur mit dem entsprechenden Primäntikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Diese Membran wurde 2 h geblockt und über Nacht mit dem entsprechenden Primäntikörper inkubiert. Verwendet wurden eIF4G, GARS und GAPDH. Die eIF4G Bande (250 kDa) ist mit einem blauen Pfeil markiert, die GARS-Bande (83 kDa) ist mit einem orangen Pfeil markiert, und die GAPDH Bande (36 kDa) ist mit dunkelgrün markiert.

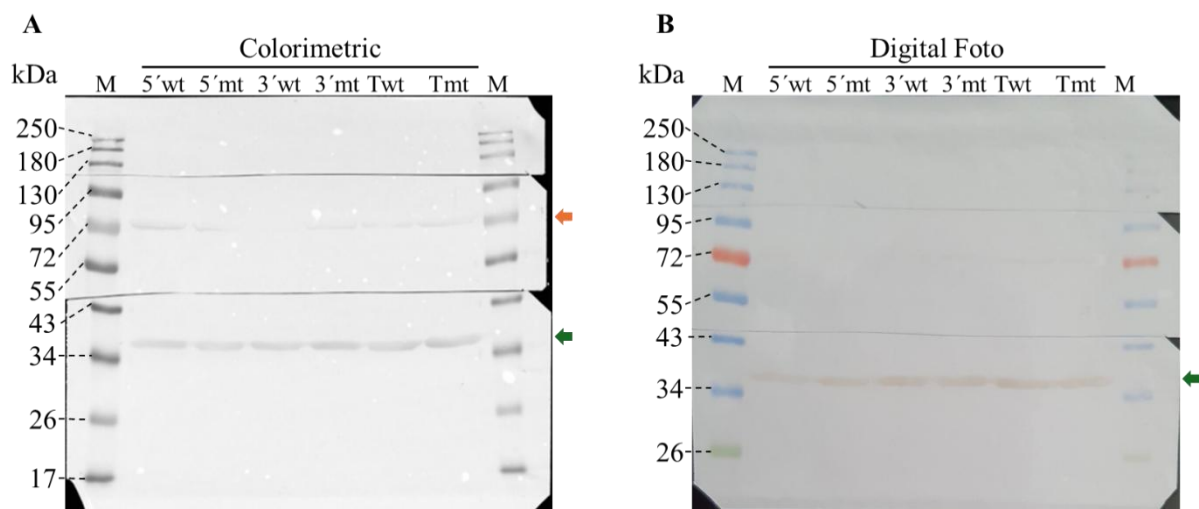


Abb. 43: Darstellung der Bandenintensität des Inputs. In **A** ist eine Schwarz-Weiß Aufnahme ohne Chemilumineszenz (Colorimetric) des Inputs aus **Abb. 42 B** abgebildet. **B** zeigt eine fotografische Aufnahme der Input Membran aus einem weiteren Replikat dieser Versuchsreihe. Die GARS-Bande ist mit einem orangen Pfeil und die GAPDH-Bande mit einem grünen Pfeil markiert. In beiden Ansätzen ist zu erkennen, dass die Bande, besonders die der GAPDH-Bande, eine sehr hohe Intensität besitzt, sodass sie nach Inkubation mit dem HRP-Substrat bereits mit bloßem Auge zu erkennen ist.

8.2 Referenzgenome

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten vollständigen viralen Reporte-RNA-Sequenzen gezeigt. Der T7 Promotor ist gelb hinterlegt, wobei das erste transkribierte Nukleotid das G in der Sequenz UAUAG ist und dieses G als konserviertes transkriptionsförderndes Nukleotid oft mit zur Promotor-Sequenz gezählt wird. Das 5'-CCA-3' der GBEs ist grün hinterlegt und die Punktmutationen rot hinterlegt. In den MV-Sequenzen mit beiden UTRs ist zwischen beiden UTRs eine Linker-Sequenz (grau) und die HiBiT-Sequenz (türkis) eingebaut. Die Sequenzen sind von 5'-Ende nach 3'-Ende abgebildet.

MV GBE WT (WT)

```

GGUAAUACGACUCACUAUA GUCACAUUACUGGCCGAAGCCGCUUGGAAUAAGGCCGGUGUGCG
UCUGUCUAUAUGUUACUUCUACUACAUUGUCGUCUGUGACGAUGUAGGGGGCCCGGAACCUUGU
CCUGUCUUCUUGACGAGUAUUCUAGGGGUCUUUCCCCUCUCGACAAAGGAAUACAAGGUCUG
UUGAAUGUCGUGAAGGAAGCAGUUCUUGGACGCUUCUUGAAGACAAGCAACGUCUGUAGCG
ACCCUUUGCAGGCAGCGGAAUCCCCCACCUGGUGACAGGUGCCUCUGCGGCCGAAAGCCACGU
GUGUAAGACACACCUGCAAAGGCGGCACAACC CCA GUGCCACGUUGUGCGUUGGAUAGUUGUG
GAAAGAGUCAAAUGGCUCUCCUCAAGCGUAUUAACAAGGGGCUGAAGGAUGCCCAGAAGGUA
CCCCACUGGCUGGGAUCUGAUCUGGGGCCUCGGUGCGCGUGCUUUACACGCGUUGAGUCGAGG
UUAAAAACGUCUAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGUGGUUUUCCUUGAAAACCACGACAAU
AAUAUGGGAAGCAGAUCUGGAGCGGCCGCCAGCGGC GUGAGCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAG
AUCAGC UAAUAGCGCGGUCACUGGCACAACGCGUUACCCGGUAAG CCA ACCGGGUGUACACGG
UCGUCAUACCGCAGACAGGGUUCUUCUACUUGCAAGAUAAACUAGAGUAGUAAAAUAAAUAG
UUUUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

MV 5'-GBE MT (5'MT)

```

GGUAAUACGACUCACUAUA GUCACAUUACUGGCCGAAGCCGCUUGGAAUAAGGCCGGUGUGCG
UCUGUCUAUAUGUUACUUCUACUACAUUGUCGUCUGUGACGAUGUAGGGGGCCCGGAACCUUGU
CCUGUCUUCUUGACGAGUAUUCUAGGGGUCUUUCCCCUCUCGACAAAGGAAUACAAGGUCUG
UUGAAUGUCGUGAAGGAAGCAGUUCUUGGACGCUUCUUGAAGACAAGCAACGUCUGUAGCG
ACCCUUUGCAGGCAGCGGAAUCCCCCACCUGGUGACAGGUGCCUCUGCGGCCGAAAGCCACGU
GUGUAAGACACACCUGCAAAGGCGGCAC U ACC SGU GUGCCACGUUGUGCGUUGGAUAGUUGUG
GAAAGAGUCAAAUGGCUCUCCUCAAGCGUAUUAACAAGGGGCUGAAGGAUGCCCAGAAGGUA

```

CCCCACUGGCUGGGAUCUGAUCUGGGGCCUCGGUGCGCGUGCUUUACACGCGUUGAGUCGAGG
 UUAAAAAACGUCUAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGUGGUUUUCCUUGAAAACCACGACAAU
 AAUAUGGGAAGCAGAUCUGGAGCGGCCGCCAGCGGC **GUGAGCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAG**
AUCAGCUAAUAGCGCGGUCACUGGCACAACGCGUUACCCGGUAAG **CCA**ACCGGGUGUACACGG
 UCGUCAUACCGCAGACAGGGUUCUUCUACUUUGCAAGAUAAACUAGAGUAGUAAAAUAAAUAG
 UUUUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

MV 3'-GBE MT (3'MT)

GGUAAUACGACUCACUAUAGUCACAUUACUGGCCGAAGCCGCUUGGAAUAAGGCCGGUGUGCG
 UCUGUCUAUAUGUUACUUCUACUACAUAUGUCGUCUGUGACGAUGUAGGGGCCCGGAACCUGGU
 CCUGUCUUCUUGACGAGUAUCCUAGGGGUCUUUCCCCUCUCGACAAAGGAAUACAAGGUCUG
 UUGAAUGUCGUGAAGGAAGCAGUCCUCUGGACGCUUCUUGAAGACAAGCAACGUCUGUAGCG
 ACCCUUUGCAGGCAGCGGAAUCCCCACCUGGUGACAGGUGCCUCUGCGGCCGAAAGCCACGU
 GUGUAAGACACACCUGCAAAGGCGGCACAACC **CCA**GUGCCACGUUGUGCGUUGGAUAGUUGUG
 GAAAGAGUCAAUUGGCUCUCCUCAAGCGUAUUAACAAGGGGCUGAAGGAUGCCCAGAAGGUA
 CCCCACUGGCUGGGAUCUGAUCUGGGGCCUCGGUGCGCGUGCUUUACACGCGUUGAGUCGAGG
 UUAAAAAACGUCUAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGUGGUUUUCCUUGAAAACCACGACAAU
 AAUAUGGGAAGCAGAUCUGGAGCGGCCGCCAGCGGC **GUGAGCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAG**
AUCAGCUAAUAGCGCGGUCACUGGCACAACGCGUUACCCGGU **UAG** **GGU**ACCGGGUGUACACGG
 UCGUCAUACCGCAGACAGGGUUCUUCUACUUUGCAAGAUAAACUAGAGUAGUAAAAUAAAUAG
 UUUUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

MV 5'-3'-GBE MT (2xMT)

GGUAAUACGACUCACUAUAGUCACAUUACUGGCCGAAGCCGCUUGGAAUAAGGCCGGUGUGCG
 UCUGUCUAUAUGUUACUUCUACUACAUAUGUCGUCUGUGACGAUGUAGGGGCCCGGAACCUGGU
 CCUGUCUUCUUGACGAGUAUCCUAGGGGUCUUUCCCCUCUCGACAAAGGAAUACAAGGUCUG
 UUGAAUGUCGUGAAGGAAGCAGUCCUCUGGACGCUUCUUGAAGACAAGCAACGUCUGUAGCG
 ACCCUUUGCAGGCAGCGGAAUCCCCACCUGGUGACAGGUGCCUCUGCGGCCGAAAGCCACGU
 GUGUAAGACACACCUGCAAAGGCGGCAC **U**ACC **SGU**GUGCCACGUUGUGCGUUGGAUAGUUGUG
 GAAAGAGUCAAUUGGCUCUCCUCAAGCGUAUUAACAAGGGGCUGAAGGAUGCCCAGAAGGUA
 CCCCACUGGCUGGGAUCUGAUCUGGGGCCUCGGUGCGCGUGCUUUACACGCGUUGAGUCGAGG
 UUAAAAAACGUCUAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGUGGUUUUCCUUGAAAACCACGACAAU
 AAUAUGGGAAGCAGAUCUGGAGCGGCCGCCAGCGGC **GUGAGCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAG**

AUCAGC UAAUAGCGCGGUCACUGGCACAACGCGUUACCCGGU UAG GGU ACCGGGUGUACACGG
 UCGUCAUACCGCAGACAGGGUUCUUCUACUUUGCAAGAUAAACUAGAGUAGUAAAAUAAAUAG
 UUUUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

MV 5'-UTR, GBE WT

GGAUCC GGUAUUACGACUCACUAUA GGCAACGUCUGUAGCGACCCUUUGCAGGCAGCGGAAUC
 CCCACCUGGUGACAGGUGCCUCUGCGGCCGAAAGCCACGUGUGUAAGACACACCUGCAAAGG
 CGGCACAACC CCA GUGCCACGUUGUAAGCUU

MV 5'-UTR, GBE MT

GGAUCC GGUAUUACGACUCACUAUA GGCAACGUCUGUAGCGACCCUUUGCAGGCAGCGGAAUC
 CCCACCUGGUGACAGGUGCCUCUGCGGCCGAAAGCCACGUGUGUAAGACACACCUGCAAAGG
 CGGCACU ACC GGU GUGCCACGUUGUAAGCUU

MV 3'-UTR, GBE WT

GGAUCC GGUAUUACGACUCACUAUA GUAGCGCGGUCACUGGCACAACGCGUUACCCGGUAAG C
 CA ACCGGGUGUACACGGUCGUCAUACCGCAGACAGGGUUCUUCUACUUUGCAAGAUAAACUAG
 AGUAGUAAAAUAAAUAGUUUUAAAAGCUU

MV 3'-UTR, GBE MT

GGAUCC GGUAUUACGACUCACUAUA GUAGCGCGGUCACUGGCACAACGCGUUACCCGGU UAG G
 GU ACCGGGUGUACACGGUCGUCAUACCGCAGACAGGGUUCUUCUACUUUGCAAGAUAAACUAG
 AGUAGUAAAAUAAAUAGUUUUAAAAGCUU

TMEV 3'-UTR, GBE WT

GGAUCC GGUAUUACGACUCACUAUA AGACAUCCUCUCGAUCGGAUCGCAACGCUUUACCCUAGA
 AG CCA CUAGGGUGUACGCGGCCGUUCUGACGUUGGAAUUCUUUUAGGCAAAGUUGUGUAGAU
 GCUUAUAAUUGGAAAUGAGAAUAAGCUU

TMEV 3'-UTR, GBE MT

GGAUCCGGUAAUACGACUCACUAUAGACAUCCUCUCGAUCGGAUCGCAACGCUUUACCCUAGU
AGGGUCUAGGGUGUACGCGGCCGUUCUGACGUUGGAAUUCUUUUAGGCAAAGUUGUGUAGAU
GCUUAUAAUUGGAAAUGAGAAUAAGCUU

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erklärung der Probenbezeichnungen	22
Tabelle 2: Geräte	85
Tabelle 3: Chemikalien	86
Tabelle 4: Enzyme	88
Tabelle 5: Kits	89
Tabelle 6: Beads	89
Tabelle 7: Antikörper	90
Tabelle 8: Plasmide	90
Tabelle 9: Zelllinien	91
Tabelle 10: Bakterienstämme	91
Tabelle 11: Kulturmedien	92
Tabelle 12: Kulturmedien Zusätze	92
Tabelle 13: Oligonukleotide	93
Tabelle 14: 10x TBE	95
Tabelle 15: GBE-Sequenzen	96
Tabelle 16: IVT-Ansatz	97
Tabelle 17: Lysispuffer	100
Tabelle 18: Physiologischer Waschpuffer (PWB)	101
Tabelle 19: Blockinglösung für Beads	101
Tabelle 20: Tris 1,5 M	103
Tabelle 21: Trenngel 6 %	104
Tabelle 22: Trenngel 20 %	104
Tabelle 23: Tris 0,5 M	104
Tabelle 24: Sammelgel 6 %	105
Tabelle 25: 4x Lämmli-puffer (Proben-Auftragspuffer)	105
Tabelle 26: 10x Laufpuffer	105
Tabelle 27: 1x Laufpuffer	105
Tabelle 28: 10x Transferpuffer	106
Tabelle 29: 1x Transferpuffer	106
Tabelle 30: 10x PBS	106

Tabelle 31: PBS-T	106
Tabelle 32: TBS600-T	111
Tabelle 33: TBS800-T	112
Tabelle 34: TBS1.000-T	112
Tabelle 35: TBS150-T	112
Tabelle 36: RIPA-Puffer	112
Tabelle 37: RQ1-Puffer	113
Tabelle 38: PNK-Puffer	113
Tabelle 39: LDS-Ladepuffer	115
Tabelle 40: PNK-Mix	116
Tabelle 41: pre-Amplification PCR	119
Tabelle 42: Optimierungs PCR	120
Tabelle 43: präparative PCR	121
Tabelle 44: 5x PNK dePPL Puffer	121
Tabelle 45: Phosphatase-Mix	122
Tabelle 46: TBS400-T	122
Tabelle 47: Ligase-Mix	122
Tabelle 48: PK-Puffer	122
Tabelle 49: PK-Puffer + Urea	123
Tabelle 50: RT-Mix	123
Tabelle 51: Linker Ligation	123
Tabelle 52: pre-Amplification PCR-Mix	123
Tabelle 53: Optimierungs PCR Mix	124
Tabelle 54: Präparativer PCR-Mix	124

10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines Picornavirus.....	4
Abb. 2: Schematische Darstellung des Cardiovirus-Genoms mit Polypeptid und viralen Proteinasen.....	5
Abb. 3: EMCV 5'-UTR mit Poly(C)-Trakt und IRES.....	8
Abb. 4: IRES-Typen (1,2 und 4).....	10
Abb. 5: Vergleich der Initiationskomplexe von Cap-abhängiger Translation zellulärer mRNAs und IRES-abhängiger viraler Translation.....	12
Abb. 6: Lebenszyklus eines Picornavirus. Der dargestellte Lebenszyklus ist weitestgehend auf alle Picornaviren zu übertragen.	13
Abb. 7: Struktureller Überblick von E71GSF-tRNAGly-glycine-AMPPNP.....	17
Abb. 8: Schematische Darstellung der verwendeten Mengovirus-Reporter-RNA.	20
Abb. 9: Western Blot zur Testung des vorhandenen Pull-Down Protokolls.	21
Abb. 10: Überprüfung der RNA während des Pull-Downs.....	23
Abb. 11: Optimierung der Pull-Down-Aufreinigung.	25
Abb. 12: Überprüfung der Biotinylierung mittels Streptavidin-Shift.....	27
Abb. 13: Streptavidin-Shift mit 3'-Biotinmarkierung.....	29
Abb. 14: Erster Western Blot mit verbessertem Pull-Down..	32
Abb. 15: Western Blot mit angepasster RNA- und Zellmenge.....	34
Abb. 16: Western Blot mit SDS als Release-Test.....	36
Abb. 17: Western Blot mit geblockten Beads und Release-Test.....	38
Abb. 18: Western Blot zur Optimierung des Protein-Release.....	40
Abb. 19: Detaillierte Darstellung beider gefundener Mengovirus GBEs.....	43
Abb. 20: Western Blot zur Bestätigung der Bindung von GARS an das Mengovirus 3'-GBE.	44
Abb. 21: Western Blot zur Bestätigung der Bindung von GARS an die Mengovirus 3'-GBE mit zusätzlicher Verwendung des DAP5-Antikörpers.	47
Abb. 22: Western Blot zur Bestätigung der Bindung von GARS an die Mengovirus 5'-GBE	50
Abb. 23: Schematische Darstellung der UTR-Sekundärstrukturen der verwendeten UTR-Konstrukte.....	52
Abb. 24: Bindungsintensität der einzelnen MV UTRs und Bindungsnachweis eines nahen Verwandten des MV, dem TMEV.	53

Abb. 25: Die Mutation der GBE beeinträchtigt die Interaktion der RNA mit Proteinen. Virale	55
Abb. 26: Die Mutation der GBE beeinträchtigt die Interaktionen von Proteinen, die an RNA-Translation und Metabolismus beteiligt sind	58
Abb. 27: Ausgewählte Proteingruppen mit überwiegend verringerter Abundanz in den Proben der GARS-Mutanten.	60
Abb. 28: Schematische Darstellung des iCLiP2 Verfahrens.	64
Abb. 29: Kontrolle zur Auswahl der GARS gebundenen RNAs aus der WB-Membran. ..	66
Abb. 30: Überblick der iCLiP2 Daten für die transfizierten Mengovirus-Reporter-RNA-Konstrukte.	68
Abb. 31: Zoom des 5'-GBEs der iCLiP2 Daten.	69
Abb. 32: Zoom des 3'-GBEs der iCLiP2 Daten.	70
Abb. 33: Auswirkung des GBEs auf die Translation des Mengovirus.	76
Abb. 34: GARS beeinflusst die Replikation des Mengovirus	77
Abb. 35: Schematische Darstellung des GARS-Dimers und der Translationsinitiation. ..	80
Abb. 36: Schematischer Zusammenbau eines Wet-Blot.	103
Abb. 37 Test IP zu Bestimmung der NaCl Konzentration des Waschpuffers	110
Abb. 38 Test IP zu Kontrolle des Antikörpers und der zu verwendenden Menge.	111
Abb. 39 Bestimmung der optimalen RNase Konzentration für iCLiP2	115
Abb. 40: Zweiter Western Blot zur Bestätigung der Bindung von GARS an das Mengovirus 3'-GBE	141
Abb. 41: Zweiter Western Blot zur Bestätigung der Bindung von GARS an das Mengovirus 5'-GBE	142
Abb. 42: Bindungsintensität der einzelnen MV UTRs und Bindungsnachweis eines nahen Verwandten Replikat 2.	143
Abb. 43: Darstellung der Bandenintensität des Inputs	144

11. Abkürzungen und Einheiten

%	Prozent
&	und
(-)ssRNA	negative einzelsträngige RNA
(+)ssRNA	positive einzelsträngige RNA
*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$
***	$p < 0,001$
****	$p < 0,0001$
~	ungefähr
<	kleiner als
>	größer als
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µl	Mikroliter
2x 2xMT	Mengovirus Klon mit Mutationen in beiden GBEs
3'	Richtung der Nukleinsäure (3-C)
3' 3'MT	Mengovirus Klon mit Mutationen in der 3'-GBEs
5'	Richtung der Nukleinsäure (5-C)
5' 5'MT	Mengovirus Klon mit Mutationen in der 5'-GBEs
A	Adenin
aaRS	aminoacyl-tRNA Synthetase
Abb.	Abbildung
ABD	Anticodon-Binde-Domäne
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
Ap4A	Diadenosintetraphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin (Albumin Fraktion V)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA

cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRE	cis replikatorisches Element
C-terminal	Carboxy Ende
CTP	Cytidintriphosphat
DAP5	<i>death asociated protein 5</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM++	DMEM mit 10 % FBS und Penicillin (10 U/ml) /Streptomycin (10 µg/ml)
DMPC	<i>dimethyl pyrocarbonate</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
eIF4G	eukaryotischer Initiationsfaktor 4G
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
EP	Elektroporation
et al.	und andere
FBS	Fetales Kälberserum
FMDV	Maul- und Klauen-Seuche Virus
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GARS	Glycyl-tRNA Synthetase
GBE	GARS-Bindeelement
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden (engl. "hours")
H ₃ BO ₃	Borsäure
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
iCLiP2	<i>individual-nucleotide resolution crosslinking and immunoprecipitation 2</i>
Inp	Input
IP	Immunpräzipitation
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
ITAF	<i>IRES trans acting factor</i>
IVT	in vitro Transkription

kb	Kilobasen
kcal/mol	Kilokalorien pro Mol
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KIO ₄	Kaliumperiodat
LB	<i>lysogeny broth</i>
LDS	Lithiumdodecylsulfat
log ₂	Logarithmus zur Basis 2
M	Mol
M	Marker
mA	Milliampere
MARS	Multi aminoacyl tRNA-Synthetase Komplex
MassSpec	Massenspektrometrie (engl. "Mass Spectrometry")
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
Mio.	Millionen
mJ/cm ²	Millijoule pro Quadratcentimeter
ml	Milliliter
mM	Millimol
ms	Millisekunden
MT	Mutante
MV	Mengovirus
n.s.	nicht signifikant
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOCl	Natriumhypochlorit
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP-40	Tergitol NP-40
nt	Nukleotid
N-terminal	am Amino-Ende
oN	über Nacht (engl. "over night")
p	Wahrscheinlichkeit des Testergebnisses
PAA	Polyacrylamid

PABP	Poly A Bindeprotein
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCBP	Poly C Bindeprotein
PCBP1	Poly(rC)-Bindeprotein 1
PCBP2	Poly(rC)-Bindeprotein 2
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG400	Polyethylenglykol 400
PEG8000	Polyethylenglykol 8000
pH	Potential des Wasserstoffs
pmol	Pikomol
PNK	Polynukleotidkinase
PTB	Polypyrimidine Trakt-Bindeprotein
PV	Poliovirus
PWB	Physiologischer Waschpuffer
RBP	RNA Binde-Protein
RF	replikative Form
RI	Replikatives Intermediat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RRL	<i>rabbit reticulocyte lysate</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
secNLuc	sekretierbare nano Luciferase
T	Thymin
T4	Enterobakterien Phage T4
T7	Bakteriophage T7
TBE	Tris/Borat/EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMEV	<i>Theiler's Murine Encephalomyocarditis Virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Uracil
u/μl	Units pro Mikroliter
U/ml	Units pro Milliliter
UNRIP	<i>unr-interacting protein</i>
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierte Region

V	Volt
v	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VPg	Virales Protein, genomgebunden
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
β	Beta
γ	Gamma

12. Danksagung

Zum Schluss meiner Arbeit bedanke ich mich, als erstes ganz herzlich bei meinem Betreuer Apl. Prof. Dr. Michael Niepmann, dass ich meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen konnte und für seine Unterstützung sowie die hilfreichen Gespräche zu diesem Thema.

Ebenso herzlich bedanke ich mich bei meinem internen Betreuer und Gutachter PD Dr. habil. Oliver Rossbach. Vielen Dank für deine hilfreichen Ratschläge zu meinen theoretischen und praktischen Hürden und für die Möglichkeit auch einen Versuch (iCLiP2) in deinem Labor durchzuführen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Apl. Prof. Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg und Herrn Prof. Dr. Kai Thormann, für ihre Bereitschaft meine Prüfungskommission zu bilden.

Auch meinen ehemaligen Kollegen Dimitar und Tim danke ich für Ihre Unterstützung während unserer gemeinsamen Zeit im Labor.

Ein großer Dank geht an meine Freunde Max, Nico und Yannic für Euren Rat bei Problemen und vor allem die geselligen Abende, bei denen man sich von jedem Fehlschlag im Labor erholen konnte. Hier nochmal ein besonderer Dank an Yannic, da Du mich während des iCLiP2 jeden Tag unterstützt hast und immer ein offenes Ohr für meine Fragen hattest.

Besonders möchte ich mich bei meiner Kollegin und besten Freundin Michelle bedanken. Mit deinem Rat und deinem offenen Ohr hast du mich nicht nur im Labor, sondern auch im Alltag immer unterstützt. Mit Dir war jeder Tag im Labor ein angenehmer Tag. Auch gilt Dir ein großer Dank für deine Korrektur und Kommentare zu diesem Manuskript. Vor allem Danke für die massiv schönen Abende mit Dir.

Bei meiner Partnerin Ana bedanke ich mich dafür, dass Du jedes Hoch und Tief während meiner Promotion mitgemacht hast auch wenn ich anstrengend war und dafür, dass Du mich immer wieder aufgebaut und ausgehalten hast. Danke Ana.

Zum Abschluss geht der größte Dank an meine Eltern. Vielen Dank für eure Liebe und Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg. Danke, dass ihr immer bei mir wart und mir das Studium ermöglicht habt. Danke für eure Hilfe, euer offenes Ohr und eure lieben Worte.

13. Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Angaben zu auf künstlicher Intelligenz (KI) basierender Hilfen wie ChatGPT oder SchulKI von OpenAI oder Gemini von Google zur Erstellung meiner Dissertation (Zutreffendes angekreuzt):

Ich habe bei der Erstellung dieses Textes kein KI-Tool verwendet.

Ich habe ein KI-Tool in den folgenden Bereichen eingesetzt (Mehrfachnennungen möglich):

Ideen finden, meine Kreativität anregen

Verstehen von Konzepten, Recherche von Fakten und Definitionen

Optimierung eines von mir verfassten Textes

Erstellen ganzer Textpassagen nach meinen Vorgaben

Folgende KI-Tools habe ich verwendet, damit aufgeführte Teile meines Textes von dem Tool wie folgt profitiert haben:

Datum: _____ Unterschrift: _____