

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fachbereiche
Biologie, Chemie und Geowissenschaften
im Fachbereich Biologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Gergis Bassili

Diplom-Biologe

**Biochemisches Institut
der Medizinischen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität Giessen**

Gießen, Dezember 2003

Charakterisierung einer konservierten Region
in der Internen Ribosomen-Eintrittsstelle der RNA
des Maul- und Klauenseuche-Virus

Betreuer:

P.D. Dr. M. Niepmann
Biochemisches Institut
Fachbereich Humanmedizin

Prof. Dr. A. Bindereif
Institut für Biochemie
der Universität Gießen

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2000 bis Dezember 2003 im Labor von Prof. Dr. Ewald Beck im Biochemischen Institut am Klinikum der Justus-Liebig-Universität in Giessen angefertigt. Die Promotion wurde durch den Sonderforschungsbereich 535, „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“ im Rahmen des Teilprojekts B1 gefördert.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen ganz herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Ewald Beck danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und sein ungeheures Engagement für seine Mitarbeiter.

Herrn Prof. Bindereif danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates im Fachbereich Biologie.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Michael Niepmann für die gute Betreuung dieser Arbeit, die gute Zusammenarbeit und für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, die essentiell für den Erfolg dieser Arbeit waren.

Den Kollegen im Labor danke ich für die vielen netten Situationen, die die Zeit im Labor sehr angenehm gemacht haben:

Boran Altincicek, Phil Conde, Hassan Jomaa, Yutong Song, Eleni Tzima, Christiane Jünemann, Ralf Füllkrug, Dajana Henschker, Ursula Jost, Ann-Kristin Kollas, Barbara Preiss, Lanja Saleh, Silke Sanderbrand, Irina Steinbrecher, Jochen Wiesner.

Mein besonderer Dank gilt Kerstin Ochs für ihre allzeit kollegiale Unterstützung, die mir stets eine große Hilfe war.

Insbesondere danke ich auch Marcus Drewes für seine langjährige Freundschaft und die notwendige Ablenkung von Zeit zu Zeit; Jan Haskamp danke ich für die helfende Hand in Sachen Computer.

Weiterhin sei meiner Familie und meinen anderen Freunden gedankt, die ebenfalls – meist indirekt – zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein innerhalb der Gruppe der Cardio- und Aphthoviren hochkonserviertes Sequenzelement in der viralen internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) im Bezug auf die Bindung des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF4G und der Translationsaktivität des FMDV- (engl. für: foot-and-mouth-disease virus) IRES-Elements untersucht.

Das FMD-Virus mit seinen sieben Serotypen ist der einzige Vertreter der Gruppe der Aphthoviren und gehört zur Familie der *Picornaviridae*. Im Gegensatz zur Translation zellulärer eukaryotischer mRNAs findet die Initiation der Translation bei diesen Virus-RNAs nicht Cap-abhängig am 5'-Ende der RNA statt, sondern erfolgt intern an einer hoch strukturierten Region im 5'-nichttranslatierten Bereich der viralen RNA. Aufgrund der Struktur ihrer IRES-Elemente werden die *Picornaviridae* in drei Gruppen untergliedert, wobei die FMDV-IRES zu den Typ II Elementen zählt. Das IRES-Element besteht aus fünf unterschiedlich strukturierten Haarnadelstrukturen, den sogenannten Stem-Loops, denen sich ein Polypyrimidin-Trakt und zwei Translationsstartcodons anschließen. Das hier untersuchte konservierte Sequenzelement befindet sich im Stem-Loop 4, der auch die Hauptbindungsdomäne für die zellulären Initiationsfaktoren eIF4G und eIF4B ist. eIF4G kommt im Initiationskomplex eIF4F zusammen mit den Faktoren eIF4E und eIF4A vor und wird als multifunktionales Adapterprotein angesehen, da es während der Translationsinitiation noch mit weiteren Proteinen interagiert. eIF4G vermittelt den Kontakt der ribosomalen 40S-Untereinheit mit der zellulären beziehungsweise picornaviralen mRNA, was voraussetzt, dass eIF4G selbst an die mRNA binden muss.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das untersuchte Sequenzelement essentiell für die Bindung von eIF4G ist. Mit verschiedenen Mutationen, die sowohl nur die Primärsequenz als auch die Sekundärstruktur verändern, konnten unterschiedliche Bindungsaffinitäten von eIF4G zu den jeweiligen Mutanten-IRES-RNAs und damit übereinstimmend auch unterschiedliche Translationsaktivitäten der jeweiligen IRES-Elemente festgestellt werden. So zeigten die Mutationen in einem Bereich mit vier gepaarten Nukleotiden, dass sowohl die Primärsequenz als auch die Sekundärstruktur wichtig sind. Mutationen in zwei ungepaarten Dinukleotid-Bereichen ergaben, dass hier die Sekundärstruktur wichtiger als die Primärsequenz ist. Verschiedene Mutationen in einem weiteren Bereich mit zwei gepaarten Dinukleotiden führten zu dem Schluss, dass dieser Bereich nur indirekt an einer Bindung von eIF4G beteiligt ist, sondern eher zur Aufrechterhaltung der sterischen Bedingungen in dieser konservierten Region beiträgt. Der Versuch, das Translationsdefizit durch Erhöhung der eingesetzten RNA-Mengen zu kompensieren, führte zu der Beobachtung, dass dadurch die Wahl des Translationsstarts beeinflusst wird.

Die Bindungs- und Translationsstudien wurden bei verschiedenen Kaliumchlorid-Konzentrationen durchgeführt und zeigen, dass die Bindung von eIF4G an die Mutanten-IRES-RNAs auch von der Salzkonzentration beeinflusst wird. Darüber hinaus wurde ebenfalls ein cis-Effekt des FMDV-IRES-Elements im dicistronischen Kontext auf das 5'-gelegene Reportergen beobachtet.

II Abkürzungen und Fachbegriffe

°C	Grad Celsius
μ	micro-
A	Adenin
Abb.	Abbildung
amp ^R	Ampicillinresistenz
annealing	Anlagerung von Nukleinsäuresträngen
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
blunt ends	„stumpfe“ DNA-Enden
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinder-Serumalbumin)
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Cap	am 5'-Ende eukaryotischer mRNAs in 5'-5'-Orientierung angehängtes 7-Methyl-Guanosin
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
Ci	Curie, 1 Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Bq (Bequerel)
CSFV	<i>classical swine fever virus</i> (klassisches Schweine-Fieber-Virus)
CTP	Cytosintriphosphat
d	Desoxy-
dd	Didesoxy-DNA
<i>deoxyribonucleic acid</i>	(Desoxyribonukleinsäure)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FMDV	<i>foot-and-mouth disease virus</i> (Maul- und Klauenseuche-Virus)
G	Guanin
H	Stunde
HAV	Hepatitis A-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus

IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i> (Interne Ribosomen Eintrittsstelle)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Loop	einzelsträngige Schleifenregion einer RNA
Min.	Minute
mRNA	<i>messenger-RNA</i> (Boten-RNA)
nt	Nukleotide (Länge von DNA-Fragmenten)
NTP	Nukleosidtriphosphat
NTR	<i>non translated region</i> (nichttranslatierte Region)
O ₁ K	O ₁ Kaufbeuren (FMDV-Isolat aus Kaufbeuren)
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
PAA	Polyacrylamid
PBS	Saliner Phosphat Puffer („phosphate buffer, saline“)
PABP	Poly(A)-Binding Protein
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
Pellet	Sediment nach Zentrifugation
Primer	DNA-Oligonukleotid als Starter für DNA-Kettenverlängerung
Promotor	DNA-Erkennungssequenz für die RNA-Polymerase
PTB	Polypyrimidin-Trakt Bindungs-Protein
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
RT	Raumtemperatur
scanning	„Entlanggleiten“ der ribosomalen 40S-Untereinheit an der RNA
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)

Stem-Loop	Haarnadelstruktur einer einzelsträngigen DNA oder RNA, die mit sich selbst Basenpaar ausbildet und am Ende einen Loop (Schleife) bildet
sticky ends	„klebrige“ DNA-Enden (überstehende Einzelstränge)
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Template	Matrize bei Polymerase-Reaktion
TMEV	Theiler's Murine Encephalomyelitis-Virus
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
UV-Crosslink	Methode zur kovalenten Bindung von Proteinen an RNA
v/v	Volumen-/Volumen-Verhältnis
w/v	Gewichts-/Volumen-Verhältnis

Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung

II Abkürzungen und Fachbegriffe

III Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Familie der Picornaviren.....	1
1.2	Struktur und Genomorganisation	3
1.3	Infektionszyklus.....	5
1.4	Die Translation	7
1.4.1	Die Translation bei Eukaryoten	7
1.4.2	Der eukaryotische Initiationsfaktor eIF4G	11
1.4.3	Die proteolytische Spaltung von eIF4G.....	13
1.4.4	Der eukaryotische Initiationsfaktor eIF4B.....	14
1.4.5	Die interne Initiation der Translation.....	15
1.4.6	An der Initiation der Translation bei Picornaviren beteiligte eukaryotische Proteinfaktoren	17
1.4.7	Das Polypyrimidintrakt-Bindungs-Protein (PTB).....	19
1.5	Zielsetzung der Arbeit	20
2	Ergebnisse I	20
2.1.	Analyse eines konservierten Sequenzelementes der internen Ribosomalen Eintrittsstelle (IRES).....	20
2.1.1	Übersicht der untersuchten Mutationen im konservierten Sequenzelement des Stem-Loops 4 – 1 der FMDV-IRES	21
2.1.2	Bindung von eIF4G an die FMDV-IRES-Mutanten-RNAs	23
2.1.3	Analyse der Bindungsspezifität der eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF4G und eIF4B	25
2.1.4	Ergebnisse der <i>in vitro</i> -Translation.....	27
2.1.5	Einfluss monovalenter Kationen auf die Bindung von eIF4G an die FMDV-IRES-Mutanten-RNAs.....	29
2.1.6	Untersuchung zur IRES-Aktivität von ausgesuchten Mutanten-IRES-RNAs b bei unterschiedlichen Kaliumchloridkonzentrationen.....	31
2.1.7	Die Bindung der eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren eIF4G und eIF4B bei den gewählten Hochsalzbedingungen (120 mM KCl)	33
2.1.8	Untersuchungen zur IRES-Aktivität bei hohen Kaliumkonzentrationen (120 mM KCl) und <i>in vivo</i>	35
2.1.9	Die Zugabe von eIF4F kann den funktionellen Defekt der IRES-Aktivität nicht wiederherstellen.....	37

2.1.10	Einfluss von eIF4F auf die Bindung der endogenen Initiationsfaktoren 4G und 4B an die FMDV-IRES RNA.....	38
2.1.11	Crosslink – Analyse alternativer Mutation der gepaarten Dinukleotide.....	39
2.1.12	<i>In vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Translationsdaten korrelieren mit den Resultate der Bindungsstudien mit denAT-Mutanten.....	40
2.1.13	Der C-terminale Teil von eIF4G hat einen stimulierenden Effekt auf die Translation der Mutanten-IRES-RNA.....	42
2.1.14	Das „Ribosomenscanning“ wird durch die Mutationen in der konservierten Region beeinflusst.....	43
2.1.15	Diskussion zu Teil I.....	46
	Synthese von RNAs durch <i>in vitro</i> -Transkription.....	46
	Der UV-Crosslink – die Methode der Wahl.....	46
	Vor- und Nachteile der verwendeten Translationssysteme.....	48
2	Ergebnisse II	50
2.2	Untersuchung zur CAT-Expression im dicistronischen Kontext unter dem Einfluss von IRES-Mutanten und monovalenten Kationen	50
2.2.1	Die FMDV-Wildtyp-IRES erhält die Effizienz der 5'-abhängigen Translation bei steigender Salzkonzentration im dicistronischen Kontext.....	51
2.2.2	Untersuchung zur weiteren Klärung des Einflusses der FMDV-IRES auf die CAT-Expression	53
2.2.3	Diskussion zu Teil II.....	55
	Das Phänomen des „CAT-Effektes“ – ein positiver cis-Effekt?.....	55
3.	Schlussdiskussion	59
3.1	Der Einfluss des konservierten Elementes auf die Bindung von eIF4G.....	59
3.2	Der Einfluss von Primärsequenz und Sekundärstruktur auf die Bindung von eIF4G ist nicht klar zu trennen.....	61
3.3	Mögliche Bedeutung der Konservierung der Primärsequenz.....	63
3.4	Die Bindung von eIF4B, PTB und dem p50-Polypeptid an die FMDV-Mutanten-IRES-RNA.....	64
3.5	Die Beteiligung der eukaryotischen Initiationsfaktoren bei der Translationsinitiation an picornaviralen IRES-Elementen.....	65
3.6	Die Auswahl des Translationsstartes	67
3.7	Die Wahl des Starter-AUGs in Abhängigkeit von der RNA-Menge	70
4	Material	73
4.1	Bakterienstämme	73
4.2	Kulturmedien für Bakterien	73
4.3	Plasmide.....	74
4.4	Sequenzier- und Klonierungsprimer	74
4.5	Enzyme.....	75

4.5.1	Restriktionsendonukleasen	76
4.5.2	Sonstige Enzyme	76
4.6	Radioaktive Chemikalien	77
4.7	Nukleotide und Nukleotidanaloga	77
4.8	Größenstandards	77
4.8.1	Protein-Größenstandards	77
4.9	Chemikalien und anderes Material	78
4.9.1	Spezielle Chemikalien	78
4.9.2	<i>In vitro</i> -Translationssystem	79
4.9.3	Kits	79
4.9.4	Fotomaterial und Röntgenfilme	79
4.10	Geräte	79
4.11	Lösungen und Puffer	80
4.11.1	Puffer für DNA- und RNA-Gelelektrophorese	80
4.11.2	Puffer für Protein-Gelelektrophorese	80
4.11.3	Puffer für molekularbiologische Methoden	81
4.11.4	Puffer für Plasmid DNA-Präparationen.....	82
4.11.5	Puffer und Lösungen für die DNA-Reinigung mit Affinitätsäulen	82
4.11.6	Puffer für Protein-RNA-Wechselwirkungen.....	82
4.11.7	Puffer für die <i>in vitro</i> -Translation	83
4.12	Materialien und Chemikalien für Zellkultur.....	83
5	Methoden	84
5.1	Zellkultur.....	84
5.1.1	Nährmedium.....	84
5.1.2	Auftauen von Zellen.....	84
5.1.3	Mediumwechsel.....	84
5.1.4	Passagieren von Monolayerkulturen (adhärente Zellen).....	85
5.1.6	Einfrieren von Zellen.....	85
5.2	Mikrobiologische Methoden	85
5.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	85
5.2.2	Transformation von <i>E. coli</i>	86
5.3	Molekularbiologische Methoden	86
5.3.1	Präparation von Plasmid-DNA	86
5.3.2	Gelfiltration von RNA	89
5.3.3	Enzymatischen Modifikation von DNA	90
5.3.4	Proteinase K-Verdau	91
5.4	PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)	92
5.5	<i>In vitro</i> -Transkription und <i>in vitro</i> Translation	95
5.5.1	<i>In vitro</i> -Transkription mit SP6-Polymerase	95
5.5.2	Synthese radioaktiv markierter RNA	95

5.5.3	<i>In vitro</i> Translation	96
5.5.4	Synthese radioaktiv markierter Proteine durch <i>in vitro</i> Translation	96
5.5.5	<i>In vivo</i> Translation (Transfektion von adhären Zellen).....	97
5.5.6	Präparation eines Zellextrakts aus <i>in vivo</i> Translation.....	97
5.6	Nachweis der Expression des Luciferasegens	97
5.7	RNA-Protein-Wechselwirkung	98
5.7.1	„UV-Crosslink“-Assay: Kovalente Bindung von Proteinen an RNA	98
5.8	Gelelektrophorese	99
5.8.1	Agarose-Gelelektrophorese	99
5.8.2	Denaturierende Polyacrylamidgele zur Auftrennung von RNA	99
5.8.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Proteinen	99
5.9	Autoradiographie	100
6	Anhang	101
7	Literatur	107

1 Einleitung

Viren (lateinisch *virus*: Gift) sind in Proteinhüllen verpackte Stücke genetischen Materials, die den Stoffwechsel geeigneter (lebender) Wirtszellen auf die Produktion neuer Viren derselben Art umprogrammieren können. Viren haben keinen eigenen Stoffwechsel, daher lassen sie sich nicht im klassischen Sinne zu den lebenden Organismen zählen. Jedes Virus enthält nur entweder doppel- oder einsträngige DNA bzw. RNA. Isolierte virale Nukleinsäure ist in vielen Fällen infektiös, in vielen Fällen wird aber auch die Virusvermehrung erst durch spezielle im Viruspartikel mitgebrachte Enzyme eingeleitet.

Außerhalb der Wirtszelle können manche Viren über viele Jahre in völlig inaktivem Zustand verharren. Viren kommen in Bakterien (dort werden sie als Bakteriophagen bezeichnet), in Pflanzen und in Tieren vor und verursachen beim Menschen neben leichten Erkrankungen wie dem gewöhnlichen Schnupfen oder Mumps auch tödliche Krankheiten wie zum Beispiel hämorrhagisches Fieber (Ebola Virus, Marburg Virus), AIDS (HIV), oder wie im Jahr 2002 SARS (severe acquired respiratory syndrome). Diese Erkrankung wird durch ein Coronavirus verursacht, das im Verdacht steht von Tieren auf Menschen übersprungen zu sein (Zoonose).

Die Existenz von Viren wurde 1892 nachgewiesen, als der russische Wissenschaftler Dmitrij I. Iwanowsky ultrafiltrierbare Partikel des *Tabakmosaikvirus* isolierte, die kleiner als Bakterien waren. Der erste Nachweis eines tierpathogenen Virus gelang dann 1898 F. Löffler und P. Frosch, die das Maul- und Klauenseuche-Virus (engl. foot-and-mouth-disease virus, FMDV) extrahierten (Löffler & Frosch, 1964).

Bis heute gibt es gegen die Mehrzahl aller Virusinfektionen keine geeigneten Therapien, die nur geringe Nebenwirkungen für den Wirtsorganismus haben, daher lassen sich in erster Linie nur die Symptome einer Virusinfektion behandeln. Da Viren keinen eigenen Stoffwechsel besitzen, der als Angriffspunkt für eine Therapie dienen könnte, bleiben nur die Möglichkeiten einer Schutzimpfung oder die spezifische Inhibition der Virusvermehrung. Dazu ist es jedoch notwendig, einerseits die durch die Viren hervorgerufenen pathologischen Veränderungen in der Wirtszelle und andererseits die Vermehrungsstrategien der Viren zu verstehen, um gezielt in den Infektionszyklus der Viren eingreifen zu können. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation eines der wichtigsten Schritte im Vermehrungszyklus der Picornaviren, zu denen auch das eingangs erwähnte Maul- und Klauenseuche-Virus gehört, nämlich der internen Initiation der Translation (dem Start der Proteinsynthese).

1.1 Die Familie der Picornaviren

Die Picornaviren bilden eine der größten Familien der animal- und humanpathogenen Viren und weisen eine weltweite Verbreitung auf. Ein Charakteristikum der Picornaviren ist neben ihrer geringen Gesamtgröße von ca. 30 nm Durchmesser ein positiv orientiertes einzelsträngiges RNA-Genom, wodurch ihr Name ausgehend von „pico“- (griech. „kleine“) RNA geprägt wurde.

Die Picornaviren werden aufgrund ihrer verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften in sechs verschiedene Genera eingeteilt, die Enteroviren, Rhinoviren, Cardioviren, Aphthoviren, Hepatoviren und die Parechoviren. Die derzeit gültige Systematik der Familie *Picornaviridae* ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Zu den wichtigsten humanpathogenen Vertretern der *Picornaviridae* zählen die Polioviren, die Coxsackie- und die Rhinoviren sowie das Hepatitis A-Virus (HAV). Von diesen stellt das Poliovirus, welches 1908 von Popper und Landsteiner entdeckt wurde, das am besten untersuchte Picornavirus dar. Es gehört zur großen Gruppe der pathogenen Enteroviren und gelangt durch orale Aufnahme in den Gastrointestinaltrakt. Dort repliziert es und verbreitet sich gelegentlich auch auf andere Gewebe aus. Das Poliovirus gelangt dabei nur selten (1-2 % aller Infektionen) in das zentrale Nervensystem (ZNS). Ist es jedoch einmal in das ZNS eingedrungen, vermehrt und verbreitet es sich bevorzugt in den Motoneuronen der Grauen Substanz des Rückenmarks, insbesondere in den Vorderhornzellen, und führt zur Lähmung und sogar zum Tod. Diese von Poliovirus verursachte Krankheit wird abstammend von den griechischen Wörtern polios (grau) und myelos (die Graue Substanz des Rückenmarks) als Poliomyelitis (Kinderlähmung) bezeichnet. Seit 1999 gilt die Poliomyelitis in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union als ausgerottet.

Unter den domestizierten Tieren gilt die Maul- und Klauenseuche als eine der ökonomisch bedeutendsten Krankheiten, die durch das Maul- und Klauenseuche- Virus (FMDV), einem Vertreter der Aphthoviren, ausgelöst wird. Die Gruppe der Aphthoviren wird von sieben FMDV-Serotypen gestellt (den europäischen A, C, O, den afrikanischen SAT 1, SAT 2, SAT 3 und dem asiatischen Asia-1) und neuerdings dem Equine Rhinitis A-Virus.

Normalerweise befällt FMDV ausschließlich Paarhufer, besonders Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen, selten kann es jedoch auch zum Befall von Fehlwirten kommen, etwa von immundefizienten Menschen. Die Virusinfektion beginnt typischerweise an den Mukosae des Gastrointestinaltraktes, wo sich nach der frühen Infektion histologisch nachweisbare Primäraphthen (Läsionen) bilden, die besonders im Bereich des Mauls und des Rachenraumes auftreten. In den Primäraphthen findet eine starke Virusvermehrung statt. Die Virionen treten über den Lymphweg in die Blutbahn ein, wo sie bereits 20 Stunden nach der Infektion nachweisbar sind. Über eine Virämie kommt es zur Entstehung von makroskopisch sichtbaren Sekundäraphthen, die sich wiederum vorwiegend im Maul- und Rachenraum, aber auch an den Klauen bilden. Die schmerzhaften Wunden führen zu einer verminderten Nahrungsaufnahme und damit zu Gewichtsverlust, was zwangsläufig zu einer verschlechterten Produktivität der Tierzucht führt. Durch Impfkampagnen und rigorose Schlachtung infizierter Herden wurde die Seuche in West- und Zentraleuropa bis heute ausgerottet.

Genus	Serotypen	Vertreter
Rhinovirus	100	HRV (Human rhinoviruses)
	2	BRV (Bovine rhinoviruses)
Enterovirus	3	Poliovirus
	23	Coxsackievirus A
	6	Coxsackievirus B
	30	ECHO-Virus
	4	Human Enterovirus 68-71
	18	Simian Enterovirus (Affe)
	2	Bovine Enterovirus (Rind)
	8	Porcine Enterovirus (Schwein)
	1	Enterovirus der Maus
Aphthovirus	7	Maul- und Klauenseuche-Virus (FMDV)
Cardiovirus	1	Encephalomyocarditis-Virus (EMCV)*
	1	Theiler's Murine Encephalomyelitis-Virus (TMEV)
Hepatovirus	1	Hepatitis A-Virus (HAV)
Parechovirus	2	Human PeV-1 / humanes peV-2

Table 1: Systematik der Picornaviren (Rueckert, 1996). * Die Anzahl der Serotypen sind keine absoluten Angaben und erheben damit auch nicht den Anspruch der Vollständigkeit. * weitere Vertreter sind: Mengoviren, Columbia SK-Viren, Maus-Elberfeld-Viren (MEV), Mäuseencephalomyelitis (ME) und Mäusemyocarditis-Viren (MM).

Die wenigen Fälle von Maul- und Klauenseuche der letzten Jahre in Europa wurden häufig durch unzureichende Inaktivierung von Vakzinen hervorgerufen (Beck & Strohmaier, 1987), was dazu geführt hat, dass in der Europäischen Union seit 1992 nicht mehr gegen FMDV geimpft wird. Das Risiko der Einschleppung von FMDV durch illegale Einfuhr infizierter Tiere oder von ihnen stammender Erzeugnisse besteht jedoch nach wie vor.

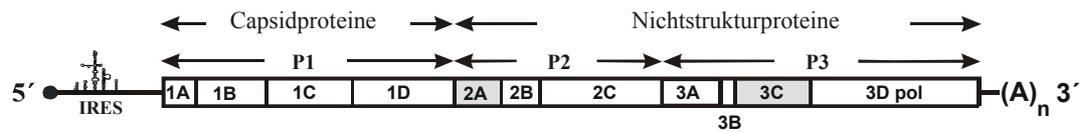
Der letzte große Ausbruch fand 2001 in England statt und griff vereinzelt auch auf den europäischen Kontinent über (Frankreich, Belgien).

1.2 Struktur und Genomorganisation

Das Plusstrang-RNA-Genom der Picornaviren besteht aus etwa 7000-8500 Nukleotiden und ist von einem ca. 30 nm großen Kapsid umgeben. 12 Protein-Pentamere bilden das Kapsid, das die charakteristische Form eines Ikosaeders (zwanzigflächiges Gebilde) zeigt. Fünf gleiche Bausteine (Protomere) bilden ein Pentamer. Die 60 in einem Kapsid vorkommenden Protomere bestehen aus den vier Struktur-Proteinen 1A (VP4), 1B (VP2), 1C (VP3) und 1D (VP1) (Rueckert, 1996).

Nach der Infektion der Zelle wird die virale RNA im Cytoplasma freigesetzt und dort repliziert (Follet *et al.*, 1975). In Abbildung 1 sind schematisch die RNA-Genome von Poliovirus und FMDV dargestellt.

(A) Poliovirus



(B) FMDV

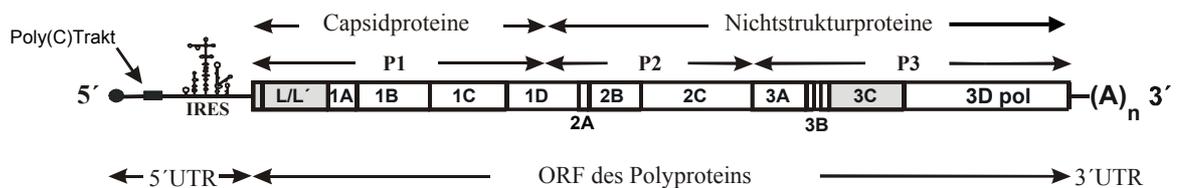


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Genomstruktur der Picornaviren und der viralen Proteasen am Beispiel von Poliovirus und FMDV. Die virus-codierte Protease sind in Kapitel 1.3 beschrieben. Die schnelle Spaltung von eIF4G wird bei Poliovirus durch die 2A-Protease und bei FMDV durch die L-Protease katalysiert. Eine langsamere Spaltung von eIF4A und eIF4G erfolgt bei FMDV durch die 3C-Protease, die Spaltung von PABP bei Poliovirus durch die 2A-Protease. Die IRES von FMDV und Poliovirus sind gekennzeichnet. Die Anwesenheit eines Poly(C)-Traktes bei FMDV und die Poly(A)-Schwänze am 3'-Ende des Genoms von FMDV und Poliovirus sind markiert. Abkürzungen: 4E, eIF4E; 4A, eIF4A; 4G, eIF4G; 3Dpol, die virale RNA-Polymerase (Belsham & Jackson, 2000).

Im Gegensatz zur zellulären mRNA besitzen Picornaviren keine Cap-Struktur am 5'-Ende, sondern ein kleines viruscodiertes VPg-Protein (viral protein, genome-linked; 3B), welches kovalent über eine Phosphodiesterbindung an die RNA gebunden ist. Vermutlich wird dieses Protein nach der Infektion der Zelle vom RNA-Genom abgespalten. Neben seiner essentiellen Rolle bei der Replikation der Virus-RNA (Kuhn & Wimmer, 1987) ist das VPg wahrscheinlich auch an der korrekten Verpackung der RNA in das Kapsid beteiligt (Rueckert, 1996). Allerdings ist es nicht essentiell für die Infektion, da vollständige *in vitro* synthetisierte RNAs (ohne VPg) infektiös sind. Die meisten Picornaviren besitzen nur eine Kopie des VPg-Gens, während bei FMDV drei Gene direkt hintereinander im Genom liegen (Forss *et al.*, 1984).

Das RNA-Genom der Picornaviren codiert ein langes Polyprotein, welches noch während der Translation in kleinere Proteine gespalten wird. Die protein-codierende Region wird am 5'-Ende und am 3'-Ende von ungewöhnlich langen, nichttranslatierten Regionen, den sog. NTR's (non translated region) flankiert. Die 5'-nichttranslatierte Region des Genoms zeigt innerhalb der Picornaviren eine besonders große Variabilität ihrer Länge; sie reicht von 624 Nukleotiden beim humanen Rhinovirus bis zu ca. 1200 Nukleotiden bei FMDV.

Charakteristisch für die 5'-NTRs ist eine Region mit ausgeprägter Sekundär- und Tertiärstruktur, die eine Länge von etwa 450 Nukleotiden erreicht und eine zentrale Rolle bei der Initiation der Translation der Virus-RNA spielt. Diese Region wird als „Internal Ribosome Entry Site“ (IRES) bezeichnet, da sie die interne Bindung von Ribosomen und Translationsfaktoren an die RNA

ermöglicht. Hinter der 3'-NTR schließt sich, wie bei zellulären mRNAs, ein Poly(A)-Schwanz unterschiedlicher Länge an, der jedoch im Gegensatz zu dem der zellulären mRNA genomisch codiert und für die Initiation der Minusstrang-Synthese von Bedeutung ist (Andino *et al.*, 1993).

1.3 Infektionszyklus

Picornaviren lagern sich an spezifische Rezeptoren (Integrine) in der Plasmamembran der Wirtszelle an, was möglicherweise zur Endozytose in die Wirtszelle führt. Hierbei werden die Virus-Partikel in die wirtseigene Zellmembran eingehüllt. Dann wird die RNA aus dem Kapsid freigesetzt, ein Prozess, der als „uncoating“ bezeichnet wird, dem sich die Abspaltung des VPg vom 5'-Ende der RNA anschließt. Die Translation des Virus-Genoms wird durch den Translationsapparat der Wirtszelle durchgeführt. Nachdem das freigesetzte Virus-RNA-Molekül translatiert und die Proteine, die für die RNA-Synthese verantwortlich sind, ko- und posttranslational modifiziert wurden, beginnt die Synthese der Minusstrang-RNA, die dann wiederum als Matrize zur Synthese von Plusstrang-RNA dient (Abb. 2).

Die viral codierte 3D-Polymerase synthetisiert sowohl Minus- als auch Plusstrang-RNA, indem sie das virale VPg-Protein als Primer nutzt. Ein Teil der neu translatierten Plusstrang-RNAs dient vermutlich ebenfalls als Matrize für die Synthese weiterer viraler Proteine und für die RNA-Replikation, bevor die RNAs in die Kapside verpackt werden. Die Replikation der RNA und das „assembly“ (die Zusammenlagerung) der Kapside erfolgt assoziiert an Membranen des glatten Endoplasmatischen Retikulums. Die volle Leistung der Proteinsynthese ist bei FMDV und Poliovirus bereits nach 2,5 – 4 Stunden erreicht. Bereits nach 6 Stunden können mehr als 100.000 Viren durch Lyse der infizierten Zelle freigesetzt werden.

Das picornavirale Polyprotein besitzt eine kalkulierte Größe von 253,4 kDa, und seine Prozessierung ist von zentraler Bedeutung für einen korrekten Ablauf des Infektionszyklus. Hierbei wird es kotranslational und posttranslational in kleinere Proteine gespalten. Das Polyprotein der Picornaviren wird in drei Precursor (Vorläufer) P1, P2 und P3 eingeteilt. Diese erscheinen zunächst als Einheiten, bevor sie proteolytisch in einzelne Proteine gespalten werden. Der Precursor P1 beinhaltet die vier Kapsidproteine 1A (VP4), 1B (VP2), 1C (VP3) und 1D (VP1). Den Proteinen des Precursors P2 werden verschiedene Funktionen zugeschrieben; so haben 2B und 2C offenbar eine Funktion bei der Replikation des Virus (Bernstein *et al.*, 1986; Li & Baltimore, 1988).

Das Protein 2A ist bei FMDV im Gegensatz zum Poliovirus homologen Protein nur 16 Aminosäuren lang und proteolytisch inaktiv. Bei Polioviren hat 2A eine Funktion als Protease, die die Abspaltung des Precursors P1 katalysiert sowie die Spaltung von eIF4G übernimmt (Bernstein *et al.*, 1985; Kräusslich *et al.*, 1987).

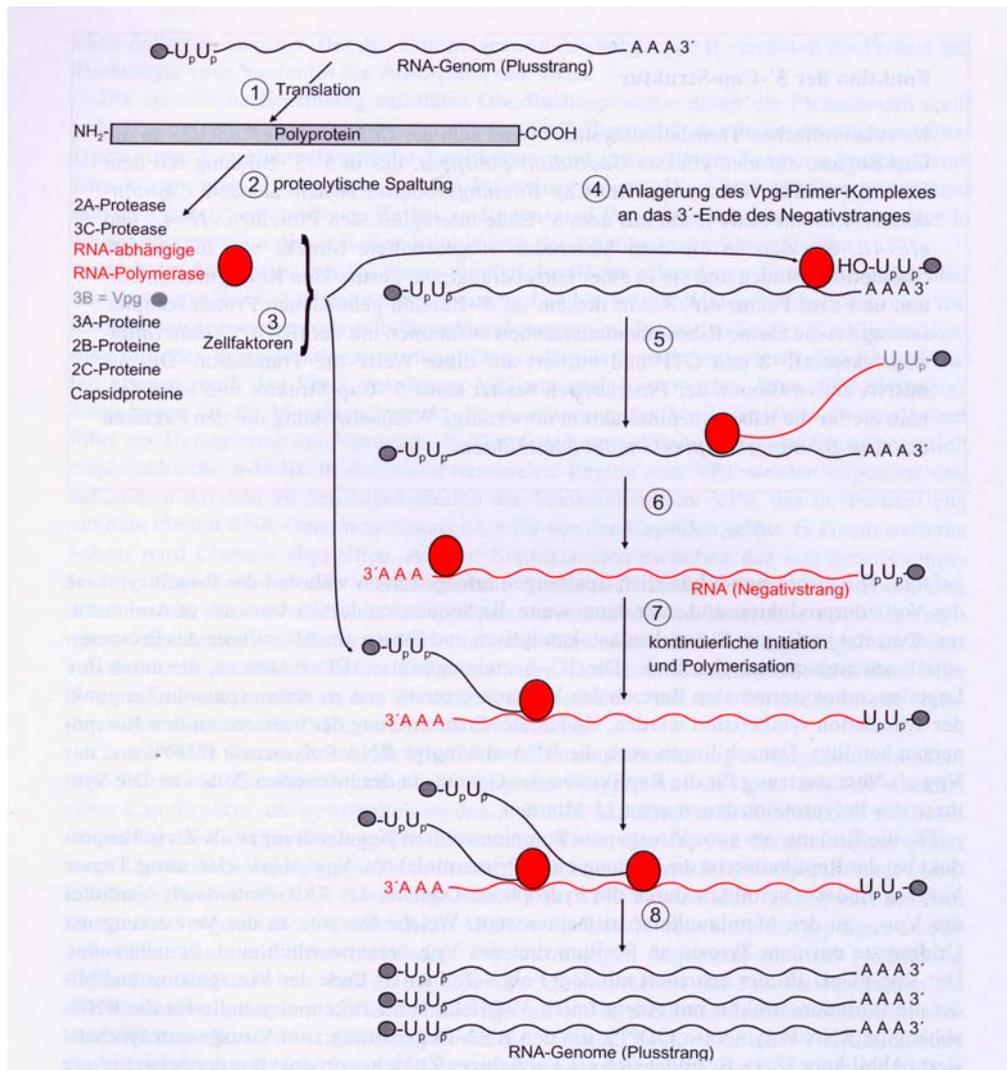


Abbildung 2: Der Replikationszyklus von Picornaviren. Nach Eindringen des Virus und Freisetzung des viralen Plusstrang-Genoms wird dieses translatiert (1) und das synthetisierte Polyprotein wird durch die Aktivität der Proteasen 2A und 3C/3CD in funktionelle Proteine gespalten (2). Hierbei wird das VPg auch uridinyliert, welches sich dann an das 3'-Ende der Plusstrang-RNA anlagert (4) und als Primer für RNA-abhängige RNA-Polymerase fungiert (5). Der VPg-pUpU-Komplex lagert sich auch an das 5'-Ende des Minusstrangs an und dient hier ebenfalls als Primer für die Plusstrang-Synthese (6 – 8). Diese Plusstrang-RNAs werden beim Zusammenbau des Kapsids in dieses verpackt (übernommen aus: Molekulare Virologie, S. Modrow & D. Falke; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg/ Berlin).

Der Precursor P3 wird in die Proteine 3A, 3B, 3C und 3D gegliedert. Das Gen 3B codiert das zuvor erwähnte VPg. Die Virus-spezifische Protease 3C ist mit seinem Precursor 3CD an der Prozessierung von P1, P2 und P3 beteiligt (Hanecak *et al.*, 1982) und kann als 3C-Form auch das PABP (Poly(A) Bindungsprotein) spalten (bei Coxackieviren). Das Gen 3D codiert die virale RNA-Polymerase, die für die Plus- und Minusstrang-Synthese der viralen RNA verantwortlich ist (Flanegan *et al.*, 1977).

Cardio- und Aphthoviren codieren zusätzlich ein sogenanntes Leader-Protein (L), welches sich kotranslational und autokatalytisch vom Polyprotein abspaltet (Beck *et al.*, 1983). Bei der Translation des FMDV-Genoms werden zwei unterschiedlich lange L-Proteine (Cysteinprotease) synthetisiert, die sich in ihrer zentralen Funktion, der Spaltung des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF4G, nicht unterscheiden. Aus der proteolytischen Spaltung von eIF4G resultiert die Abschaltung der zellulären Translation (Belsham, 1992; Kirchweger *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1995). Bei einer Poliovirus-Infektion wird die Spaltung von eIF4G von der Protease 2A^{pro} übernommen (Ehrenfeld, 1996; Etchison *et al.*, 1982), während bei EMCV keine Spaltung von eIF4G erfolgt (Borman *et al.*, 1997a; Borman *et al.*, 1997b).

1.4 Die Translation

1.4.1 Die Translation bei Eukaryoten

In Eukaryoten ist die Translation zeitlich und räumlich von der Transkription getrennt. Nach der Synthese der mRNA im Zellkern folgen die posttranskriptionalen Modifikationen: 1) Anlagerung eines Cap-Nukleotids, 2) Entfernung der Introns durch Spleißen und 3) Synthese eines Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA.

Das „Cap“ (engl. für „Kappe“) ist ein 7-Methylguanosin, das über eine 5'-5'-Triphosphat-Brücke mit dem ersten Nukleotid der mRNA verknüpft ist (Furnichi; Shatkin PINAS 75). Dieses und das folgende Nukleotid sind oft zusätzlich durch Methylreste an den 2'-OH-Gruppen der Ribose modifiziert. Das Cap-Nukleotid erleichtert den Transport der fertigen mRNA in das Cytoplasma und ist zudem für die Stabilität der mRNA mit verantwortlich. Die wichtigste Funktion des Cap-Nukleotids besteht allerdings in der Einleitung der eukaryotischen Translation (Palmer *et al.*, 1993; Gunnery & Mathews, 1995). Zwischen dem Cap-Nukleotid und dem Startcodon (AUG) der zellulären mRNA befindet sich eine Region von üblicherweise 50 bis 100 Nukleotiden, die als 5'-nichttranslatierter Bereich (kurz 5'-NTR für 5'-non translated region) bezeichnet wird (Kozak, 1989). Dem offenen Leseraster folgt eine 3'-nichttranslatierte Sequenz, die meist aus einigen zehn bis hundert Nukleotiden besteht und am Ende einen typischen homopolymeren Poly(A)-Trakt besitzt, der eine Länge von bis zu 250 Adenin-Nukleotiden erreichen kann. Der Poly(A)-Schwanz spielt eine entscheidende Rolle für die Stabilität der mRNA (Wahle, 1995) und ist am Export der mRNA aus dem Nukleus beteiligt. An den Poly(A)-Schwanz lagern sich die sogenannten PAB-Proteine (Poly(A) binding protein) an, die wiederum mit Initiationsfaktoren am 5'-Ende der RNA interagieren können. Hierbei kommt es vermutlich zu einem „Ringschluss“, so dass translatierende Ribosomen direkt wieder auf das 5'-Ende der mRNA aufspringen und so einen neuen Syntheszyklus beginnen können (Lloyd *et al.*, 1988; Gallie, 1991; Iizuka *et al.*, 1994). Hinweise für die Richtigkeit dieses Modells zeigten Atom-Mikroskopie-Analysen in Hefe, in denen ringförmige RNA-Strukturen identifiziert wurden, die vermutlich durch eine Verbindung der 5'- und 3'-Enden der mRNA zustande kommen (Wells *et al.*, 1998).

An der eukaryotischen Translationsinitiation sind neben den ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten mehr als ein Dutzend Faktoren beteiligt. Eine Zusammenstellung der eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIF) zeigt die Tabelle 2, und ein Modell der eukaryotischen Translationsinitiation ist in Abbildung 3 gezeigt. Die Translationsinitiation beginnt mit der Anlagerung des komplexen Faktors eIF4F an das am 5'-Ende gelegene Cap. eIF4F setzt sich aus den Initiationsfaktoren eIF4G, eIF4A und eIF4E zusammen. eIF4G ist das größte Protein (170 kDa) des Komplexes und besitzt die Funktion eines multifunktionellen Adapters (Henze, 1997). Am N-Terminus von eIF4G befindet sich eine Bindungsstelle für eIF4E, während der C-terminale Bereich zwei eIF4A-Bindungsstellen aufweist (De Gregorio *et al.*, 1999; Lamphear *et al.*, 1995; Mader *et al.*, 1995). Die Bindung des eIF4F-Komplexes an die Cap-Struktur wird durch das 24 kDa-Protein eIF4E vermittelt (Sonenberg *et al.*, 1978). Das dritte Protein des eIF4F-Komplexes, eIF4A (46 kDa), ist eine bidirektional arbeitende RNA-Helikase, die unter ATP-Verbrauch und mit Hilfe des Initiationsfaktors eIF4B als Kofaktor doppelsträngige Bereiche der RNA entwindet (Rozen *et al.*, 1990; Pause *et al.*, 1994). So wird durch Glätten der Sekundärstrukturen der mRNA diese für das Entlanggleiten („Scannen“) des Ribosoms zum Initiator-AUG vorbereitet (Lawson *et al.*, 1989; Van Heugten *et al.*, 1992).

Untersuchungen weisen daraufhin, dass der eIF4F-Komplex eine deutlich höhere Helikase-Aktivität als eIF4A allein aufweist und durch eIF4B und eIF4H stimuliert wird (Rozen *et al.*, 1990; Rogers *et al.*, 1999). Daher wird angenommen, dass eIF4A im Komplex mit eIF4G und eIF4E die physiologisch relevante Form von eIF4A zur Auflösung von Sekundärstrukturen in der mRNA darstellt.

Unabhängig von der Bildung des Initiationskomplexes an der Cap-Struktur der mRNA dissoziieren die 80S-Ribosomen in ihre 40S- und 60S-Untereinheiten durch die Bindung von eIF3 und eIF1A an die ribosomale 40S-Untereinheit (Benne & Hershey, 1976; Goumans *et al.*, 1980). Des weiteren entsteht der „ternäre Komplex“ aus der Methionyl-tRNA (Met-tRNA_i) und dem mit GTP-beladenen Initiationsfaktor eIF2. Dieser Komplex lagert sich an die 40S-Untereinheit an (Goumans *et al.*, 1980; Peterson *et al.*, 1979) und bildet so den 43S-Präinitiationskomplex (Benne & Hershey, 1978). Der Kontakt zwischen mRNA und dem 43S-Komplex wird durch eIF4G vermittelt. Dabei bindet das an die N-terminale Domäne von eIF4G gebundene eIF4E an die mRNA, während zusätzlich der carboxyterminale Bereich von eIF4G mit dem an die ribosomale 40S-Untereinheit gebundenen Faktor eIF3 interagiert (Lamphear *et al.*, 1995). Nach der Anlagerung des 43S-Präinitiationskomplexes an die mRNA wird dieser 48S-Initiationskomplex genannt.

Der Prozess, bei dem der 48S-Initiationskomplex die mRNA abtastet, um das Initiator-AUG zu erreichen, wird in einem allgemein akzeptierten Modell als „Scanning“ bezeichnet und verbraucht vermutlich Energie in Form von ATP (Lawson *et al.*, 1989; Van Heugten *et al.*, 1992). Die Faktoren eIF1 und eIF1A spielen für das „Scanning“ des 48S-Komplexes eine wichtige Rolle.

Eukaryotischer Initiationsfaktor	Kalkuliertes Molekulargewicht (kDa)	Funktion
eIF1	12.6	AUG Erkennung
eIF1A	16.5	Met-tRNA _i -Bindung an die 40S-Untereinheit
eIF2 α	36.2	beeinflusst die eIF2B-Bindung durch Phosphorylierung
eIF2 β	39.0	bindet an eIF2B, eIF5
eIF2 γ	51.8	bindet GTP, Met-tRNA _i , hat GTPase-Aktivität
eIF2B α	33.7	nicht essenziell, unterstützt die Erkennung von P-eIF2
eIF2B β	39.0	bindet GTP, unterstützt die Erkennung von P-eIF2
eIF2B γ	50.4	GEF- (guanine nucleotide exchange factor) Aktivität
eIF2B δ	57.8	bindet ATP, unterstützt die Erkennung von P-eIF2
eIF2B ϵ	80.2	GEF-Aktivität
eIF3 (p170, p116, p110, p66, p48, p47, p44, p40, p36, p35, p28)	167, 99, 105, 64, 52, 38, 35, 40, 36, 29, 25	Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten, bindet RNA (p170, p66, p44), eIF1 (p116), eIF5 (p116) und eIF4B (p44)
eIF4AI	44.4	ATPase, RNA-Helikase
eIF4AII	46.3	ATPase, RNA-Helikase
eIF4B	69.2	bindet RNA, stimuliert eIF4A
eIF4E	25.1	bindet m ⁷ G-cap der mRNA
eIF4GI	171.6	bindet eIF4E, eIF4A, eIF3, PABP · RNA
eIF4GII	176.5	bindet eIF4E, eIF4A, eIF3, PABP · RNA
eIF5	48.9	stimuliert eIF2- GTPase
eIF5B	139.0	GTPase, unterstützt die Bildung des 80S-Komplexes

Tabelle2.: Übersicht über die eukaryotischen Initiationsfaktoren. Die Molekulargewichte beziehen sich auf die Faktoren von Säugern. Die Molekulargewichte der Untereinheiten von eIF3 stimmen nicht immer mit der Namensgebung überein (Hershey & Merrick, 2000).

Beide Faktoren fördern synergistisch die Bindung der 48S-Komplexe am Initiator-AUG, während sie gleichzeitig die Dissoziation anormaler Ribosom-mRNA-Komplexe katalysieren (Pestova *et al.*, 1998). Das Ribosom erkennt vermutlich durch die Interaktion des AUGs und des CAU-Anticodons der gebundenen Met-tRNA_i das Initiator-AUG und bleibt dort stehen (Cigan *et al.*, 1988a; Cigan *et al.*, 1988b). Ein Startcodon wird häufiger genutzt, wenn es innerhalb einer bestimmten Konsensus-Sequenz liegt. Purine an den Positionen -3 und +4 (wobei das A des AUG als +1 bezeichnet wird) steigern die Effizienz des Initiations-Codons. AUGs, die sich nicht in einer solchen Konsensus-Sequenz befinden, werden oftmals nicht von den „scannenden“ Ribosomen erkannt, was dazu führt, dass die Initiation dann an einem stromabwärts gelegenen AUG erfolgt.

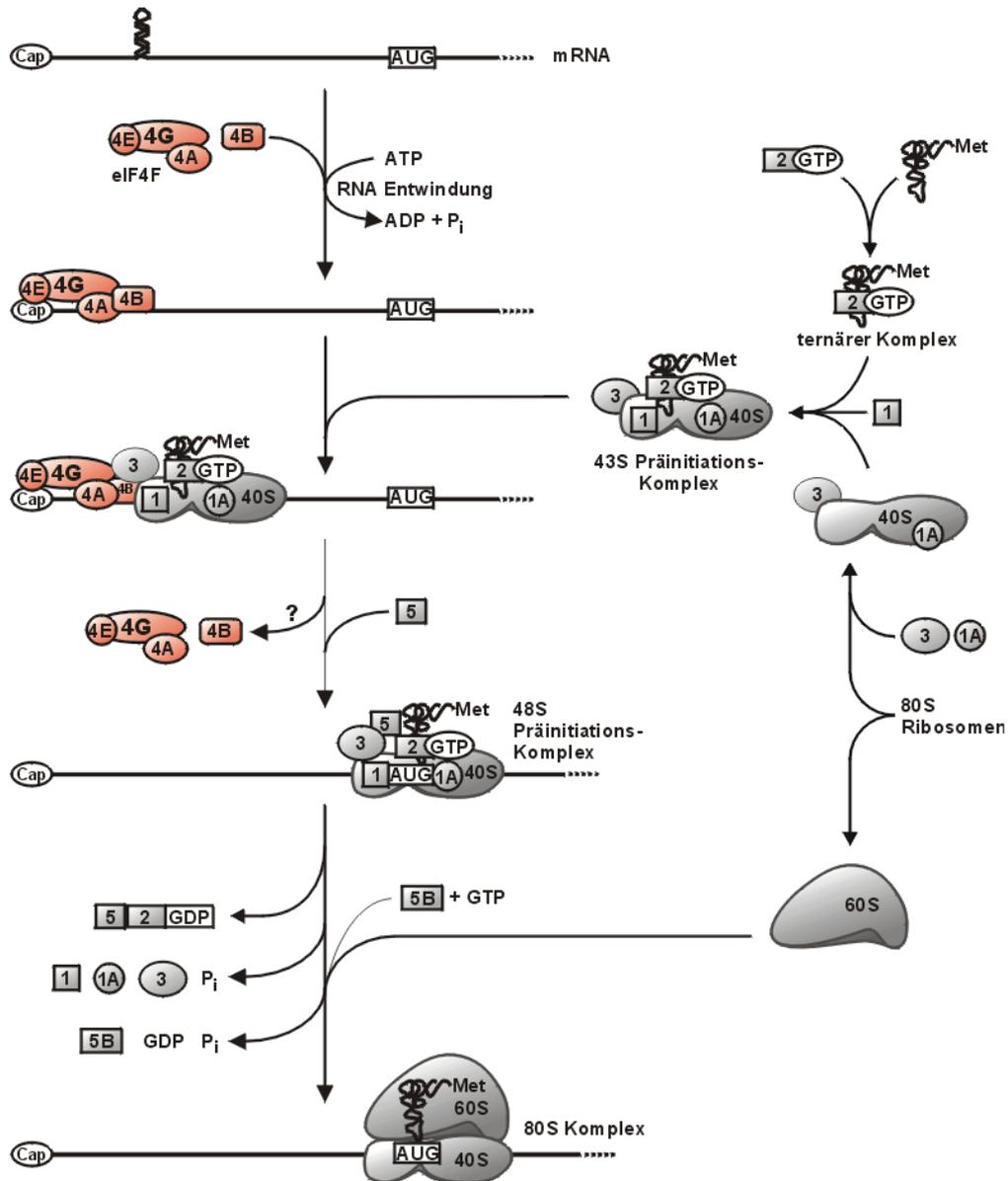


Abbildung 3: Modell der eukaryotischen Translations-Initiation.

Zusammengestellt aus Merrick (1992) und Pain (1996).

Bevor sich die große 60S-Untereinheit des Ribosoms an den 43S-Initiationskomplex anlagert, dissoziieren einige Initiationsfaktoren vom 43S-Komplex ab. Der Initiationsfaktor eIF5 katalysiert dabei die Dissoziation von eIF2 und die Hydrolyse des an eIF2 gebundenen GTP. Die Regeneration des eIF2/GDP-Komplexes übernimmt eIF2, der auch unter dem Namen GEF (guanine nucleotide exchange factor) bekannt ist.

Für die Zusammenführung der beiden ribosomalen Untereinheiten ist die Beteiligung von eIF5B und die Hydrolyse von GTP erforderlich (Pestova *et al.*, 2000). An die Translationsinitiationsphase schließt sich die Elongation der Aminosäurekette an, diese umfasst daher auch die Translokation des Ribosoms um jeweils eine Tripletteinheit auf der mRNA. Mit Hilfe des Elongationsfaktors eEF1 α wird unter Hydrolyse von GTP die Aminoacyl-tRNA in der A-Stelle des Ribosoms

positioniert, worauf durch eine Peptidyl-Transferase-Reaktion die bereits synthetisierte Peptidkette in der P-Stelle auf die Aminosäure in der A-Stelle übertragen wird. Der freigesetzte Komplex aus eEF1 α •GDP wird durch den „guanin nucleotide exchange faktor“ (GEF) mit seinen Untereinheiten eEF1 β und eEF1 γ zu eEF1 α •GTP regeneriert und steht somit dem Elongationsprozess weiterhin zur Verfügung.

Die Translokation des Ribosoms auf der RNA wird durch den Faktor eEF2 unter GTP-Verbrauch katalysiert. Die Termination wird eingeleitet, sobald das Ribosom ein Stoppcodon (UAG, UAA, UGA) der mRNA erreicht. Durch den eukaryotischen Terminations- oder Release-Faktor (eRF) wird die synthetisierte Polypeptidkette von der Peptidyl-tRNA freigesetzt und gleichzeitig die Dissoziation des Translationskomplexes induziert.

1.4.2 Der eukaryotische Initiationsfaktor eIF4G

eIF4G erregte das erste Mal Aufmerksamkeit, als man erkannte, dass seine proteolytische Spaltung mit der Inhibition der cap-abhängigen Translation in poliovirus-infizierten HeLa-Zellen zusammen fiel (Etchison *et al.*, 1982). In Säuger-, Hefe- und Pflanzenzellen wurden bisher zwei verschiedene Isoformen identifiziert (Abb. 4A und B) und ihre Gene kloniert (Yan *et al.*, 1992; Gradi *et al.*, 1998) (Tab. 3).

Säuger ¹		Pflanzen ¹		Hefe ¹			%ID ²	Funktion
Name	MW	Name	MW	Name	Gene	MW		
eIF4GI	171.6	eIF4G	153.2	eIF4GI	TIF4631	107.1	22	bindet eIF4E, 4A, 3, PABP • RNA
eIF4GII	176.5	eIFiso4G	87.0	eIF4GII	TIF4632	103.9	21	bindet eIF4E, 4A, 3, PABP • RNA

Tabelle 3: Isoformen des Initiationsfaktors eIF4G aus Säugern, Pflanzen und Hefe

¹ Die molekulare Masse (kDa) bezieht sich auf die Faktoren des Menschen, *Arabidopsis thaliana* and *S. cerevisiae*.

² % ID: Sequenzhomologie zwischen Menschen und Hefe. Diese Prozentangaben treffen auch in etwa für die Homologie der pflanzlichen Proteine zu.

Das menschliche eIF4GI (der Prototyp der 4G-Gruppe) ist 1560 Aminosäuren lang und läuft auf einem SDS-Polyacrylamidgel bei einem apparenten Molekulargewicht von etwa 200 kDa. Es kann in drei funktionelle Domänen unterteilt werden. Das aminoternale Drittel (AS 1 bis 634) beinhaltet die Bindungsstellen für das Poly(A)-Bindungsprotein (PABP) und den cap-bindenden Initiationsfaktor eIF4E. Das zentrale Drittel (AS 635 bis 1039) beinhaltet ein RRM (RNA recognition motif), welches eine direkte Bindung an die RNA ermöglicht (Goyer *et al.*, 1993). In diesem Drittel befinden sich ebenfalls die Motive für die Bindung der Faktoren eIF3 und eIF4A

(Lamphear *et al.*, 1995). Das carboxyterminale Drittel weist eine zweite Bindungsstelle für eIF4A auf und eine Bindungsstelle für die eIF4E-phosphorylierende Kinase Mnk1 (Imataka & Sonenberg, 1997; Pyronnet *et al.*, 1999).

In Röntgenstruktur-Analysen der evolutionär konservierten zentralen Domäne von eIF4GII konnten fünf sogenannte HEAT-Domänen (Huntingtin, Elongation 3, A subunit of protein phosphatase 2A, Target of rapamycin) lokalisiert werden. Solche HEAT-Domänen zeigen die Struktur von antiparallelen Alpha-Helices; man findet sie in Proteinen, die an der Bildung von Multiproteinkomplexen beteiligt sind (Andrade & Bork, 1995).

Durch die Möglichkeit, gleichzeitig mit verschiedenen anderen Proteinen (unter anderem Initiationsfaktoren) zu interagieren, wird eIF4G eine Schlüsselrolle als multifunktionales Adapterprotein in der zellulären Translationsinitiation zugeschrieben (Hentze, 1997).

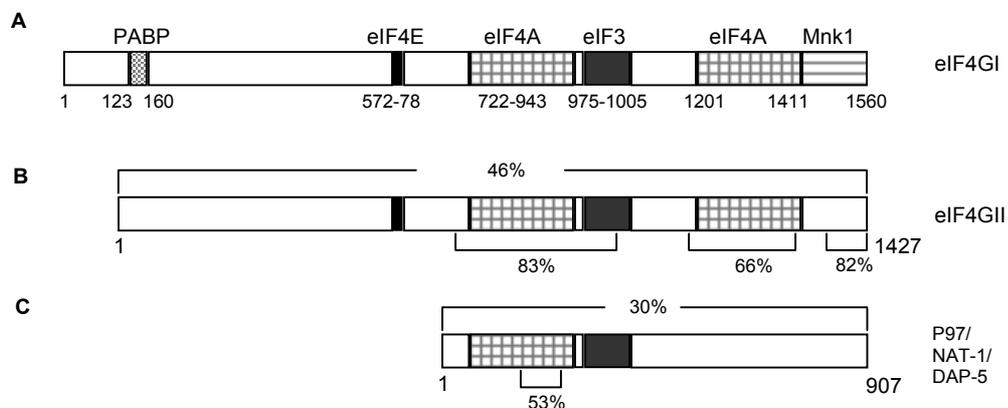


Abbildung 4: Schematische Darstellung von eIF4GI und homologer Proteine

Die verschiedenen Interaktionsdomänen mit Bindungspartnern, so wie deren Aminosäurepositionen sind angegeben. Homologien zwischen eIF4GI, eIF4GII und p97/NAT-1/DAB-5 sind als prozentuale Identität der Aminosäuresequenz angegeben. Nummerierung nach (Piron *et al.*, 1998; (Imataka *et al.*, 1998)

Modifiziert nach (Prévôt *et al.*, 2003)

Die Ergebnisse aus Southern-Blot-Analysen und Chromosomen-Kartierungen weisen darauf hin, dass das eIF4G-Gen nur als einzelne Kopie vorliegt (Yan & Rhoads, 1995). Die mRNA des Faktors eIF4GI weist einen starken internen Promotor auf, der mit einem Polypyrimidin-Trakt assoziiert ist (Han & Zhang, 2002). *In vitro* Translationen und MS-Analysen (Massenspektroskopie) zeigen, dass Isoformen des eIF4GI, die unterschiedlich lange N-terminale Enden aufweisen, aus der alternativen Nutzung verschiedener Startkodons resultieren (Bradley *et al.*, 2002.; Byrd *et al.*, 2002).

Des Weiteren wurden Polypeptide charakterisiert, die eine Homologie zum C-terminalen Ende von eIF4G aufweisen, so zum Beispiel das Protein p97 (auch NAT1 oder DAP-5 genannt; Abb. 4C) mit einer Homologie von 30%.

Dieses Protein wird ubiquitär und abundant in normalen Zell- und Gewebekulturen synthetisiert (Imataka *et al.*, 1997; Levy-Strumpf *et al.*, 1997; Yamanaka *et al.*, 1997) und beinhaltet die Bindungsstellen für die Faktoren eIF4A und eIF3. Eine Überexpression von p97 in Zellkultur

inhibiert sowohl die cap-abhängige als auch die IRES-vermittelte Translation, was zu der Vermutung führt, dass es als negativer Regulator für die Translation fungiert (Imataka *et al.*, 1997; Yamanaka *et al.*, 1997).

Auch zwei weitere Proteine offenbaren eine moderate Homologie zur zentralen Domäne von eIF4GI und können den Faktor eIF4A binden: Paip-1 (poly(A) binding protein interacting protein-1) und DUG (death upregulation gene) (Craig *et al.*, 1998; Goke *et al.*, 2002).

1.4.3 Die proteolytische Spaltung von eIF4G

Picornaviren wie das Poliovirus oder FMDV kodieren für eine Protease (2A beziehungsweise L), die spezifisch das N-terminale Ende mit der eIF4E-Bindungsdomäne von eIF4G abspaltet. Das verbleibende C-terminale Fragment wird bei der IRES-vermittelten Translation zur Initiation rekrutiert. Die Schnittstellen der 2A- und L-Protease liegen innerhalb derselben Region nur sieben Aminosäuren auseinander (Kierchweger *et al.*, 1994; Lamphear *et al.*, 1993), so dass hier vermutlich eine exponierte protease-sensitive Sequenz vorliegt.

Die proteolytische Spaltung ist effizienter, wenn eIF4G im Komplex mit eIF4E vorkommt (Bovee *et al.*, 1998(b); Haghigat *et al.*, 1996), wodurch vermutlich eine Umlagerung im eIF4G-Polypeptid zustande kommt, welche die protease-sensitive Sequenz besser zur Exposition bringt (Ohlmann *et al.*, 1997). Auch die 3C-Protease von FMDV kann eIF4G spalten, jedoch an anderen Stellen als die L-Protease (Belsham *et al.*, 2000). Wie schon oben erwähnt, führt die Abspaltung des N-terminalen dann Endes zur Inhibition der cap-abhängigen Translation. (Ohlmann *et al.*, 1997)

Picornaviren sind nicht die einzigen Viren, die diese Strategie verfolgen. So kodiert das Genom des HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1; Lentivirus) ebenfalls für eine Protease, die eIF4GI an mehreren Stellen (AS 678/681 und AS 1085) spaltet (Ventos *et al.*, 2001). Interessanterweise wird eIF4GII von dieser Protease nicht gespalten, obwohl Homologien um die AS 1085 vorhanden sind (Ohlmann *et al.*, 2002; Schlick & Skern, 2002). Auch während der frühen Phase der Apoptose (Zelltod) werden sowohl eIF4GI als auch eIF4GII durch die Caspase 3 degradiert (Clemens *et al.*, 1998; Marrissen & Lloyd, 1998; Bushell *et al.*, 1999) (Abb. 5).

Die Degradation von eIF4G ist nicht die einzige Möglichkeit, um die zelluläre Translation zu inhibieren. So bindet das Protein NSP3 des Rotavirus (Reovirus) an das N-terminale Ende (Abb. 5) und verhindert die Anlagerung des PABPs und somit die zelluläre Translation. Gleichzeitig ist es an den Poly(A)-Schwanz der viralen RNA gebunden, wodurch eine pseudo-zirkuläre Struktur der viralen RNA entsteht (Piron *et al.*, 1998). In ähnlicher Weise verfährt das Influenzavirus. Hierbei bindet das NS1-Protein (Abb. 5) dieses Virus sowohl an das 5'-Ende der viralen RNA als auch an den N-terminalen Teil von eIF4G, was zu einer bevorzugten Translation des viralen Transkriptes führt (Aragon *et al.*, 2000).

Die Dephosphorylierung von eIF4E verhindert ebenfalls die cap-abhängige Translation, da eIF4E nur im phosphorylierten Zustand an das Cap binden kann (Huang & Schneider, 1991; Zhang *et al.*, 1994). Diesen Umstand nutzen Adenoviren, indem das Protein 100k (100 kDa), das in der späten Phase der viralen Expression synthetisiert wird, an die Mnk1-Bindungsdomäne bindet und so die

Anlagerung von Mnk1 und damit die Phosphorylierung von eIF4E verhindert (Abb. 5). Eine Analogie zeigt das EMC-Virus in dem es die Dissoziation des 4E-BP (4E-Bindungsprotein/Inhibitor) verhindert. Dieser dissoziiert erst im phosphorylierten Zustand von eIF4E ab (Gingras *et al.*, 1996).

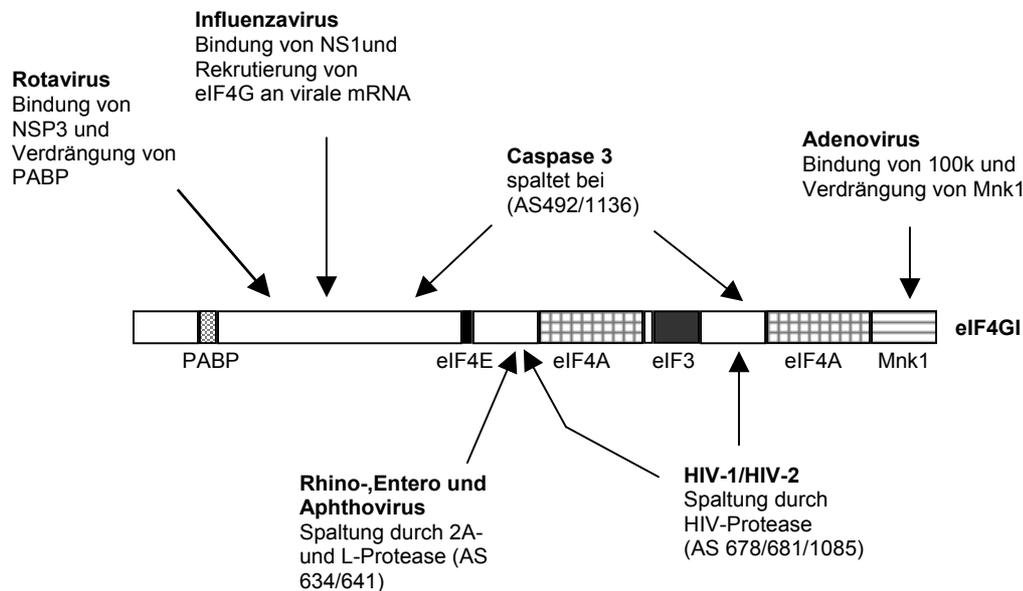


Abbildung 5: Interaktion von eIF4GI mit viralen Proteinen und mit Caspase 3

Schematische Darstellung von eIF4GI mit seinen translationsrelevanten Protein-Interaktionsdomänen. Die Interaktionen mit viralen Proteinen sind im oberen Teil der Zeichnung dargestellt (Ausnahme: Caspase 3). Proteolytische Spaltung durch virale Proteasen sind im unteren Teil der Zeichnung dargestellt. Modifiziert nach (Prévôt *et al.*, 2003).

1.4.4 Der eukaryotische Initiationsfaktor eIF4B

Der eukaryotische Initiationsfaktor eIF4B spielt sowohl bei der Translationsinitiation bei normalen zellulären mRNAs der Eukaryoten als auch bei der Initiation der Translation der Picornaviren eine wichtige Rolle. Die cDNA von humanem eIF4B umfasst ein offenes Leseraster von 3850 bp und codiert für ein Protein von 69,2 kDa, welches im SDS-Polyacrylamidgel jedoch aberrant bei 80 kDa läuft (Milburn *et al.*, 1990). Das humane eIF4B ist ein RNA-Bindungsprotein, welches vermutlich als Homodimer an RNA bindet. Die zentrale, 99 Aminosäuren lange Region, die besonders reich an Asparaginsäure, Arginin, Tyrosin und Glycin ist, wird nach dem Ein-Buchstabencode dieser Aminosäuren als „DRYG-Domäne“ bezeichnet (Méthot *et al.*, 1996a). Diese Domäne besitzt eine entscheidende Funktion bei der Dimerisierung von eIF4B, wobei bisher unbekannt ist, ob eIF4B ausschließlich Dimere bildet oder auch Trimere bzw. Tetramere bilden kann (Méthot *et al.*, 1996a). Zusätzlich konnten eine RRM- (RNA recognition motif) Domäne und eine C-terminale Domäne, die als „carboxyterminal binding site“ oder „basic domain“ (BD) bezeichnet wird, identifiziert werden. Beide RNA-Bindungs-Domänen binden sequenzspezifisch (Méthot *et al.*, 1994; Naranda *et al.*, 1994).

Die BD-Domäne bindet im Vergleich zur RRM-Domäne stärker an die RNA und ist essentiell für die Stimulierung der RNA-Helikase-Aktivität von eIF4A (Méthot *et al.*, 1994). Die RRM-Domäne bindet dagegen sehr spezifisch 18S-rRNA (Méthot *et al.*, 1994; Méthot *et al.*, 1996b). Dieser Umstand führte zu der Annahme, dass eIF4B eine Art Brücke zwischen mRNA und rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit herstellt (Méthot *et al.*, 1996b). Neben der Protein- und RNA-Bindungsaktivität stimuliert eIF4B, wie bereits erwähnt, die ATPase- und Helikase-Aktivität von eIF4A (Grifo *et al.*, 1982; Ray *et al.*, 1985; Abramson *et al.*, 1987; Rozen *et al.*, 1990).

1.4.5 Die interne Initiation der Translation

Die Initiation der Translation ist einer der wichtigsten Schritte im Vermehrungszyklus der Picornaviren, der einer Regulation unterliegt. Im Gegensatz zur Initiation der Translation bei normalen mRNAs der Zellen findet die interne Initiation der Translation nicht am 5'-Ende, sondern innerhalb der mRNA statt. Voraussetzung für diese interne Initiation ist eine hoch strukturierte RNA-Region, die nach ihrer Funktion als „Internal Ribosome Entry Site“ (IRES) bezeichnet wird und sich im 5'-nichttranslatierten Bereich der viralen RNA befindet.

Die picornaviralen IRES-Elemente werden aufgrund der Konservierung ihrer Primärsequenz und Sekundärstruktur in drei Gruppen untergliedert (Jackson & Kaminski, 1995): die der Entero- und Rhinoviren (Typ I), die der Cardio- und Aphthoviren (einschließlich der Parechoviren) (Typ II) und die des Hepatitis A-Virus (Typ III). Die vierte Gruppe von IRES-Elementen (Typ IV) wird von HCV und den Pestiviren gestellt, die jedoch zur Familie der *Flaviviridae* zählen (Abb. 5). Daneben besitzen auch einige zelluläre mRNAs IRES-Elemente, wie zum Beispiel die mRNAs für c-myc, FGF-2 (fibroblast growth factor 2) (Molekulare Genetik, Knippers), die Antennapedia mRNA bei *Drosophila* (Oh *et al.*, 1992), die mRNA für das Immunglobulin Heavy Chain Binding Protein (BIP) bei Säugern (Macejak & Sarnow, 1991), die mRNA des Human Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) (Vagner *et al.*, 1995), sowie weitere Gene in *Xenopus*-Oocyten (Keiper & Rhoads, 1997). Bei einigen dieser mRNAs wurden Sekundärstrukturen gefunden, die große Ähnlichkeit zur picornaviralen IRES aufweisen.

Die IRES-Elemente der Picornaviren ähneln sich in Bezug auf die Sekundärstruktur. Charakteristisch für alle IRES-Elemente ist ein großer zentraler Stem-Loop, der aus einem langen Stamm (engl. „stem“) aus überwiegend doppelsträngiger RNA besteht, der im oberen Bereich kleinere Verzweigungen aufweist. Vor dieser zentralen Domäne befinden sich kleinere Stem-Loops, die in Größe und Anzahl stark variieren. Ein Stem-Loop mittlerer Größe, der bei den Entero- und Rhinoviren eine ausgeprägte Blase aus einzelsträngiger RNA besitzt und bei den Cardio- und Aphthoviren eine Y-förmige Struktur aufweist, befindet sich stromabwärts der zentralen Domäne. Im Gegensatz dazu besitzt die IRES der HCV- und Pestivirus-Gruppe nur eine große zentrale Domäne, die viele Verzweigungen aufweist. Obwohl sich die picornaviralen IRES-Elemente in ihren Sekundärstrukturen ähneln, existieren nur minimale Homologien auf der Ebene der Primärsequenz (Jackson & Kaminski, 1995). Konservierte Regionen befinden sich, mit einigen Ausnahmen, in einzelsträngigen Arealen, die vermutlich für die Bindung von Proteinen benötigt werden oder an der Ausbildung der Tertiärstruktur beteiligt sind (Pilipenko *et al.*, 1992). Dagegen

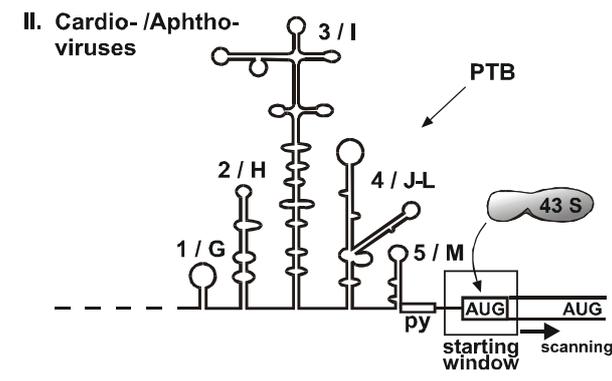
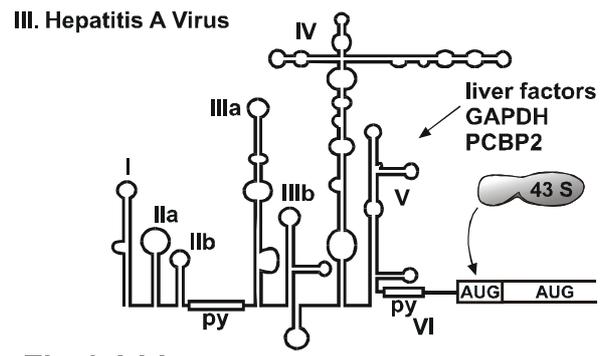
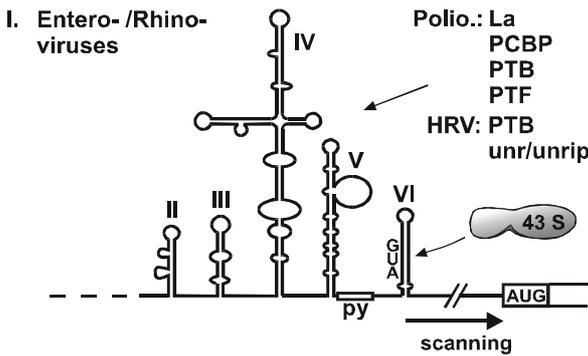
befinden sich die nicht konservierten Bereiche bevorzugt in den basengepaarten Regionen der Stämme.

Eine wichtige Gemeinsamkeit der Picornaviren und gleichzeitig ein Kriterium für ihre Abgrenzung gegenüber der HCV- und Pestivirus-Gruppe ist die charakteristische Anordnung eines Tandems von *cis*-Elementen am 3'-Ende der IRES. Diese Anordnung besteht aus einem Oligopyrimidin-Trakt von ca. 10 Pyrimidin-Nukleotiden und einem AUG, dessen Abstand vom Oligopyrimidin-Trakt von etwa 15 bis 20 Nukleotiden von großer Bedeutung für die Effizienz der Translation ist. Beim Encephalomyocarditis-Virus (EMCV), einem Vertreter der Cardioviren (Typ II IRES-Element), beginnt die Translation vorwiegend an diesem AUG (Initiator-AUG, 11. AUG), welches sich im entsprechendem Abstand zum Oligopyrimidin-Trakt befindet (Kaminski *et al.*, 1994). Diese Region wird auch als „starting window“ (Startfenster) bezeichnet (Pilipenko *et al.*, 1994). Nur in seltenen Fällen beginnt die Translation am nächsten 12. AUG, welches sich 12 Nukleotide stromabwärts des 11. AUGs befindet, und nie erfolgt die Translation an dem etwa 8 Nukleotide stromaufwärts vor dem Initiator-AUG liegenden 10. AUG (Kaminski *et al.*, 1990; Kaminski *et al.*, 1994).

Bei den Cardioviren wird davon ausgegangen, dass das Ribosom direkt im „starting window“ platziert wird und dort die Translationsinitiation beginnt. Im Gegensatz zu EMCV erfolgt die Initiation der Translation bei FMDV jedoch parallel an zwei unterschiedlichen Initiator-AUGs. Das 11. AUG im FMDV-Stamm O₁K (analog zu AUG 11. in der EMCV IRES) befindet sich stromabwärts vom Oligopyrimidin-Trakt im „starting window“. Das 12. AUG liegt im gleichen Leserahmen wie das 11. AUG, jedoch weitere 84 Nukleotide stromabwärts (Sangar *et al.*, 1987; Belsham, 1992). Es wird davon ausgegangen, dass alle Ribosomen am 11. AUG an die RNA binden, aber nur wenige Ribosomen an Ort und Stelle die Translation beginnen (20-33 %), während die meisten Ribosomen zum 12. AUG „scannen“ und dort die Translation beginnen.

Bei den Entero- und Rhinoviren binden die Ribosomen an einem konservierten AUG (Position 586 in der Poliovirus (Mahoney) IRES) am 3'-Ende der IRES. Dieses AUG liegt ebenfalls wie bei den Cardio- und Aphthoviren in definiertem Abstand zum Oligopyrimidin-Trakt, befindet sich bei Poliovirus allerdings in einer Stem-Loop-Struktur. Im Gegensatz zu den Cardio- und Aphthoviren erfolgt bei den Entero- und Rhinoviren fast keine (Ohlmann & Jackson, 1999) oder keine Initiation (Pestova *et al.*, 1994) an diesem konservierten AUG am 3'-Ende der IRES, während bevorzugt das ca. 160 Nukleotide stromabwärts gelegene AUG (Position 743 in Poliovirus Typ 1) für die Initiation der Translation verwendet wird. Es wird angenommen, dass die Ribosomen vom konservierten AUG zum Initiator-AUG „scannen“ und dass dieser Mechanismus dem bei Eukaryoten sehr ähnlich ist.

Picornaviridae



Flaviviridae

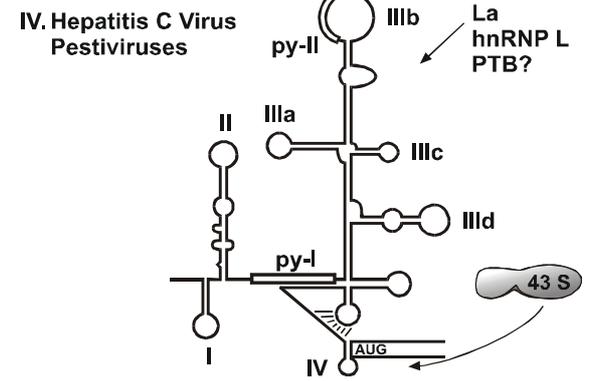


Abbildung 5: Organisation der wichtigsten viralen IRES-Elemente.

Die Stem-Loops sind nummeriert, und Nicht-Standart-Initiationsfaktoren sind aufgelistet (Abb. Aus Niepmann 1999)

1.4.6 An der Initiation der Translation bei Picornaviren beteiligte eukaryotische Protein-faktoren

Für die interne Initiation der Translation der Picornaviren ist nicht nur die Struktur der RNA von Bedeutung, sondern es bedarf auch *trans*-aktiver Protein-Faktoren. Mit Ausnahme des „cap binding protein“ eIF4E werden alle Standard-Initiationsfaktoren verwendet, die auch an der Cap-abhängigen eukaryotischen Translations-Initiation beteiligt sind. Für die eukaryotischen Initiationsfaktoren konnte gezeigt werden, dass eIF2, eIF3 und die Faktoren eIF4G und eIF4A essentiell für die Initiation der EMCV-Translation sind und dass dieser Prozess durch eIF4B stimuliert wird (Pestova *et al.*, 1996). Eine Schlüsselfunktion in der internen Initiation scheint dabei eIF4G zu übernehmen.

Die Spaltung des 170 kDa großen eIF4G-Proteins in zwei funktionell aktive Fragmente erfolgt bei einer FMDV-Infektion durch die L-Protease. Das N-terminale Fragment des gespaltenen eIF4G bindet eIF4E, während das C-terminale Fragment sowohl mit eIF3 (welches an die 40S-Untereinheit bindet) als auch mit der RNA-Helikase eIF4A interagiert (Lamphear *et al.*, 1995). Während die Interaktion der N-terminalen Domäne des intakten eIF4G mit eIF4E absolut notwendig für die Cap-abhängige Translation ist, wird die C-terminale Domäne des gespaltenen eIF4G für die Einleitung der internen Initiation benötigt und erfolgt bei einigen Picornaviren in

Abwesenheit von eIF4E (Ohlmann *et al.*, 1996; Borman *et al.*, 1997b). Eine Sonderstellung nimmt dabei die Hepatitis A IRES (HAV) ein, die im Gegensatz zu den anderen picornaviralen IRES-Elementen intaktes eIF4G für die Translation benötigt (Borman & Kean, 1997).

eIF4G bindet an den Y-förmigen Stem-Loop der EMCV und FMDV IRES (Pestova *et al.*, 1996; Kolupaeva *et al.*, 1998; López de Quinto & Martinez-Salas, 2000; Saleh *et al.*, 2001). Ähnlich wie dies für die eukaryotische Translationsinitiation postuliert wird, könnte eIF4G den Kontakt zwischen IRES-RNA und dem Initiationskomplex vermitteln, indem es sowohl mit der IRES als auch mit dem Faktor eIF3, der mit der 40S-Untereinheit assoziiert ist, interagiert.

Ein weiteres für die interne Translationsinitiation wichtiges Protein ist eIF4B. eIF4B bindet an den Stem-Loop 4 der FMDV IRES (Golini *et al.*, 1976; Baglioni *et al.*, 1978; Meyer *et al.*, 1995; Rust *et al.*, 1999). Da die Bindung an die FMDV IRES nur in Anwesenheit von ATP erfolgt und eIF4B selbst keine ATPase-Aktivität besitzt, wird angenommen, dass die RNA-Helikase eIF4A als Kofaktor an der Bindung von eIF4B an die FMDV IRES beteiligt ist (Meyer *et al.*, 1995). In Experimenten konnte gezeigt werden, dass Deletionsmutanten, die die eIF4B-Bindung beeinträchtigen, gleichzeitig auch erheblich die Translationseffizienz der FMDV IRES vermindern (Rust *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte eIF4B mit der FMDV IRES in ribosomalen 48S- und 80S-Initiationskomplexen nachgewiesen werden (Ochs *et al.*, 1999).

1.4.7 Das Polypyrimidintrakt-Bindungs-Protein (PTB)

Das Polypyrimidin-Trakt Bindungs-Protein (PTB) (Garçia-Blanco *et al.*, 1989; Patton *et al.*, 1991), das an der zellulären Translation nicht beteiligt ist, spielt besonders bei FMDV eine große Rolle (Luz & Beck, 1990). Für dieses Protein wurde auch eine Bindung an andere virale IRES-RNAs nachgewiesen, so zum Beispiel bei EMCV (Jang & Wimmer, 1990), Poliovirus (Hellen *et al.*, 1994), humanem Rhinovirus-2 (HRV) (Borman *et al.*, 1993), Hepatitis A-Virus (Schultz *et al.*, 1996) und interessanterweise auch bei der IRES des zu den *Flaviviridae* gehörenden Hepatitis C-Virus (Ali *et al.*, 1995).

PTB hat ein Molekulargewicht von 57 kDa und existiert in drei verschiedenen Spleißvarianten, die häufig als Doppel- oder Triplet-Banden im SDS-Polyacrylamidgel sichtbar werden (Garçia-Blanco *et al.*, 1989; Gil *et al.*, 1991; Patton *et al.*, 1991). In der eukaryotischen Zelle kommt es vorwiegend im Zellkern vor, ist jedoch auch im Cytoplasma vieler Zellen enthalten. PTB bindet bevorzugt an Pyrimidin-Trakte verschiedener mRNAs. Es scheint als negativer Regulator beim alternativen Spleißen eine Rolle zu spielen und so zur gewebsspezifischen Expression einiger Gene beizutragen (Gil *et al.*, 1991; Lin & Patton, 1995; Southby *et al.*, 1999; Valcarcel & Liebauer, 1997).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte eine innerhalb der Cardio- und Aphthovirus-Gruppe hochkonservierte Nukleotidsequenz im Stem-Loop 4 – 1 des FMDV-IRES-Elements im Bezug auf die Bindung des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF4G charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Welche Rolle spielen die einzelnen mutierten Bereiche für die Bindung des Initiationsfaktors eIF4G ?
2. Ist der mögliche Einfluss der Mutationen auf die Bindung von eIF4G auf die Veränderung der Primärsequenz und/oder der Sekundärstruktur zurückzuführen?
3. Wie verhalten sich die FMDV-IRES-Mutanten in *in vitro*- und *in vivo*-Translationen?

Das IRES-Element ist ein hochstrukturierter Bereich des picornaviralen RNA-Plusstrang-Genoms. Daher sollten zur Beantwortung der oben angeführten Fragestellungen 14 Mutationen in dieser konservierten doppelsträngigen Region eingeführt werden, die entweder nur die Primärsequenz oder sowohl die Primärsequenz als auch die Sekundärstruktur verändern. Der Stem-Loop 4 – 1 ist die Hauptbindungsdomäne des Faktors eIF4G, daher sollten diese IRES-Mutanten in Bindungsanalysen auf die Affinität von eIF4G untersucht werden.

Um den indirekten Einfluss der Mutationen auf die Funktionalität des IRES-Elements zu untersuchen, sollten die FMDV-IRES-Mutanten in *in vitro*- und *in vivo*-Translationen auf eine mögliche Veränderung der Translationseffizienz der FMDV-IRES analysiert werden.

Weiterhin sollte in Rekonstitutionsexperimenten mit gereinigtem eIF4G in Form des eIF4F-Komplexes analysiert werden, ob die funktionellen Defizite der IRES-Mutanten durch Erhöhung der Konzentration des Initiationsfaktors auf der einen Seite oder Erhöhung der Konzentration der Transkripte auf der anderen Seite ausgeglichen werden kann.

2 Ergebnisse I

2.1 Analyse eines konservierten Sequenzelementes der internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES)

Ein Charakteristikum der Picornaviren, von Viren allgemein, ist ihre Abhängigkeit von einer Wirtszelle, die es ihnen ermöglicht, sich zu reproduzieren. Hierzu verwenden die Picornaviren den zellulären Translationsapparat mit den meisten eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIFs), allerdings ohne das Cap-Bindungsprotein eIF4E. Darüber hinaus rekrutieren diese Viren für ihre Translationsinitiation andere zelluläre RNA-bindende Proteine, die bei der normalen zellulären Initiation der Translation keine Funktion haben (zum Beispiel das Polypyrimidintrakt-Bindungsprotein, PTB; Jang & Wimmer, 1990).

Bei der Initiation der Translation übt das Brückenprotein eIF4G eine zentrale Funktion aus und bietet zusätzlich den Picornaviren (wie FMDV und Polioviren) ein Ziel, um die Translation der Wirtszelle auszuschalten („shut off“). Dabei wird die im N-terminalen Bereich von eIF4G lokalisierte eIF4E-Bindungsstelle proteolytisch abgespalten, so dass eIF4G nicht mehr indirekt über eIF4E eine gecappte zelluläre mRNA binden kann. Das C-terminale Fragment von eIF4G bindet weiterhin an die Virus-IRES. Mehrere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Hauptbindungsstelle von eIF4G am „Stem-Loop 4“ (SL 4), unter anderem in der Subdomäne SL 4 –1, der FMDV-IRES lokalisiert ist (Lopez de Quinto, S. & Martinez-Salas, E., 2000, Saleh, L., *et al.* 2001).

Ein weiteres Charakteristikum von RNA-Viren ist ihre relativ hohe Mutationsrate, die in der Regel das gesamte Genom betrifft. Dem gegenüber stehen Sequenzelemente, die innerhalb einer Virusgruppe hochkonserviert sind. Ein solches konserviertes Sequenzelement findet sich bei FMDV im Stem-Loop 4 – 1 (Stem-Loop J-L bei EMCV) der internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) der Familie der Cardio- und Aphotoviren (Jackson & Kaminski, 1995). Die Tatsache, dass das IRES-Element der Ausgangspunkt der viralen Translation ist, und damit eine wichtige Region der Virus-RNA ist, lässt die Existenz solche konservierten Bereiche innerhalb einer Virusgruppe plausibel werden.

Die oben beschriebenen Zusammenhänge führten zu der Frage, welchen Einfluss Mutationen innerhalb dieses konservierten Sequenzelements auf das Bindungsverhalten von eIF4G und anderer Proteine haben, die an der Cap-unabhängigen Initiation der Translation beteiligt sind. Weiterhin wurde untersucht, ob und wie die Funktionalität des IRES-Elements durch die eingebrachten Mutationen beeinträchtigt wird und welchen Effekt monovalente Kationen sowohl auf das Bindungsverhalten der Faktoren als auch auf die Funktionalität des IRES-Elements haben.

Zur Untersuchung dieser Problematik wurde in dieser Arbeit die Methode des UV-Crosslink-„Assays“ benutzt. Kennzeichnend für diese Methode ist die Darstellung von RNA-Protein-Interaktionen mit beiden Bindungspartnern in ihrer nativen Konformation. Eine Bestrahlung von intern radioaktiv markierter RNA mit UV_{254 nm} - Licht bewirkt, dass sich freie Radikale an den

Pyrimidinen bilden, die bei genauer räumlicher Nähe eines RNA-bindenden Proteins, mit dessen Aminosäuren eine kovalente Bindung eingehen können. Nach RNase-Verdau verbleibt dann ein kurzes radioaktiv markiertes Oligonukleotid kovalent am Protein gebunden. Dadurch wird also radioaktive Markierung von der RNA auf das RNA-bindende Protein übertragen. Die Bindungsaffinität von Proteinen hängt von verschiedenen Bedingungen wie Temperatur, Inkubationszeit, Art des verwendeten radioaktiven Nukleotids, sowie den Pufferbedingungen und Salzkonzentrationen ab, vor allem aber von der genauen räumlichen Beschaffenheit der Bindung des Proteins an die RNA.

Hauptsächlich aus letzterem Grund können nicht alle gegebenen Interaktionen von RNA-bindenden Proteinen mit einer RNA mit dieser Methode dargestellt werden. Es ist bekannt, dass nur 11 Aminosäuren, wie Cystein, Tyrosin, Phenylalanin, Histidin, Arginin, Lysin, Serin, Methionin, Threonin und Tryptophan, kovalente Bindungen unterschiedlicher Intensität mit Urazil bei UV-Bestrahlung eingehen (Smith, 1976). Daher ist dieser Assay eine selektive Methode der Untersuchung von RNA-Protein-Interaktionen.

2.1.1 Übersicht der untersuchten Mutationen im konservierten Sequenzelement des Stem-Loops 4 – 1 der FMDV-IRES

Mittels der PCR-Technik wurden, wie in Abbildung 7 dargestellt, insgesamt 14 Mutationen in die hier untersuchte konservierte Region eingebracht. Aus Gründen der Übersicht wurde dieses Sequenzelement in drei Hauptsektoren aufgegliedert, die wiederum in einen aufsteigenden (↑) und einen absteigenden (↓) Ast des Stem-Loops 4 – 1 unterteilt wurden. Dabei steht das „M“ für miss-match-Mutanten im aufsteigenden Ast, während das „D“ (downstream) miss-match-Mutanten im absteigenden Ast benennt, wobei die Zahlen die Anzahl der mutierten Nukleotide angeben. Bei den mit „R“ (random) bezeichneten Mutanten wurden die im Namen enthaltenen Nukleotide zufällig verändert. Steht ein „D“ vor diesen Nukleotiden, sind sie deletiert. Revertanten tragen die Namen beider miss-match-Mutanten, wobei das „M“ entfällt. Bei den AT-Mutationen wurde die originale Sequenz durch ein AT-Dinukleotid ausgetauscht.

Folgende Bereiche wurden mutiert: **1.** : Die vier gepaarten Nukleotide im unteren Bereich des Elementes mit den Mutanten 4M (↑), D4 (↓) und der Revertante 4/D4 (↑↓); **2.** : Die gepaarten Dinukleotide mit den Mutanten 2M (↑), D2(↓), der Revertante 2/D2 (↑↓), 2MAT (↑), D2AT (↓), der Revertante 2/D2AT(↑↓) und **3.** : Die ungepaarten Dinukleotide mit den Mutanten RAC (↑); RGA (↓), DAC (↑), DGA (↓) und der Doppeldeletionsmutante D/DD (↑↓).

2.1.2 Bindung von eIF4G an die FMDV-IRES-Mutanten-RNAs

Abbildung 8 zeigt einen Crosslink mit markierter FMDV-IRES-Wildtyp- beziehungsweise Mutanten-RNAs unter optimierten Pufferbedingungen für die Bindung von eIF4G (Saleh). Zur weiteren Optimierung wurden die Transkripte mit dem radioaktivem Nukleotid [α - 32 P]-rUTP intern markiert, da es sich gezeigt hatte, dass die Qualität der erhaltenen Signale höher ist als bei der Verwendung der anderen drei Nukleotide (Ochs *et al.*, 1999; Rust *et al.*, 1999; Saleh *et al.*, 2001).

Als Quelle für die IRES-bindenden Proteine wurde Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (RRL; Rabbit reticulocyte lysate) (Promega) verwendet, das mit *Micrococcus aureus* (S7-) Nuklease (Ca^{2+} -abhängig) behandelt ist. Durch diese Behandlung wird die endogene mRNA des Lysates verdaut. Die Nuklease wird anschließend durch Zugabe von EGTA (Ca^{2+} -Chelator) gehemmt, so dass das Lysat anschließend nun praktisch ausschließlich die zugesetzte *in vitro* RNA translatiert. Dieses Lysat besitzt laut Angaben des Herstellers 113 mM bei der Produktion zugesetztes Kaliumacetat, zuzüglich einer nicht quantifizierten Konzentration von 25-40 mM Kaliumionen aus den lysierten Retikulozyten (Pelham & Jackson, 1976).

Mehrere Proteine binden mit unterschiedlicher Signalstärke an die FMDV-Wildtyp-IRES (Abb. 8, Spur 1). Das stärkste Signal zeigt ein 57 kDa großes Protein, das als „Polypyrimidine-Tract-Binding Protein“ (PTB) identifiziert wurde (Luz & Beck, 1991; Hellen *et al.*, 1994; Borman *et al.*, 1993). Hierbei überlagern sich die Signale von drei Banden, die bei einer kürzeren Exposition oder wie in Spur 12 sichtbar werden (Garcia-Blanco *et al.*, 1989). Unterhalb der PTB-Bande, bei etwa 50 kDa, läuft ein Polypeptid, das auch auffällig stark an die FMDV-IRES bindet. Bisher ist nicht bekannt, um was für ein Protein es sich handelt und ob es in irgendeiner Form in die IRES-vermittelte Translation involviert ist. Es könnte sich dabei um das an RNA unspezifisch bindende Protein La handeln. Mit einem apparenten Molekulargewicht von 80 kDa bindet der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4B an die radioaktiv markierte Wildtyp-IRES (Meyer *et al.*, 1995). Die für diese Arbeit wichtige Bande zeigt sich bei einem Molekulargewicht von etwa 200 kDa, nämlich eIF4G (Lopez de Quinto, S. & Martinez-Salas, E. 2000; Saleh *et al.*, 2001).

Die miss match-Mutanten im unteren Bereich des konservierten Sequenzelementes 4M (UGGA \rightarrow GCCU, Spur 2), D4 (AUCU \rightarrow CGGA, Spur 3) und ihre Revertante 4/D4 (Spur 4), zeigen ein vom Wildtyp deutlich abweichendes Bandenmuster. Im Vergleich mit dem Wildtyp ist die Intensität der PTB-Bande reduziert, die des 50 kDa Proteins (p50) bleibt konstant oder nimmt zu (Spur 3), aber die Bindungssignale von eIF4B und eIF4G dagegen sind kaum zu detektieren.

Ähnlich erscheinen die Ergebnisse mit den Deletionsmutanten der ungepaarten Dinukleotide DAC (Spur 10), DGA (Spur 11) und D/DD (Spur 12), wobei die Signale des 50 kDa Polypeptids noch stärker (Spur 10 und 11) beziehungsweise die von PTB noch weiter reduziert werden (Spur 12). Die Bindungsaffinität von PTB an die IRES-RNA mit der Doppeldeletion D/DD (Spur 12) der ungepaarten Dinukleotide ist am geringsten, obwohl diese Domäne (SL 4 – 1) keine Bindungsstelle für PTB enthält (Rust *et al.*, 1999).

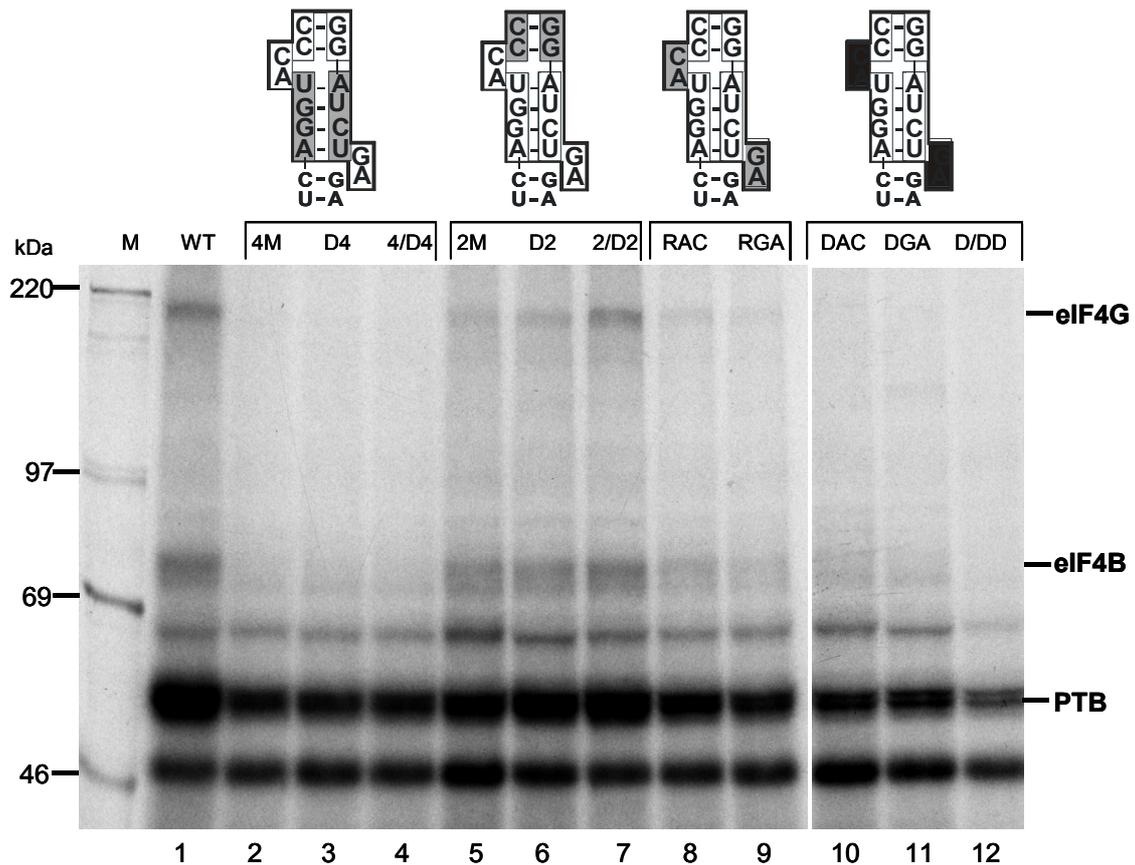


Abbildung 8: Bindung eukaryotischer Initiationsfaktoren (eIFs) aus Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL) an die RNA der FMDV-IRES-Mutanten. Als Matrize für die *in vitro* transkribierte FMDV-IRES-RNAs diente das mit SmaI linearisierte Plasmid pSP449 beziehungsweise dessen Derivate. Es enthält die FMDV O₁K IRES von der Position 363 bis 831 beziehungsweise die IRES mit den jeweils eingebrachten Mutationen.

In einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden 0,3 – 0,4 pmol [α -³²P]-rUTP markierte FMDV-IRES-RNA (Wildtyp beziehungsweise Mutanten) mit 4,4 µl RRL in Anwesenheit von Crosslinkpuffer (10 mM HEPES, pH 7,5; 1 mM DTT; 1,7 mM MgCl₂; 1 µg/µl tRNA; 10% Glycerin; 0,05% NP-40; 0,1 mM ATP) für 30 Min. bei 30°C inkubiert und gleichzeitig mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Die überschüssige RNA wurde mit 3 mg/ml RNase A (45 min. bei 37°C) verdaut und die Proteine auf einem SDS - 8% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die molaren Massen der ¹⁴C markierten Markerproteine und die Positionen von eIF4G, eIF4B und PTB sind angegeben. Zur besseren Übersicht sind die Mutationen innerhalb der konservierten Region grau unterlegt.

Bis auf das p50-Protein sind alle Banden, die mit der Wildtyp-IRES-RNA detektiert werden können, verschwunden oder zumindest in ihrer Intensität stark reduziert.

Der zufällige Sequenzaustausch dieser ungepaarten Dinukleotide resultiert bei beiden Mutationen (RAC, AC → CG, Spur 8; RGA GA → AU, Spur 9) in einer schwachen, aber detektierbaren Bindung von eIF4G und eIF4B. Das PTB-Signal ist schwächer als beim Wildtyp, aber intensiver im Vergleich zu den Banden in den Spuren 2 – 4.

Im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen Mutationen scheinen die miss match-Mutationen in den gepaarten Dinukleotiden 2M (CC → GG, Spur 5), D2 (GG → CC, Spur 6) und ihrer Revertante 2/D2 (Spur 7) die Bindung von eIF4G, eIF4B und PTB am geringsten zu beeinflussen.

Die Intensität der erhaltenen Banden wird in folgender Reihenfolge stärker: 2M → D2 → 2/D2. Auffällig ist, dass die Bandenintensität des 50 kDa Proteins in der selben Reihenfolge abnimmt, was auf eine unspezifische Kompetition hindeutet.

Dieses Gesamtbild liefert eine grobe Charakterisierung der einzelnen Mutationen. Die Mutationen 4M und D4 (Spur 2 und 3) lösen einen Grossteil der Sekundärstruktur in der Subdomäne 4 – 1 auf, wodurch auf eine Reduzierung der Bindungsaffinität der beschriebenen eIFs geschlossen werden konnte. Die Wiederherstellung der Sekundärstruktur des Stem-Loop 4- 1 in der Revertante 4/D4 (Spur 4) zeigt jedoch, dass auch die ursprüngliche primäre Nukleotidsequenz an dieser Stelle für die Bindung von eIF4G und 4B wichtig ist. Bei den ungepaarten Dinukleotide verhält es sich umgekehrt. Die Deletion einer dieser Regionen allein (DAC, DGA, Spur 10 – 11) erlaubt keine Bindung der eIFs mehr, und wenn beide Dinukleotide abwesend sind (D/DD, Spur 12), beeinflusst sie auch die Bindung von Proteinen, wie zum Beispiel PTB, deren Bindungsstellen nicht im SL 4 – 1 lokalisiert sind. Ein Sequenzaustausch (RAC, RGA, Spur 8 – 9) hingegen erlaubt noch eine minimale Bindung der Faktoren eIF4G und eIF4B.

Eine solche klare Abgrenzung der Rolle von Primärsequenz und Sekundärstruktur bei der Bindung der eIFs lässt sich dagegen bei den gepaarten Dinukleotiden nicht vollziehen. Eine Auflösung der Sekundärstruktur durch die Mutanten 2M und D2 (Spur 5 – 6) führen zu unterschiedlichen Bindungsaffinitäten, und bei der Wiederherstellung der sekundären Struktur, durch ihre Revertante 2/D2 (Spur 7) wird die Bindung teilweise wiedergewonnen. Das lässt den Schluss zu, dass sowohl die Sekundärstruktur als auch die Primärsequenz wichtig sind, wobei allerdings eine Veränderung der Primärsequenz keine so gravierenden Folgen hat wie bei der Mutation der 4-Basenpaar-Struktur.

2.1.3 Analyse der Bindungsspezifität der eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF4G und eIF4B

Die radioaktive Markierung der Polypeptide im Crosslink beruht auf der durch die UV-Bestrahlung resultierenden kovalenten Bindung der Proteine an die radioaktiv markierte RNA. Hierfür müssen sich die Aminosäuren und die Pyrimidine in einer geeigneten sterischen Anordnung befinden. Um zu bestätigen, dass die Verminderung der Bandensignale mit den Mutanten-IRES-RNAs, wie sie oben beschrieben wurden, nicht möglicherweise allein auf einer Störung dieser sterischen Anordnung beruht, sondern auf den Verlust der Bindung des ganzen Proteins zurückzuführen ist, wurden Kompetitionsversuche durchgeführt. Radioaktiv markierte Wildtyp-IRES-RNA wurde mit nicht-markierten Wildtyp-IRES- beziehungsweise Mutanten-IRES-RNAs an der Bindung an die Proteine verdrängt. Hierbei wurde je ein 4-facher, 16-facher und 64-facher molarer Überschuss an nicht-markierten RNAs in einem Crosslinkansatz verwendet. Die Abbildung 9 stellt die Ergebnisse dieser Untersuchung dar. Die Kompetition mit der nicht-markierten Wildtyp-IRES-RNA (Spuren 1 – 4) zeigt, dass die Intensität der eIF4G-Bande proportional zum molaren Überschuss an kompetierender RNA reduziert wird und die Bande bei einem 64-fachen Überschuss (Spur 4) fast nicht mehr zu sehen ist. Analog hierzu verhält sich die Bindung von eIF4B. Das Bindungssignal wird, im

Vergleich zu eIF4G, nicht so stark abgeschwächt, was man auf eine höhere Abundanz von eIF4B im Lysat zurückzuführen sein könnte. Allgemein lässt sich feststellen, dass die hier erkennbaren Protein-RNA-Interaktionen sich typisch für eine solche Verdrängung einer markierten RNA oder DNA mit homologen Kompetitor verhalten.

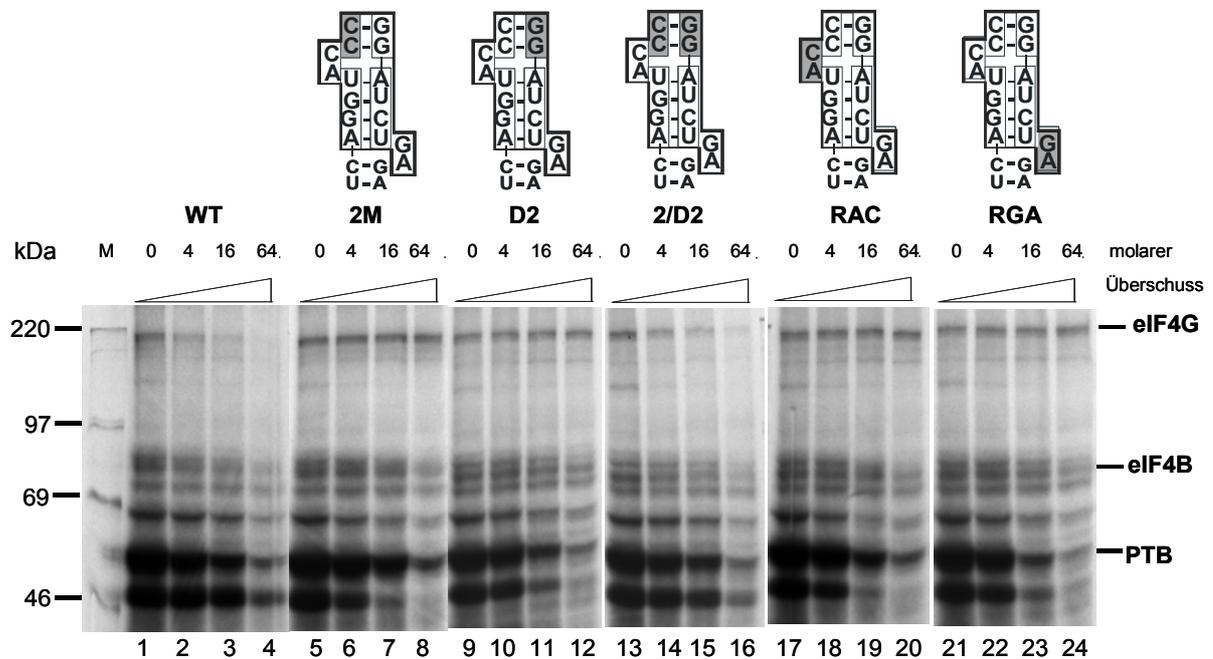


Abbildung 9: Kompetitions-Assay. Radioaktiv markierte Wildtyp-IRES-RNA wurde mit nicht-radioaktiver Wildtyp-IRES-RNA beziehungsweise Mutanten-IRES-RNAs bei den molaren Überschüssen wie oben angegeben kompetiert. Alle ausgesuchten Mutanten-IRES-RNAs zeigten in Abbildung 2 eine Bindung von eIF4G. Die molaren Massen der ^{14}C markierten Markerproteine und die Positionen von eIF4G, eIF4B und PTB sind angegeben. Zur besseren Übersicht sind die Mutationen innerhalb der konservierten Region grau unterlegt.

WT = Wildtyp

Einen solchen kompetitiven Effekt auf die eIF4G-Bande bei der Verdrängung der Wildtyp-IRES-RNA kann man mit der IRES-RNA der Mutante 2M selbst bei einem 64-fachen Überschuss (Spur 8) nicht feststellen. Schon bei einem 16-fachen (Spur 7) und erst recht bei einem 64-fachen Überschuss (Spur 8) ist dagegen ein Einfluss des Kompetitors auf das Bindungssignal für eIF4B erkennen. Auffällig bei dieser Konkurrenz ist, dass die Bande (p50) unterhalb der PTB-Bande stärker mit der 2M Mutanten-IRES-RNA verdrängt wird als mit der Wildtyp-IRES-RNA. Bei PTB tritt ein schwacher kompetitiver Effekt erst bei einem 16-fachen Überschuss ein, und die Konkurrenz ist auch bei 64-fachen Überschuss weniger stark als mit der Wildtyp-IRES-RNA (Spuren 4 und 8). Tatsächlich scheint diese Mutation die Bindungsaffinität von eIF4G und auch PTB herabzusetzen und ermöglicht so vermutlich eine bessere Bindung des p50 Proteins.

Ein ähnliches Bild zeigt die Durchführung des Versuches mit der IRES-RNA der Mutante D2. Es wird keine Verdrängung von der markierten Wildtyp-IRES-RNA an eIF4G sichtbar. Die konstante Abnahme der Bandenintensität von PTB ist vergleichbar mit der Konkurrenz durch die Wildtyp-IRES-RNA. Die IRES-RNA dieser Mutante kompetiert die markierte Wildtyp-IRES-RNA schon bei einem geringeren Überschuss von dem 50 kDa Protein als Wildtyp-IRES-RNA selbst. Auch diese Mutation reduziert die Affinität von eIF4G zu dieser IRES-RNA. Im Gegensatz zu eIF4G scheint die eIF4B-Bindung weniger und die PTB-Bindung überhaupt nicht durch die D2-Mutation betroffen zu sein. Die stärkere Konkurrenz des p50 Polypeptids lässt sich vermutlich auf dieselbe Ursache wie bei der 2M-Mutante zurückführen.

Die Revertanten-IRES-RNA 2/D2 zeigt ein analoges Konkurrenzmuster (Spuren 13 bis 16) wie das der Wildtyps. Der Unterschied besteht lediglich in einer geringeren Verdrängungseffizienz der markierten RNA von den Proteinen, was dazu führt, dass die Bandenintensitäten stärker sind als die in den Spuren 1 bis 4.

Wie auch bei den miss match-Mutationen der gepaarten Dinukleotide 2M und D2 findet man bei Verwendung der IRES-RNAs der RAC- und RGA-Mutanten keine kompetitiven Effekte auf die eIF4G-Bande. In Bezug auf eIF4B erkennt man eine klare Verdrängung der markierten Wildtyp-IRES-RNA von diesem Initiationsfaktor bei 16-fachem und 64-fachem Überschuss. Ein unterschiedliches Konkurrenzverhalten zwischen diesen beiden Mutanten-RNAs erkennt man bei PTB und dem 50 kDa großen Protein. Die IRES-RNA der RGA-Mutante bindet stärker an PTB als die IRES-RNA der RAC-Mutante (vergleiche die Spuren 23, 24 und 19, 20). Das entgegengesetzte Bild sieht man bei der Proteinbande, die in Höhe von ca. 50 kDa läuft. Unabhängig von den Konkurrenzergebnissen für eIF4G und eIF4B zeigen die IRES-RNAs der Mutationen 2M und RAC also ein fast identisches Muster im Bezug auf PTB und das p50-Protein. Vermutlich ist der Grund darin zu finden, dass diese Mutationsstellen in unmittelbarer Nachbarschaft in dem konservierten Element liegen.

Diese Konkurrenzexperimente zeigen also, dass es sich beim Verlust der Detektion der eIF4G-Bande im UV-Crosslink-Assay tatsächlich um einen Verlust der Bindung des Proteins an die RNA handelt, und nicht nur um einen Verlust des Transfers der radioaktiven Markierung von der RNA auf das Protein.

2.1.4 Ergebnisse der *in vitro* Translation

Zur Bestätigung der aus dem Crosslink erhaltenen Daten wurden in einer *in vitro* Translation nicht markierte IRES-Wildtyp- beziehungsweise -Mutanten-RNAs getestet. Nach einer Stunde Inkubation bei 30°C in RRL wurden die Proben, wie im Material und Methodenteil beschrieben analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

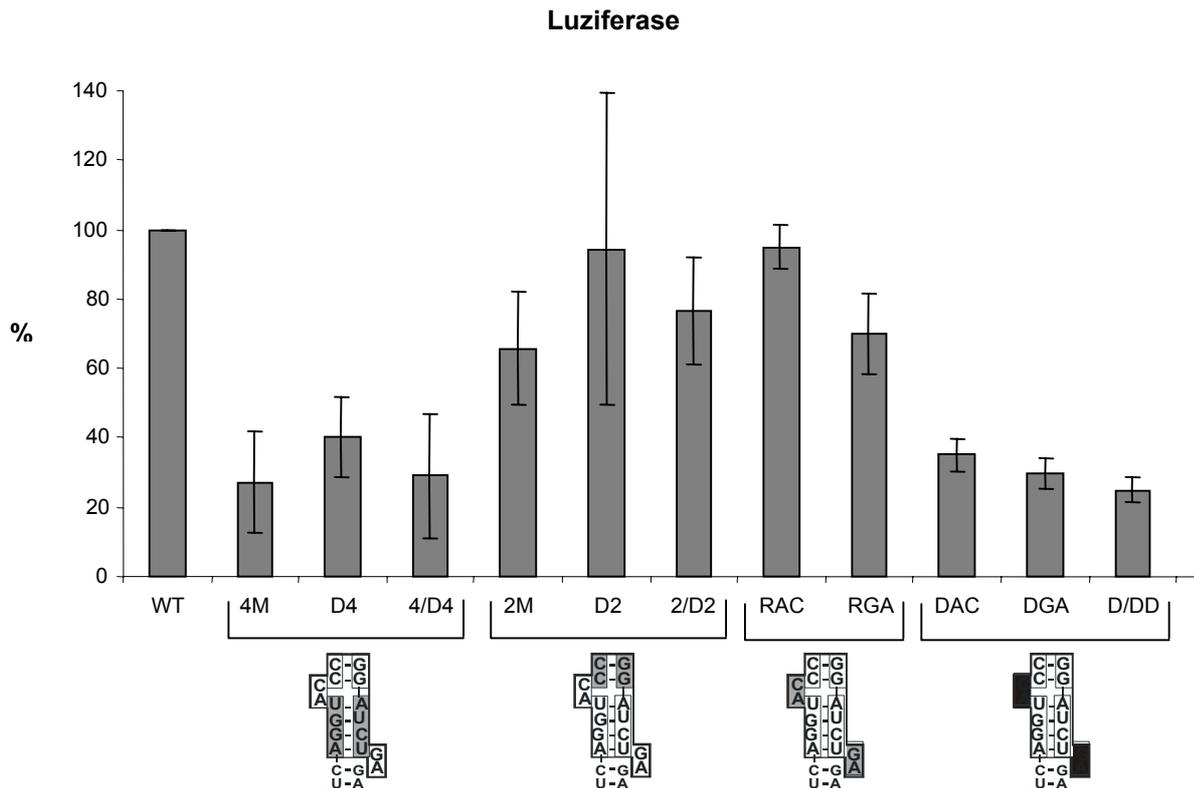


Abbildung 10: Bestimmung der IRES-Aktivität durch *in vitro*-Translation. Als Matrize für die *in vitro* Transkripte diente das mit Smal linearisierte Plasmid pD128. Dieser dicistronische Vektor trägt das Repotergen für die Chloramphenicol -Acetyltransferase (CAT) und dahinter das Luziferase-Gen, welches an das authentische Startkodon am 3'-Ende der FMDV IRES fusioniert ist. In 10 μ l Ansätzen wurden je 0,1 pmol der dizistronischen RNAs mit 4,4 μ l RRL bei 30°C für eine Stunde inkubiert und die Aktivitäten wie im Methodenteil beschrieben ausgewertet. Zur Standardisierung wurde die Aktivität des Wildtyps auf 100% gesetzt. Zur Vereinfachung der Orientierung sind die Mutationen innerhalb der konservierten Region grau unterlegt.

Das Balkendiagramm zeigt die gemessene Aktivität der synthetisierten Luziferase (in Prozent) im Bezug auf die Aktivität des Wildtyps (auf 100% gesetzt). Die Luziferase-Aktivität, die mit den Transkripten der IRES-Elemente mit Mutationen im unteren Bereich des konservierten Elementes (4M, D4, 4/D4) erhalten wurde, liegt zwischen 30 – 40% der Aktivität des Wildtyps. Die IRES-Deletionsmutanten-RNAs (DAC, DGA und D/DD) exprimieren soviel Luziferase, dass noch 25 – 35% der Wildtyp-Aktivität erreicht wird. Der Sequenzaustausch der ungepaarten Dinukleotide zeigte, nach der Analyse der Translation dieser Mutanten-RNA eine Luziferase-Aktivität von 75% (RGA) beziehungsweise 95% (RAC), was in einem gegensätzlichen Verhältnis zu den gefundenen Bindungssignalen im Crosslink (Abb. 8) steht. Dies trifft auch auf die Luziferase-Aktivitäten der beiden miss-match-Mutanten der gepaarten Dinukleotide 2M und D2 zu. Mit 60% (2M) und 95% (D2) der Wildtyp-Aktivität passen diese Werte nicht zu den im Crosslink erhaltenen Daten.

Nach allen eigenen Ergebnissen und der anderer Arbeitsgruppen und unter der vernünftigen Annahme, dass die Translation proportional zur Bindung von eIF4G an die IRES stehen sollte,

deuten diese Translationsdaten auf einen systematischen Mangel des experimentellen Systems hin. Auch die Größe der Fehlerbalken, die die Abweichung der Messungen zwischen den einzelnen Messreihen darstellen, unterstützen diese Vermutung.

2.1.5 Einfluss monovalenter Kationen auf die Bindung von eIF4G an die FMDV-IRES-Mutanten-RNAs

Wie schon oben erwähnt (2.1.1), enthält das verwendete Retikulozyten-Lysat der Firma Promega eine Konzentration von 113 mM zugesetztem Kalium in Form von Kaliumacetat. Auf der Basis der Herstellerangaben (Promega) wurde der Kaliumgehalt pro Versuchsansatz auf 50 mM berechnet (4,4 µl RRL/ 10 µl Endvolumen). Dabei wurde die variable, endogene Kaliumkonzentration von 20 – 40 mM, die zusätzlich im Lysat enthalten ist und aus dem endogenen Kaliumgehalt der lysierten Retikulozyten resultiert (Pelham & Jackson, 1976), nicht berücksichtigt. An ausgewählten Mutanten-IRES-RNAs wurde das Bindungsverhalten von eIF4G bei Kaliumendkonzentrationen von 50, 75 100, 125 und 150 mM, welches in Form von Kaliumchlorid zugegeben wurde, untersucht (Abb. 11).

Wie in dieser Abbildung zu sehen ist, wird die Bindung von eIF4G an die Wildtyp-IRES-RNA nur mäßig von der Steigerung der Kaliumkonzentration beeinflusst (Spuren 1 – 5), da die Bandenintensität erst bei einer Kaliumendkonzentration zwischen 125 und 150 mM (Spur 4 und 5) geringfügig abnimmt. Wesentlich sensitiver scheint der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4B auf eine Erhöhung der Kaliumkonzentration zu reagieren. Bei einem Anstieg um 25 mM KCl (Spur 2) wird das Bindungssignal dieses Proteins sichtbar reduziert und ist bei 150 mM kaum noch zu detektieren (Spur 5). Die Tatsache, dass das Signal von eIF4B in diesem Lysat so schwach ist, ist vermutlich auf die hier verwendete Präparation Retikulozyten-Lysat zurückzuführen.

Bei der miss-match-Mutante 4M, die als Negativkontrolle fungiert, ist wie zu erwarten keine Veränderung im Bindungsverhalten von eIF4G sichtbar, dass auch schon bei niedrigen Salzkonzentrationen nicht mehr zu detektieren war. Die Bande, die eIF4B repräsentiert, verschwindet schon bei einer Endkonzentration von 75 mM. Mit der RNA der Mutante 2M ist im Crosslink eine Abschwächung der eIF4G-Bande bis zu einer Konzentration von 100 mM zu erkennen, wobei dieses Signal (Spur 13) sehr schwach ist. Darüber hinaus ist sie in bei Kaliumkonzentrationen von 125 und 150 mM (Spuren 14 und 15) nicht mehr zu detektieren. Ähnliche Resultate erhält man bei der eIF4G-Bindung an die IRES-RNA der D2-Mutante.

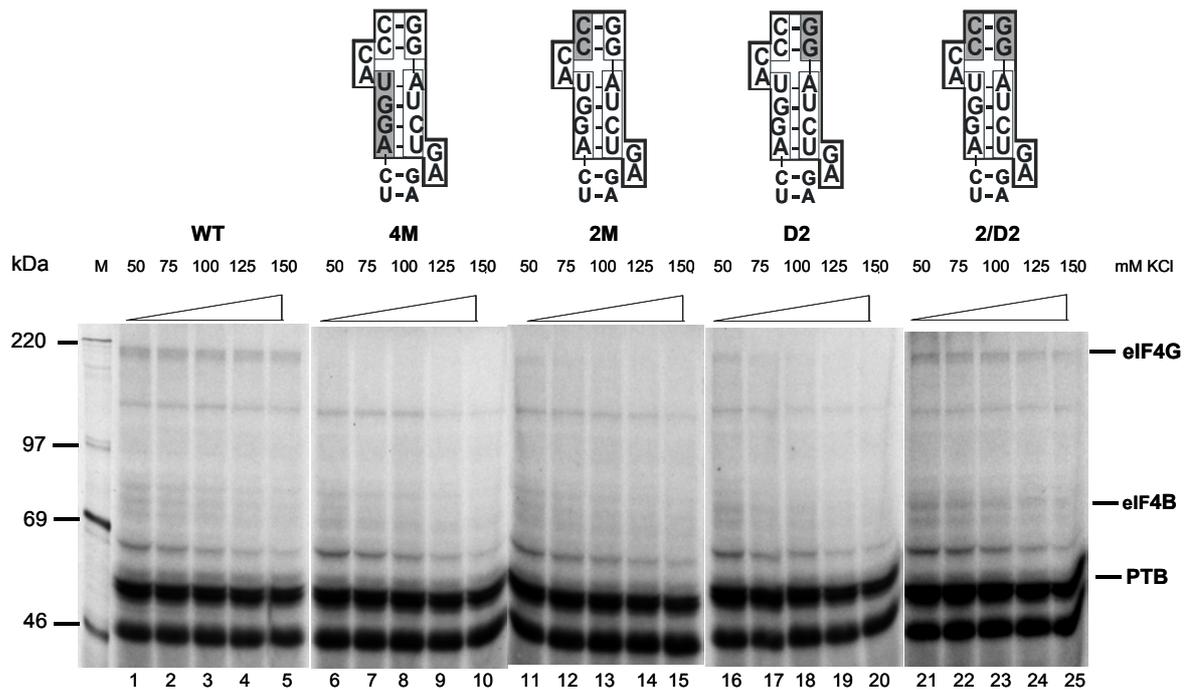


Abbildung 11: Bindung von eIF4G an ausgesuchte IRES-Mutanten bei verschiedenen Konzentrationen monovalenter Kationen. In diesem Ansatz wurden IRES-Mutanten eingesetzt, die eine unerwartete Translationsrate zeigten. Die Mutante 4M diente als Negativkontrolle. Der Standard-Crosslink wurde bei verschiedenen Konzentrationen an Kaliumchlorid wie oben angegeben durchgeführt. Die molaren Massen der ^{14}C markierten Markerproteine und die Positionen von eIF4G, eIF4B und PTB sind angegeben. Zur besseren Übersicht sind die Mutationen innerhalb der konservierten Region grau unterlegt. WT = Wildtyp-IRES

Bei Zunahme der Salzkonzentration nimmt die Intensität des Bindungssignal bis zu einer Endkonzentration von 100 mM KCl ab (Spuren 16 – 18) und geht bei 125 mM verloren (Spur 19). Mit der IRES-RNA der Revertante 2/D2 (Spuren 21 – 25) verliert die Bindung von eIF4G bei steigender Kaliumchloridkonzentration an Affinität. Obwohl die Intensität der Bande konstant abnimmt, ist sie aber noch bei einer Endkonzentration von 150 mM zu detektieren.

Diese Experimente zeigen, dass die Konzentration an Kaliumionen einen großen Einfluss auf die Bindung der eukaryotischen Initiationsfaktoren an Mutanten-IRES-RNAs hat. Eine Optimierung der Kaliumionenkonzentration sollte zu einer ausgeglicheneren Korrelation der beiden Untersuchungsansätze für den UV-Crosslink auf der einen Seite und der *in vitro*-Translation auf der anderen Seite (2.1.2 und 2.1.3) führen. Zur weiteren Klärung wurden im Folgenden die IRES-Aktivitäten ausgesuchter IRES-Mutanten ebenfalls bei unterschiedlichen Kalium-Konzentrationen analysiert.

2.1.6 Untersuchung zur IRES-Aktivität von ausgesuchten Mutanten-IRES-RNAs bei unterschiedlichen Kaliumchloridkonzentrationen

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der *in vitro*-Translation von Wildtyp-IRES- und Mutanten-IRES-RNAs bei Kaliumchlorid-Endkonzentrationen von 50, 75, 100, 125 und 150 mM. Zusätzlich zu den in 2.1.3 beschriebenen Mutanten wurde auch die IRES-Aktivität der RAC- und RGA-Mutanten untersucht, die einen zufälligen Sequenzaustausch der ungepaarten Dinukleotide im konservierten Sequenzelement tragen.

Die Expression des Luziferase-Gens verläuft bei den hier untersuchten RNAs bei Erhöhung der KCl-Konzentration sehr unterschiedlich. Die Menge des Translationsproduktes der Wildtyp-IRES-RNA steigt mit konstanter Zugabe von KCl proportional an und findet sein Maximum bei 100 beziehungsweise 125 mM (Spuren 1 – 4). Eine Konzentration von 150 mM reduziert die Menge des Translationsproduktes auf das Niveau von 50 mM KCl (vergleiche die Spuren 1 und 5). Die Translationseffizienz der 4M-Mutanten-RNA dagegen ist schon ohne weitere Zugabe von KCl sehr niedrig (Spur 1), und es findet auch bei steigender Kaliumchlorid-Konzentration keine weitere Steigerung statt. Trotzdem zeigt sich noch bei 100 mM Translationsprodukt, welches aber ab 125 mM nicht mehr zu detektieren ist. Die 2M-Mutanten-IRES zeigt bei 50 und 75 mM eine etwa gleichbleibende Effizienz der Translation, wobei sie bei 125 mM Kaliumchlorid (Spur 14) noch eine geringe Translation erlaubt. Eine Konzentration von 150 mM unterbindet die Translation bei dieser Mutante komplett (Spur 15). Wie auch bei der Wildtyp-RNA, steigt die Synthese der Luziferase bei der D2-Mutanten-IRES-RNA bis zu einer Konzentration von 100 mM KCl an (Spur 16 – 18), wird dann im Gegensatz zur Wildtyp-IRES aber bei 125 mM stark reduziert (Spur 19) und kommt bei 150 mM ganz zum Erliegen.

Wie aus den vorangegangenen Daten abzuleiten ist, zeigt die Revertanten-RNA der gepaarten Dinukleotide (2/D2) ein ähnliches Translationsmuster wie die Wildtyp-RNA. Proportional zur Erhöhung der Salzkonzentration steigt auch die Translationsrate bis zu einem Maximum bei 100 mM an. Die Intensität der Luziferase-Bande bei 125 mM (Spur 24) ist mit der bei 75 mM (Spur 22) vergleichbar. Ein abrupte Reduzierung der Syntheserate findet etwas ausgeprägter als beim Wildtyp, bei 150 mM KCl statt.

Auf die Translation der RNA der RAC-Mutante scheint die Erhöhung der Salzkonzentration auf den ersten Blick keinen nennenswerten Effekt zu haben. Bei genauerer Betrachtung sieht man, dass das Translationsoptimum bei 75 mM KCl liegt (Spur 27). Die Intensitäten der flankierenden Banden sind annähernd gleich stark (Spuren 26 und 28). Wie auch bei den Mutanten-IRES-RNAs 2M und D2 wird hier die Translationsrate bei einer Kaliumchlorid-Konzentration von 125 mM stark gesenkt (Spuren 14, 19 und 29). Analog zur RAC-Mutanten-RNA befindet sich die höchste Translationsrate der RGA-Mutante bei 75 mM KCl. Im Gegensatz zur RAC-Mutanten-RNA (Spuren 26, 28) ist die Bandenintensität bei 100 mM (Spur 33) geringer, als die Bandenintensität in Spur 31.

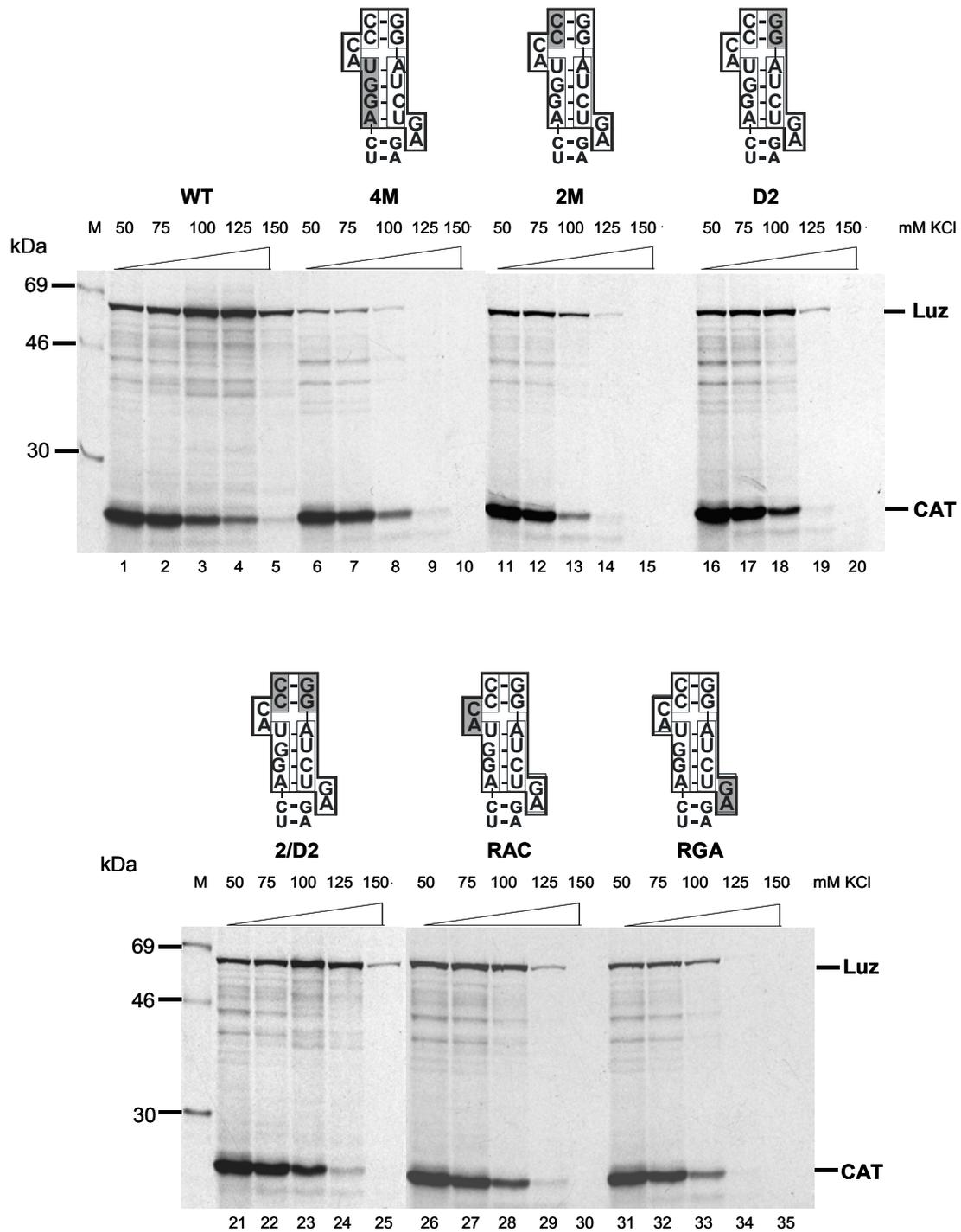


Abbildung 12: *In vitro*-Translation ausgesuchter Mutanten bei verschiedenen Salzkonzentrationen.

Der Vektor pD128 (mit SmaI linearisiert) diente als Matrize für die unmarkierten FMDV-IRES-RNAs ausgesuchter Mutanten. Diese (Wildtyp- beziehungsweise Mutanten-RNA) wurden bei verschiedenen Konzentrationen von Kaliumchlorid wie oben angegeben mit RRL und unter Zugabe von ^{35}S – Methionin für 1 h bei 30°C inkubiert und die Proteine auf einem SDS – 12% - Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

In Spur 34 (125 mM KCl) findet man nur noch eine sehr schwache detektierbare Luziferase-Bande, die bei weiterem Anstieg des Salzgehaltes ganz verschwindet (150 mM, Spur 35).

Die Expression des CAT-Gens (Chloramphenicol-Acetyltransferase), welches 5'-abhängig translatiert wird, läuft im wesentlichen bei allen hier untersuchten IRES-RNAs gleich ab. Mit zunehmendem Salzgehalt verringert sich die Synthese dieses Proteins. Auffällig dabei ist, dass die Translation des CAT-Reportergens abhängig von der benutzten Mutanten-IRES-RNA bei unterschiedlichen KCl-Konzentrationen nicht mehr stattfindet. Dieser Befund wird im zweiten Ergebnissteil einem späteren Zeitpunkt näher untersucht und diskutiert.

Wie oben erwähnt, versetzt der Hersteller Promega das Kaninchen-Retikulozyten-Lysat mit Kaliumacetat (KAc). In unserer Arbeitsgruppe konnte vergleichend gezeigt werden, dass KAc einen anderen Effekt auf die Translation hat als das in dieser Arbeit benutzte Kaliumchlorid. Sowohl die Kaliumkationen, als auch die Chloridanionen weisen eine höhere Stimulation auf die FMDV Translation auf (Niepmann 2003). Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeiten (Jackson, 1991) wurde dargelegt, dass eine Translation der FMDV-IRES noch bei unphysiologisch hohen Kaliumkonzentrationen möglich ist, wenn Kaliumacetat verwendet wird (Niepmann, 2003). Auf Grund der beschriebenen Resultate (2.1.4) wurden alle folgenden Untersuchungen bei einer KCl-Endkonzentration von 120 mM durchgeführt. Die so simulierten physiologischen Kaliumbedingungen tragen dabei auch der variablen Menge an Kaliumionen (Pelham & Jackson, 1976) Rechnung, so dass die gesamte im Ansatz vorhandene Konzentration an Kaliumionen etwa bei 140 – 150 mM liegen sollte und damit weitgehend der intrazellulären Kalium-Konzentration entspricht.

2.1.7 Die Bindung der eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren eIF4G und eIF4B bei den gewählten Hochsalzbedingungen (120 mM KCl)

Eine eukaryotische Zelle verfügt im Durchschnitt über eine endogene Konzentration von ca. 140 mM an Kaliumionen. Der hier in Abbildung 7 dargestellte Crosslink zeigt zusammenfassend das Bindungsverhalten der oben (2.1.1) beschriebenen Proteine bei einer eingesetzten Endkonzentration von 120 mM KCl. Diese Konditionen sollen annähernd zellphysiologische Bedingungen simulieren, wobei die von Jackson beschriebene variable K^+ -Konzentration (von etwa 22 – 40 mM Kalium im Lysat) berücksichtigt wurde, so dass die tatsächliche Konzentration an Kaliumionen 140 mM nicht überschreitet.

Im Vergleich zu dem Crosslink bei Niedrigsalzbedingungen (bei 50 mM KCl; Abb. 8) ist das Bindungssignal von eIF4G an die IRES-RNAs der 2M- und D2-Mutanten bei 120 mM KCl stark reduziert (Abb. 13). Auch die Bandenintensität von eIF4G in Spur 7 (Revertante 2/D2) ist vermindert. Banden, die die Bindung von eIF4B an die IRES-RNAs der gepaarten Dinukleotidmutanten repräsentieren, sind in den Spuren 5, 6 und 7 nicht mehr zu detektieren. Ebenfalls mit der Wildtyp-IRES-RNA findet man eine etwas geringere Intensität dieser Bande.

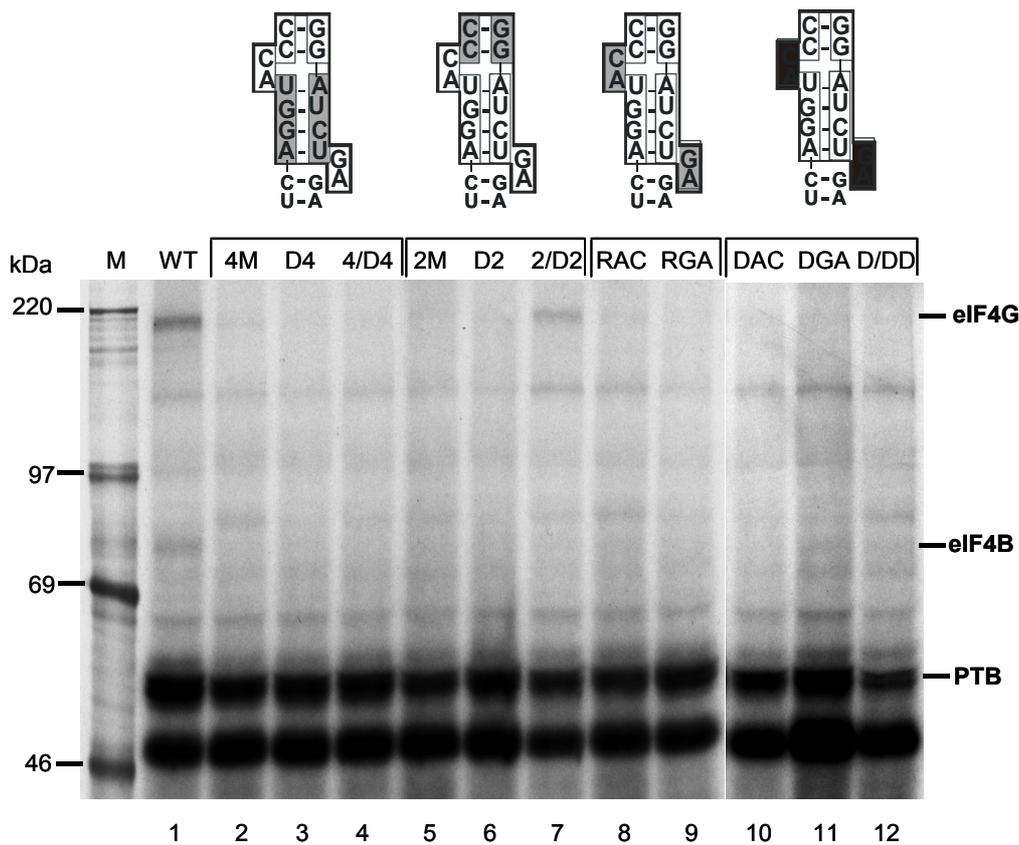


Abbildung 13: Bindung von eIF4G an FMDV-IRES-RNAs bei Hochsalzbedingungen (120 mM KCl). Der Standard-Crosslink wurde bei einer Endkonzentration von 120 mM KCl durchgeführt, so dass die Bindung von eIF4G an FMDV-IRES-RNAs näherungsweise bei physiologischen Bedingungen stattfinden konnte. Als Matrize für die FMDV-IRES-RNAs dienten das Plasmid pSP449 beziehungsweise seiner Derivate (SmaI linearisiert).

Die hier eingesetzten Hochsalzbedingungen beeinflussen auch das Bindungsverhalten von PTB. Im Vergleich zu den Spuren 1 – 4 in Abbildung 2 nimmt die Affinität von PTB zu den Mutanten-IRES-RNAs scheinbar zu (Abb. 13, Spuren 1 - 4). Der gleiche Effekt zeigt sich auch deutlich in den Spuren 9 und 11 (Abb. 13) mit der RGA- beziehungsweise DGA-Mutanten-IRES-RNA. Im Gegensatz hierzu verringert sich die Affinität von PTB zu den IRES-RNAs der 2M-Mutante und 2/D2-Revertante (vergleiche Abb. 8, Spur 5 und 7 und Abb. 13, Spur 5 und 7). Bedingt durch die hohe Salzkonzentration und in Abhängigkeit von der Mutation ist anzunehmen, dass sich die Räumlichkeiten in oder an der IRES möglicherweise so geändert haben, dass die Bindungsmöglichkeit von PTB verbessert beziehungsweise verschlechtert wird. Die Endkonzentration von 120 mM Kaliumionen scheint dagegen keinen vergleichbaren Einfluss auf die PTB-Bindung an die IRES-RNAs der D2-, RAC-, DAC- und D/DD-Mutanten zu haben (Spuren 6, 8, 10 und 12 in den Abb. 8 und 12).

Ein homogenes Bindungsmuster präsentiert sich auch für das 50 kDa Polypeptid (p50). Im Gegensatz zu den in Abbildung 8 erzielten Resultaten zeigt sich eine gesteigerte Affinität zu allen IRES-RNAs, besonders zu der IRES-RNA der DGA-Mutante (Abb. 13, Spur 11). Die durch die Mutationen bedingten strukturellen Veränderungen der IRES im Zusammenhang mit den Hochsalzbedingungen haben vermutlich zur Folge, dass insgesamt weniger Proteine an das IRES-Element binden, so dass p50 dann besser an die IRES binden kann.

2.1.8 Untersuchungen zur IRES-Aktivität bei hohen Kaliumkonzentrationen (120 mM KCl) und *in vivo*

Die Abbildung 14 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten IRES-Aktivitäten unter physiologischen Bedingungen. Dabei wurden diese in Bezug auf die Kaliumionenkonzentration physiologischen Bedingungen in zwei verschiedenen Systemen getestet und miteinander verglichen. In Abbildung 8A wurde durch Zugabe von KCl die Ionenmenge im Reticulocyten-Lysat, also im *in vitro*-Experiment, künstlich auf 120 mM. Abbildung 8B ist die grafische Darstellung der Resultate des in BHK-Zellen *in vivo* translatierten Reportergens Luziferase im Kontext des dicistronischen Vektors pD128 (Wildtyp) beziehungsweise der Mutanten. Die in diesem Zusammenhang erhaltenen Daten zur Translation des CAT-Reportergens werden an anderer Stelle beschrieben und diskutiert.

In Abbildung 14A ist zu erkennen, dass bei erhöhter KCl-Konzentration die Translation der IRES-RNAs der Mutanten 4M, D4, 4/D4 und den Deletionsmutanten auf ein sehr niedriges basales Niveau gedrückt wird. Auch die IRES-Aktivität der RAC- und RGA-Mutanten-RNA ist im Vergleich zu den vorher verwendeten Niedrigsalzbedingungen deutlich reduziert. In den Spuren 5, 6 und 7 sieht man eine zunehmende IRES-Aktivität der gepaarten Dinukleotidmutanten 2M, D2 und 2/D2.

Vergleichbare Ergebnisse erhält man aus der Analyse der *in vivo* Translation (Abb. 14B). Wie auch in dem *in vitro* Experiment sind die Mutanten 4M, D4, 4/D4, DAC, DGA, und D/DD nur zu einer basalen Translation fähig. Das Verhältnis der gemessenen Luziferaseexpression der gepaarten (2M, D2, 2/D2) und ungepaarten (RAC, RGA) Dinukleotidmutanten zueinander und zum Wildtyp weisen unter Berücksichtigung der verschiedenen Methodik eine adäquate Korrelation auf.

Auch der in Abschnitt 2.1.5 beschriebene Effekt auf die CAT-Expression wird in Abbildung 14A sichtbar. Es entsteht der Eindruck, dass das IRES-Element des dicistronischen Transkriptes auf die 5'-abhängige Translation einen prinzipiellen Einfluss hat. Dieser Einfluss scheint zum einen abhängig von der Salzkonzentration zu sein und zum anderen von der eingeführten Mutation in das IRES-Element. Weitere Untersuchungen werden im Ergebnissteil II beschrieben und diskutiert.

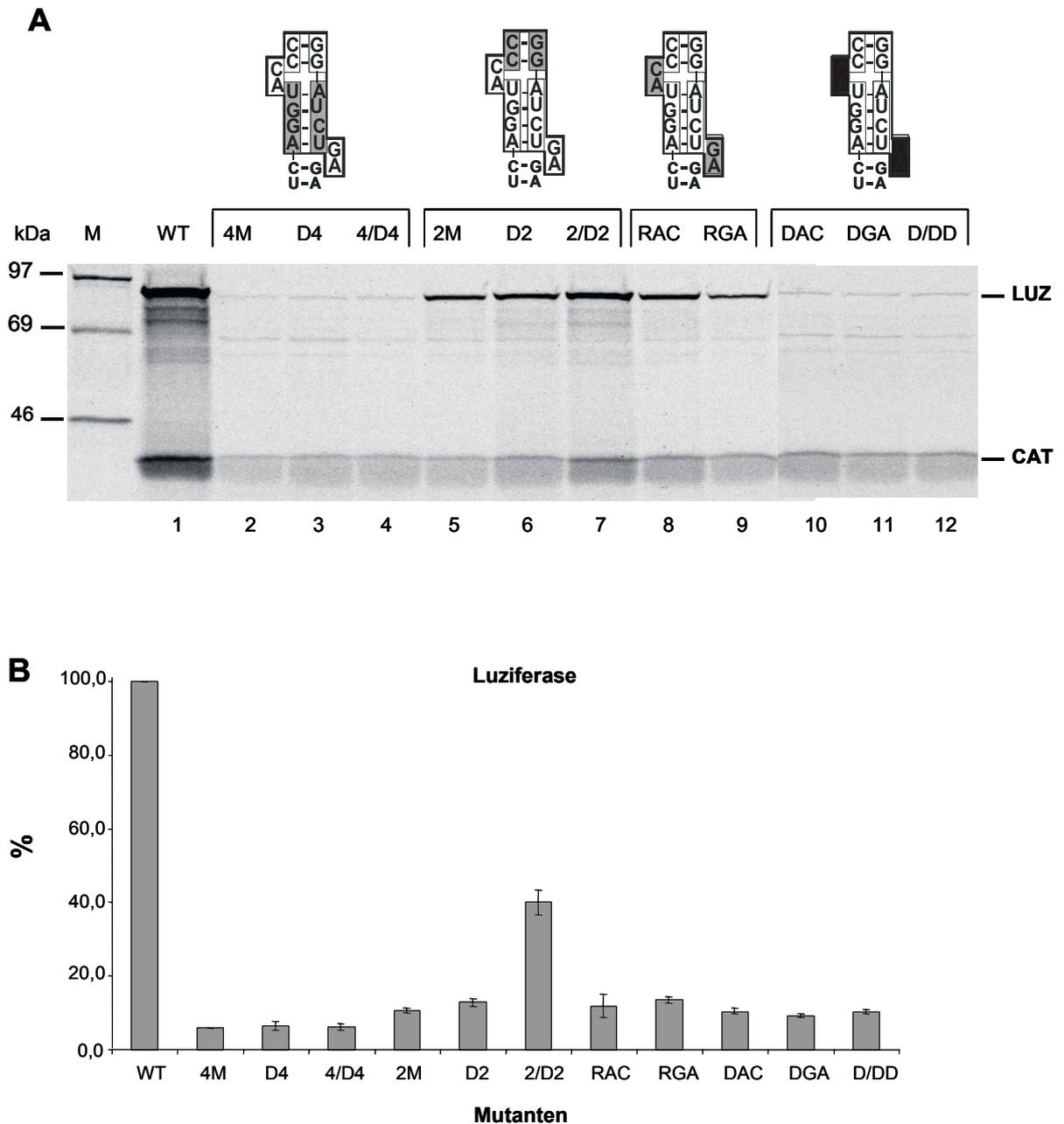


Abbildung 14: Vergleich von *in vitro* Translation bei Hochsalzbedingungen (120 mM KCl) und *In vivo* Translation. (A) Unmarkierte Wildtyp-RNA beziehungsweise Mutanten-RNAs wurden unter Zugabe von Kaliumchlorid bei einer Endkonzentration von 120 mM KCl bei Anwesenheit von ^{35}S – Methionin mit RRL bei 30°C für 1 h inkubiert. Als Matrize für die *in vitro* Transkription diente das Plasmid pD128 beziehungsweise seiner Derivate (SmaI-linearisiert).

(B) **Transfektion der Mutanten.** BHK-Zellen („Baby hamster kidney-cells“) wurden mit je 1 μg dicistronischem Plasmid (pD128; Wildtyp beziehungsweise Mutanten) und Lipofectamin 2000™ transfiziert, nach 24 h geerntet und mit „passivem Lysepuffer“ (PLB; „Passive Lysis Buffer“) aufgeschlossen. Die Luziferase-Aktivität wurde wie im Material- und Methodenteil beschrieben, untersucht. Der Wildtyp wurde als Standard auf 100% gesetzt.

2.1.9 Die Zugabe von eIF4F kann den funktionellen Defekt der IRES-Aktivität nicht wiederherstellen

Der Translationsinitiationsfaktor 4F beinhaltet das Cap-Bindungsprotein eIF4E, die RNA-Helikase eIF4A und das Adapterprotein eIF4G. Da in den IRES-Mutanten die Bindung von eIF4G beeinträchtigt war, sollte in diesem Versuch geklärt werden, ob nach Maßgabe des Massenwirkungsgesetzes eine Erhöhung der Konzentration des verfügbaren eIF4G durch Zugabe des Initiationsfaktors eIF4F die IRES-Aktivität der translationsschwachen Mutanten erhöhen kann. Hierzu wurden *in vitro*-Translationen (bei 120 mM KCl) mit der IRES-RNA des Wildtyps, der 4M-, 2M- und 2/D2-Mutante unter Zugabe von gereinigtem eIF4F (dankend erhalten von A. Thomas/Utrecht) durchgeführt. Wie in Abbildung 15 dargestellt, konnten bei einer Konzentration von 0.2 μ M (0.3 pmol eIF4F) die IRES-Aktivität der 4M- und 2M-Mutanten um den Faktor 14 beziehungsweise 3 erhöht werden. Dennoch bleiben sie auf einem sehr niedrigen Aktivitätsniveau, das nicht mehr als 5% der Wildtyp-Aktivität ausmacht. Die IRES-Aktivität der gepaarten Dinukleotid-Revertante wurde leicht (um 6%) erhöht, während die Aktivität der Wildtyp-IRES aus unbekanntem Gründen um 20% verringert wurde.

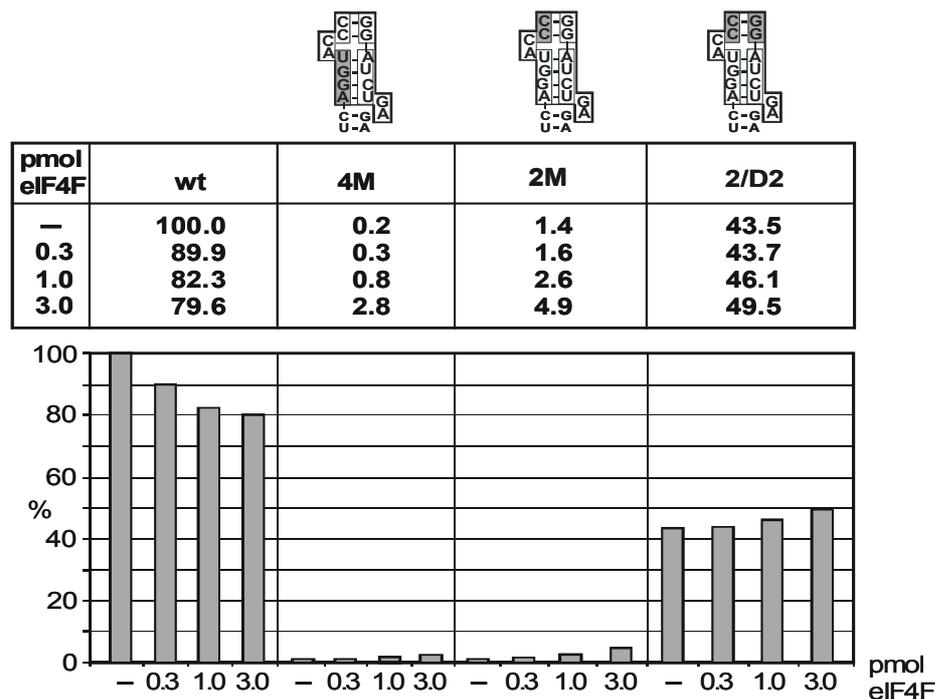


Abbildung 15: *In vitro*-Translation ausgewählter Mutanten bei Zugabe steigender Mengen eIF4F.

eIF4F setzt sich aus den eukaryotischen Initiationsfaktoren 4A, 4E und 4G zusammen. Zur potentiellen Steigerung der Translationsaktivität wurde ein Standard-Translationsansatz bei steigenden Mengen (wie oben angezeigt) von gereinigtem eIF4F (dankend erhalten von Adri Thomas) durchgeführt.

In der Tabelle sind die Aktivitäten in Prozent in Bezug auf den Wildtyp (WT ohne eIF4F = 100%) dargestellt. Zur besseren Übersicht sind die Mutationen innerhalb der konservierten Region grau unterlegt.

wt = Wildtyp

Die Ergebnisse dieser Untersuchung haben gezeigt, dass durch die eingebrachten Mutationen die Affinität von eIF4G zu den FMDV-Mutanten-IRES-RNAs verloren geht und durch Erhöhung der Konzentration dieses Faktors auch nicht zu kompensieren ist.

2.1.10 Einfluss von eIF4F auf die Bindung der endogenen Initiationsfaktoren 4G und 4B an die FMDV-IRES-RNA

Analog zu den Translationsexperimenten wurden die gleichen Rekonstitutions-Experimente im UV-Crosslink unter Hochsalzbedingungen mit radioaktiv markierten IRES-RNAs derselben Mutanten beziehungsweise dem Wildtyp (2.1.8) durchgeführt.

Abbildung 16 zeigt, dass bei steigender Konzentrationen von eIF4F die Bindung von eIF4G wie auch des p50-Proteins an die Wildtyp-IRES-RNA abnimmt. Dem gegenüber scheint die Bindung von eIF4B und eines Polypeptids von 170 kDa (Pfeil) stimuliert zu werden (Spuren 3 und 4). Das 170 kDa-Protein ist anderen Experimenten im Labor Niepmann zufolge mit hoher Wahrscheinlichkeit die p170-Untereinheit des Initiationsfaktors eIF3 (Lopez de Quinto *et al.*, 2001; Saleh Dissertation).

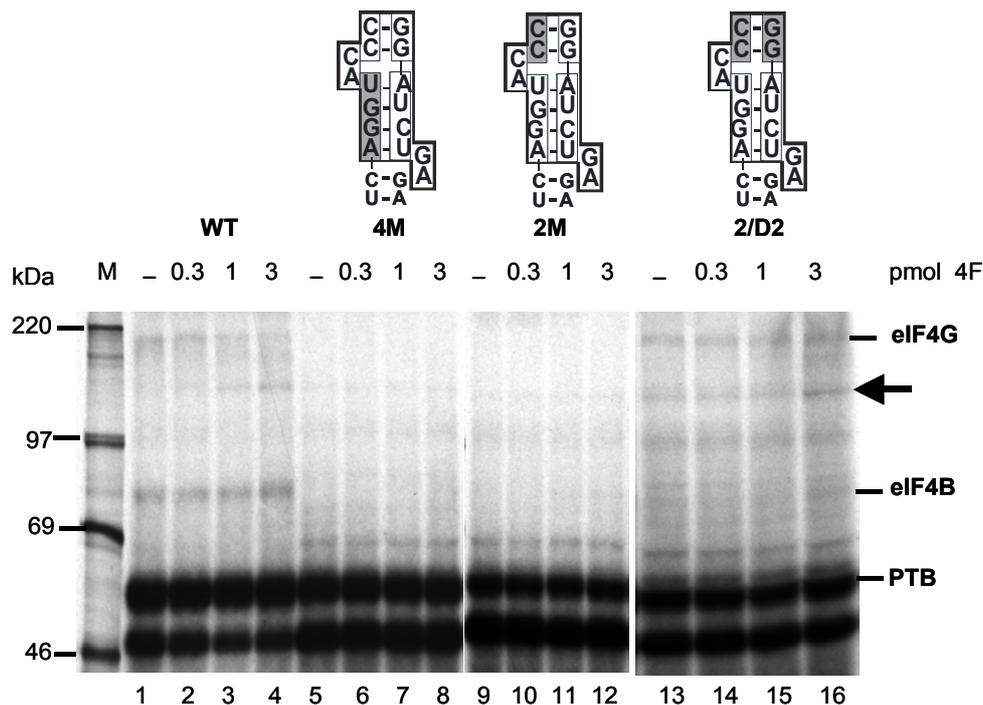


Abbildung 16: Bindung von eIF4G an ausgesuchte Mutanten-IRES-RNAs bei Zugabe steigender Mengen eIF4F. In einem Standard-Crosslink-Ansatz wurden radioaktiv markierte Wildtyp- beziehungsweise Mutanten-IRES-RNAs bei steigenden Mengen an gereinigtem eIF4F wie oben angezeigt in RRL inkubiert und die Proteine auf einem SDS - 8% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. WT = Wildtyp

Die Bindung von eIF4G an die miss-match-Mutanten 4M und 2M kann durch die Zugabe von eIF4F nicht sichtbar beeinflusst werden (Spuren 5 – 12). Die Affinität von eIF4G zur IRES-RNA

der Dinukleotid-Revertante 2/D2 wird im Gegensatz zur Wildtyp-RNA etwas erhöht, was sich durch ein intensiveres Bindungssignal zeigt (Spuren 13 bis 16). Wie in den Ansätzen mit der Wildtyp-IRES (Spuren 1 – 4) wird auch bei dieser Mutante die Affinitäten von eIF4B und des durch den Pfeil gekennzeichneten Proteins p170 stimuliert. Die hier erhaltenen Resultate bestätigen die Daten aus den Translationsexperimenten (2.1.8) und unterstützen die dort aufgestellte Theorie, dass die in das konservierte Sequenzelement eingebrachten Mutationen zu einem Verlust der Bindung von eIF4G führen.

2.1.11 Crosslink – Analyse alternativer Mutation der gepaarten Dinukleotide

Analog zu den oben beschriebenen Mutationen dieser Nukleotide, die aus dem Austausch von Cytosin nach Guanin und umgekehrt bestehen, wurden die Basen CC beziehungsweise GG gegen die Basenfolge AT ausgetauscht, um das Bindungsverhalten der eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren weiter zu analysieren. Abbildung 11 stellt die Untersuchungsergebnisse bei Niedrigsalzbedingungen (50 mM KCl; A) und bei Hochsalzbedingungen (120 mM KCl; B) dar.

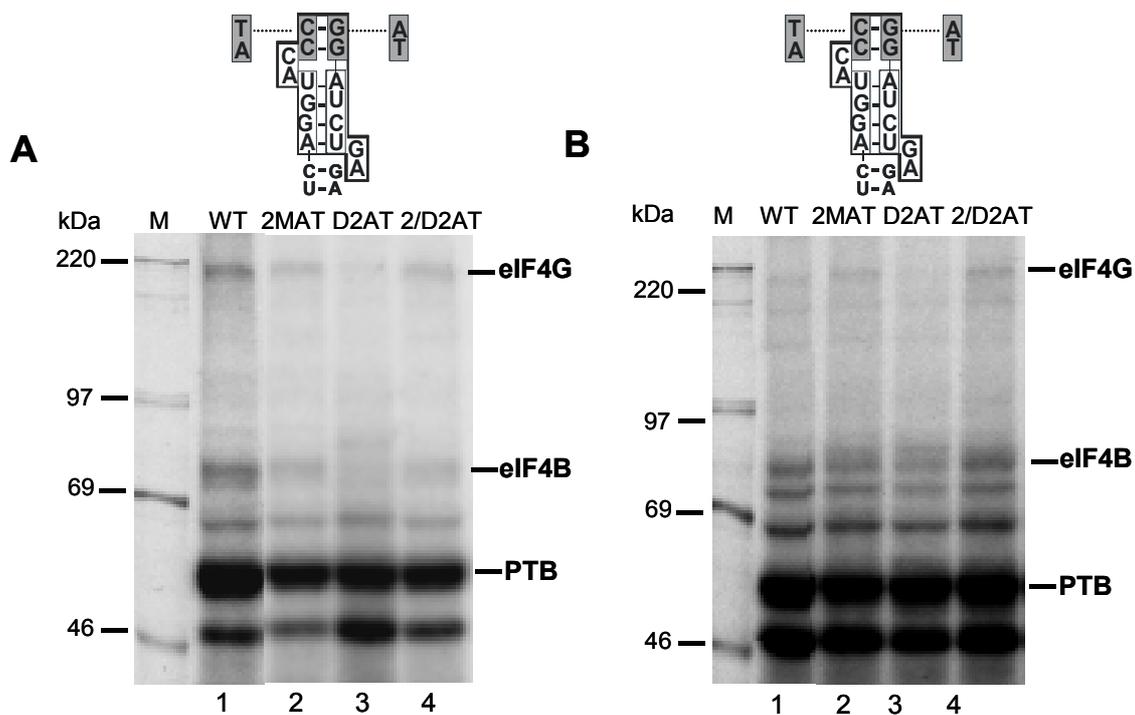


Abbildung 17: Bindung von eIF4G an die AT-IRES-Mutanten der gepaarten Dinukleotide. Im Bereich der gepaarten Dinukleotide wurden mittels PCR die beiden Cytosine im aufsteigend Ast beziehungsweise die beiden Guanine im absteigenden Ast des „Stem-Loops“ 4 – 1 gegen Adenin und Thymin ausgetauscht und ebenfalls die entsprechende Revertante generiert. Die radioaktiv markierten *in vitro*-Transkripte wurden in einem Standard-Crosslink-Ansatz ohne (A) und bei Zugabe von KCl (Endkonz. 120 mM) (B) auf die Bindung von eIF4G getestet. Als Matrize diente der mit Sma I linearisierte Vektor pSP449 beziehungsweise dessen Derivate. Die molaren Massen der ¹⁴C markierten Markerproteine und die Positionen von eIF4G, eIF4B und PTB sind angegeben. Zur besseren Übersicht sind die Mutationen innerhalb der konservierten Region grau unterlegt. WT = Wildtyp

Unter beiden Salzbedingungen ist zu erkennen, dass eIF4G und eIF4B an die IRES-RNA aller Mutanten binden. Vergleicht man in beiden Abbildungen die Intensität dieser Banden mit den jeweiligen eIF4G-Signalen in Spur 1 (Wildtyp), so scheint die Erhöhung der Kaliumchlorid-Konzentration keinen reduzierenden Einfluss auf die eIF4G Bindung zu haben. Sie führt aber, wie auch in Abbildung 12 zu sehen, zu einem homogeneren Bindungsmuster der p50-Banden. Des Weiteren treten mehrere Banden bei Molekulargewichten von ca. 63, 75, 110 und 170 kDa (Abb. 17B) deutlicher hervor. Im Kontrast zu den „C-G“- Mutanten (Abb. 13) zeigen eIF4G und eIF4B die niedrigste Affinität zu der IRES-RNA der D2AT-Mutante (Abb.17). An die IRES-RNA der Mutante 2/D2AT binden die eIFs nur geringfügig stärker als an die IRES-RNA der 2MAT-Mutante. Es ist bekannt, dass in einer RNA Guanin sowohl mit Uracil als auch mit Adenin Basenpaarungen eingehen kann, was in diesem Fall anzunehmen ist. Die geringe Bindung von eIF4G an die D2AT-IRES-RNA ist folglich auf das Unvermögen des Cytosins zurückzuführen, eine solche Basenpaarung einzugehen.

2.1.12 *In vitro*- und *in vivo*-Translationsdaten korrelieren mit den Resultate der Bindungsstudien mit den AT-Mutanten

Die IRES-Aktivität dieser Mutanten wurde mit einer *in vitro*-Translation bei 120 mM KCl (A) und einer *in vivo*-Translation (B) getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. In Abbildung 18A ist zu erkennen, dass die Produkte der IRES-abhängigen Translation (LUZ) der Mutanten-RNAs bis auf Spur 3 (Mutante D2AT) in annähernd gleichen Mengen gebildet werden wie mit der Wildtyp-RNA. Zu den gleichen Ergebnissen führt auch die Analyse der *in vivo* erhaltenen Luziferase-Aktivität (18B). Im Gegensatz zur Mutante D2AT, die eine Luziferase-Aktivität von etwa 30% aufweist, wird das Luziferase-Gen der Mutante 2/D2AT im gleichen Maße exprimiert wie das des Wildtyps (siehe Abb. 18B). Obwohl die Stem-Loop-Struktur der 2MAT-Mutanten-IRES-RNA gestört sein sollte, zeigt auch diese keine verminderte Luziferase-Aktivität an. Dieses wäre ein Beispiel für eine „stille Mutation“ auf der Ebene der Sekundärstruktur.

Wie schon im Abschnitt 2.1.12 vermutet, sind die Translationsergebnisse aller Wahrscheinlichkeit nach das Resultat der außergewöhnlichen Basenpaarungen von Guanin mit Uracil und/ oder Adenin beziehungsweise die Unfähigkeit der Cytosine zu solch einer Paarung.

2.1.13 Der C-terminale Teil von eIF4G hat einen stimulierenden Effekt auf die Translation der Mutanten-IRES-RNA

Die L-Protease des FMD-Virus spaltet bei einer Infektion der Wirtszelle, den Initiationsfaktor eIF4G, so dass das Cap-erkennende Protein eIF4E, das im N-terminalen Bereich von eIF4G bindet, abgetrennt wird und somit die Cap-Erkennung nicht zustande kommt. Dadurch kommt die zelluläre Translation zum Erliegen, und nur Gene mit IRES-Elementen werden translatiert. Daher war es von Interesse, ob dieser Umstand einen Einfluss auf die Translation der Mutanten-IRES-RNAs hat. Hierzu wurden *in vitro*-Translationen unter Hochsalzbedingungen von ausgesuchten Mutanten-IRES-RNAs beziehungsweise der Wildtyp-IRES-RNA im mit L-Protease behandeltem RRL durchgeführt. Abbildung 19 zeigt eine Gegenüberstellung dieser Resultate mit Translationsergebnissen derselben RNAs, die in unbehandeltem RRL translatiert wurden.

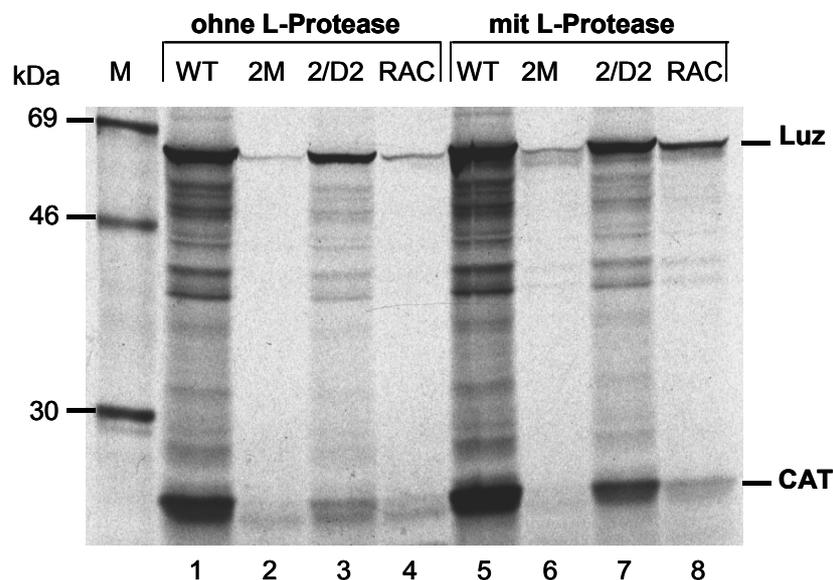


Abbildung 13: *In vitro*-Translation mit dem C-terminalen Fragment von eIF4G Die L-Protease des FMD-Virus spaltet eIF4G an der Aminosäureposition 634. So entsteht ein N – terminales Fragment von 634 AS und ein C – terminales Fragment von 926 AS, welches für die Cap – unabhängige Translation von Bedeutung ist.

50 μ l RRL wurden mit 0.8 nmol RNA, die für die L – Protease codiert, für eine halbe Stunde bei 30°C vorinkubiert. In diesem Lysat wurden Standard –Translationsansätze mit ausgesuchten FMDV-IRES-Mutanten-RNAs beziehungsweise Wildtyp-RNA bei einer Kalium– Endkonzentration von 120 mM und in Anwesenheit von 35 S-Methionin durchgeführt (Spuren 5 – 8). Parallel wurden diese Ansätze in unbehandeltem RRL durchgeführt (Spuren 1 – 4) und die Proteine auf ein SDS – 12% Polyacrylamid-Gel geladen. Die molaren Massen der 14 C markierten Markerproteine und die Positionen der radioaktiv markierten Translationsprodukte (Luziferase und CAT) sind angegeben.

Es wurden IRES-Mutanten ausgewählt, die eine reduzierte Translation aufweisen (2M, RAC) und die Revertante der gepaarten Dinukleotide 2/D2, bei der eine Teilrekonstitution der Wildtyp-IRES-Aktivität gefunden wurde. Bei allen eingesetzten IRES-RNAs wird die Translationseffizienz durch

das C-terminale Ende von eIF4G um einen Faktor zwei (Wildtyp, 2M, 2/D2) beziehungsweise ein Faktor drei bis vier (RAC) gesteigert.

Es ist anzunehmen, dass durch das Fehlen des N-terminalen Endes von eIF4G, welches ein Drittel des Gesamtproteins ausmacht, die sterische Anordnung der Aminosäuren zu den RNA-Nukleotiden in den verwendeten Mutanten-IRES-RNAs und auch in der Wildtyp-IRES-RNA so verbessert werden kann, dass die reduzierte Bindung an das konservierte Sequenzelement durch andere Bindungsstellen zum Teil kompensiert werden kann.

2.1.14 Das „Ribosomescanning“ wird durch die Mutationen in der konservierten Region beeinflusst

Die Bindung von eIF4G ist die Voraussetzung dafür, dass sich der 43S Präinitiationskomplex, bestehend aus dem ternären Komplex (eIF2, GTP, Met-tRNA), der 40S ribosomalen Untereinheit und den eIFs 1, 1A und 3, an die FMDV-IRES anlagert. Dabei wird der ribosomale Prä-Initiationskomplex in das sogenannte Startfenster (Pilipenko *et al.*, 1994, Kaminski *et al.*, 1994) platziert, in dem sich das 11. AUG des FMDV-Genoms befindet, und kann dann gegebenenfalls von dort an der RNA entlang zum 12. AUG gleiten, das 84 Nukleotide weiter stromabwärts auf der viralen lokalisiert ist. Je nach Wahl des Startkodons werden zwei Formen der L-Protease translatiert, die sich jedoch anscheinend in ihrer Aktivität nicht unterscheiden. In der Regel wird bei der Translation des FMDV-Genoms das 12. AUG als Startcodon bevorzugt (Sangar *et al.*, 1987). Bisher ist unklar, warum dies so ist, aber es ist essentiell, da eine Deletion dieses 12. AUGs im Kontext des FMDV-Genoms die Vermehrung der Viren unterbindet (Cao *et al.*, 1994). Weiterhin ist auch nicht bekannt, ob und welche Rolle das 11. AUG bei der Expression spielt.

Ursprünglich sollte mit diesem Experiment untersucht werden, ob steigende Mengen RNA das Translationsdefizit mancher IRES-Mutanten ausgleichen können. Bei vorläufigen Experimenten war allerdings schon zu beobachten, dass mit steigenden RNA-Mengen die Wahl des Startcodons beeinflusst wurde (Daten nicht gezeigt). Hierzu wurden weitere Translationsversuche mit verschiedenen Mengen Wildtyp-IRES- beziehungsweise Mutanten-IRES-RNAs wie in der Legende beschrieben durchgeführt (Abb.20). Um die Translationsprodukte, die ab dem 11. beziehungsweise ab dem 12. AUG synthetisiert wurden, zu unterscheiden wurde das Luziferasegen um 314 Nukleotide gekürzt. Die Expositionszeiten der Ansätze mit den IRES-Mutanten 4M, 2M und RAC mussten verlängert werden, wie an den Markerspuren zu erkennen ist, um eine bessere Darstellung der Translationsergebnisse zu erhalten.

Die Steigerung der Transkriptmenge führt beim Wildtyp und den Mutanten der gepaarten Dinukleotide (2M, D2, 2/D2) zunächst zu einer erhöhten IRES-Aktivität, führt dann aber im weiteren Verlauf zu einer Reduzierung. Die sehr niedrigen IRES-Aktivitäten der Mutanten 4M und RAC lassen sich zwar bis zu einem gewissen Grad steigern, zeigen aber keine Reduzierung.

Bei diesen Experimenten wurde die interessante Beobachtung gemacht, dass eine Erhöhung der Transkriptmengen zu einer Verlagerung des Translationsstartes führt, mit Ausnahme der IRES-Mutante RAC. Der Wechsel vom 12. zum 11. AUG setzt bei den hier getesteten IRES-RNAs bei etwas unterschiedlichen RNA-Konzentrationen ein und endet auch bei verschiedenen Mengen der

eingesetzten RNAs. Zu dieser Beobachtung sind die Ergebnisse der Abbildung 20 in der tabellarisch dargestellt.

	WT	4M	2M	D2	2/D2	RAC
Spur 1 (60 ng)	12. AUG	11. AUG				
Spur 2 (125 ng)	12. AUG	12. → 11.	12. → 11.	12. AUG	12. AUG	11. AUG
Spur 3 (250 ng)	12. → 11.	12. → 11.	Parität	12. → 11.	12. → 11.	11. AUG
Spur 4 (500 ng)	Parität	Parität	12. → 11.	Parität	12. → 11.	11. AUG
Spur 5 (750 ng)	12. → 11.	12. → 11.	12. → 11.	12. → 11.	Parität	11. AUG
Spur 6 (1000 ng)	11. AUG	12. → 11.	12. → 11.	12. → 11.	Parität	11. AUG
Spur 7 (1250 ng)	11. AUG	12. → 11.	11. AUG	12. → 11.	Parität	11. AUG
Spur 8 (1500 ng)	n.d.	12. → 11.	11. AUG	n.d.	12. → 11.	11. AUG

Tabelle 4: Verlagerung des Translationsstartes der untersuchten Wildtyp-IRES beziehungsweise Mutanten-IRES-RNAs, in Abhängigkeit von der eingesetzten Transkriptmenge.

12. → 11.: Wechsel vom 12. AUG zum 11. AUG, wobei die fettgedruckte Nummer das bevorzugte Startcodon repräsentiert; **12.** → **11.**: Wechsel vom 12. AUG zum 11. AUG, wobei die fettgedruckte Nummer das bevorzugte Startcodon repräsentiert; Parität: Keine Bevorzugung eines der beiden Startcodons; n.d.: nicht bestimmt.

Im Rahmen dieser Untersuchung weichen die beobachteten Ergebnisse mit der IRES-Mutante RAC gänzlich ab vom Gesamtbild, da in der Translation mit dieser IRES-RNA nur das 11. AUG als Translationsstart genutzt wird. Den verbleibenden IRES-Mutanten ist mit dem Wildtyp gemein, dass sie bei einer niedrigen RNA-Menge nur das 12. AUG zum Translationsstart benutzen. Der Wechsel vom 12. zum 11. AUG zeigt sich schon bei 125 ng (4M und 2M) und ist noch bei der 2/D2-IRES-Mutante bei 500 ng zu detektieren. Die Parität wird bei einer distinkten RNA-Menge um 500 ng (+/- 250 ng) erreicht. Eine Ausnahme findet man bei der Revertante 2/D2, deren Parität über drei RNA-Konzentrationen besteht. Bis auf den Wildtyp und die IRES-Mutante 2M findet kein abgeschlossener Wechsel vom 12. AUG zum 11. AUG statt. In Spur 8 der IRES-Mutante D2 wird die Translation soweit reduziert, dass keine Produktbanden mehr zu detektieren sind.

Bei der Cap-abhängigen Translation ist bekannt, dass die eukaryotischen Initiationsfaktoren 1 und 1A, der auch eine RRM-Domäne aufweist, zur Lokalisation des Startcodons benötigt werden (Pestova *et al.*, 1998). Diese Faktoren sind in der Regel mit der 40S-Untereinheit der Ribosomen assoziiert und kommen nur in geringen Konzentrationen im Cytosol vor (siehe auch Tabelle 5). Da die Ribosomen natürlich von der FMD-Virus-RNA zur Translation rekrutiert werden müssen, lässt sich annehmen, dass eIF1 und eIF1a diese Aufgabe auch bei der IRES-vermittelten Translation eine Rolle bei der Lokalisation insbesondere des 12., durch Scanning erreichten Startcodons spielt. Die Tatsache, dass ihr Vorkommen im RRL limitiert ist (Thomas *et al.*, 1979), spricht dafür, dass diese Faktoren möglicherweise bei einer Erhöhung der RNA-Menge austitriert werden, was so zu einem Wechsel des Translationsstartes vom 11. zum 12. AUG führen würde, da das 11. AUG durch direkte Platzierung des Ribosoms in das Startfenster erreicht wird. Es ist anzunehmen, dass die Platzierung des Ribosoms unabhängig von der Anwesenheit von eIF1 und eIF1A ist, während zum Erreichen des 12. AUGs durch Scanning diese Faktoren benötigt werden.

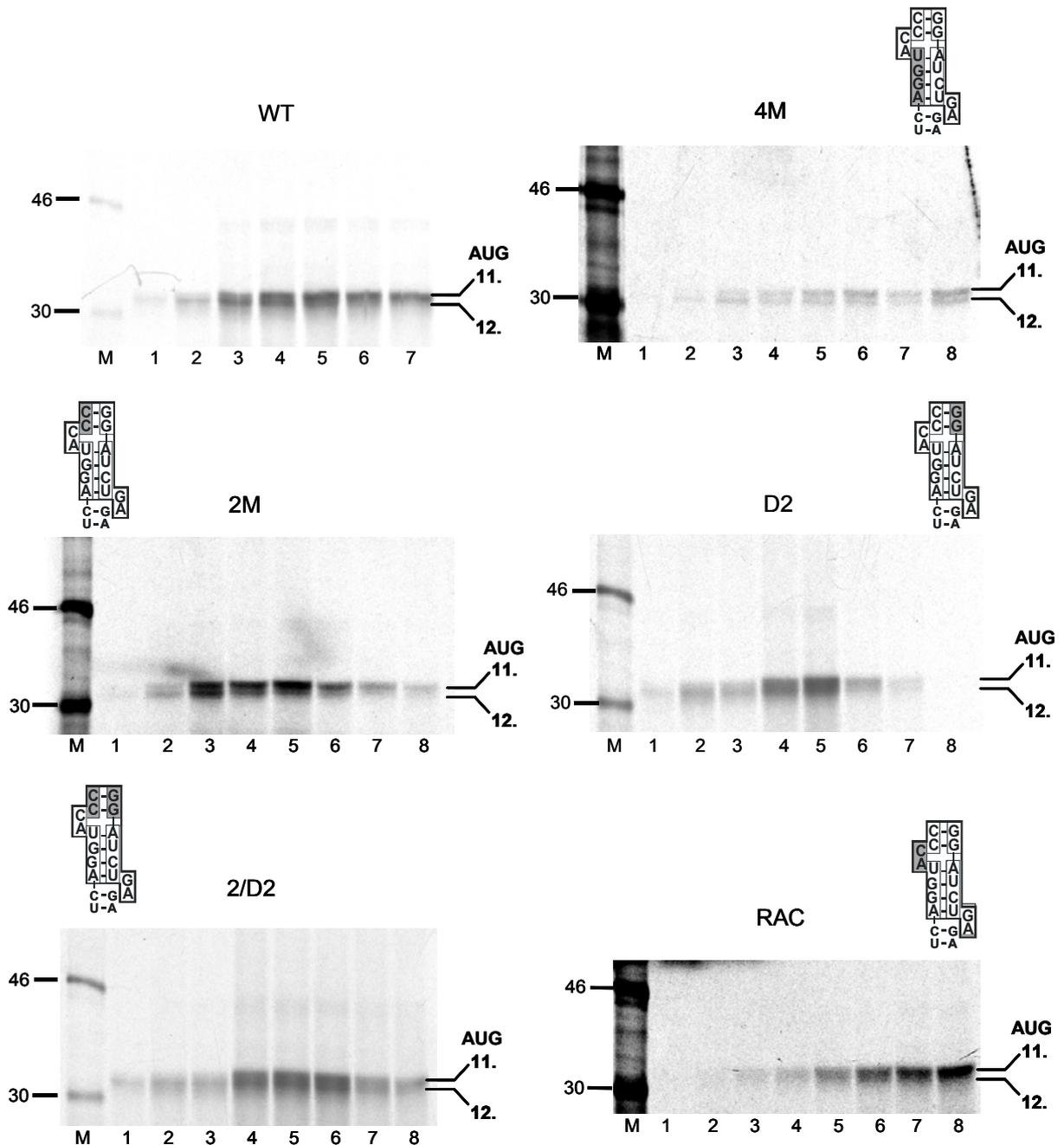


Abbildung 20: *In vitro* Translation mit verschiedenen Mengen von FMDV-IRES-Mutanten-RNA. Als Matrize für die *in vitro* Transkripte diente das Plasmid pM13x. Diese beinhaltet das FMDV-IRES-Element, an dessen 3'-Ende sich das 11. und 12. AUG anschließen. Das 12. AUG dient als Startcodon für das anfusionierte Luziferase-Gen. Zwischen den beiden Startcodons liegen 81 Nukleotide, so dass das Translationsprodukt des 11. AUGs zusätzlich 27 AS am N-terminalen Ende aufweist. Zur besseren Trennung der beiden Produkte wurde die Matrize mit EcoRV linearisiert und damit das Reporter-Gen am 3'-Ende um ca. 300 Nukleotide verkürzt. Die Ansätze wurden bei einer KCl-Endkonzentration von 120 mM und mit folgenden RNA Mengen durchgeführt: Spur 1: 60 ng, 2: 125 ng, 3: 250 ng, 4: 500 ng, 5: 750 ng, 6: 1000 ng, 7: 1250 ng, 8: 1500 ng. Die Translationsprodukte wurden auf ein SDS-15%-Acrylamid-Gel aufgetrennt. Die Probe in Spur 7 der Mutante 4M ist ausgefallen.

2.1.15 Diskussion zu Teil I

Synthese von RNAs durch *in vitro*-Transkription

Eine qualitativ gute RNA ist die Voraussetzung für die unten beschriebenen Analysen. Die Durchführung der RNA-Synthese ist theoretisch ein relativ einfacher Vorgang. Bei Verwendung von sterilen beziehungsweise autoklavierten Materialien und bei sauberem Arbeiten sollte man in der Regel eine qualitativ gute RNA erhalten. Die Problematik, die hierbei auftritt, ist die Kontrolle der Güte der synthetisierten RNA. Die Synthese an sich lässt sich gut visuell auf einem Agarosegel kontrollieren. Diese Methoden sagen aber nichts über die korrekte Ausbildung der in dieser Arbeit wichtigen Sekundärstruktur aus. So kann es vorkommen, dass RNAs, die auf einem Agarosegel eine klare und scharfe Bande zeigen, im Crosslink beziehungsweise in der Translation von schon bekannten Ergebnissen stark abweichende oder gar keine Resultate liefern. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt.

Aus Erfahrungswerten ist zu vermuten (persönliche Mitteilung von M. Niepmann), dass eine Ursache für Probleme bei der *in vitro*-Transkription in der Verwendung von zu lange gelagerten Matrizen-DNAs liegt, oder dass die Matrizen aus Plasmidpräparation erstellt wurden, die lange gelagert wurden. Vermutlich unterliegen Plasmid-DNAs, trotz Lagerung bei niedrigen Temperaturen (-20 – -40°C) einem Veränderungsprozess. Diese Beobachtung sollte bei der Durchführung von qualitativen und quantitativen Untersuchungen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, in jedem Fall berücksichtigt werden, um eine Verfälschung der Ergebnisse so gering wie möglich zu halten. Es sollte also möglichst frische präparative Plasmid-DNA als Matrize für die *in vitro* Transkription und Translation verwendet werden.

Der UV-Crosslink – die Methode der Wahl

Die kovalente Bindung eines Protein-Moleküls an ein RNA-Molekül im UV-Crosslink-Assay ist ein statistisches Ereignis. Zunächst muss sich das Protein an die RNA-Struktur so anlagern, dass die Reaktionspartner (Aminosäurereste und Pyrimidine) sich in räumliche Nähe zueinander befinden. Dann müssen Photonen auf die Pyrimidine treffen und so freie Radikale entstehen lassen, damit eine kovalente Bindung zustande kommen kann. Dabei ist die Intensität des Photonenflusses, der auf den Reaktionsansatz trifft, abhängig von der Stärke der Strahlungsquelle und ihrem Abstand zum Reaktionsansatz. Dies sind in der Regel etablierte Parameter, so dass die Dauer der Bestrahlung von Bedeutung wird. Je länger die Bestrahlung bei gleichzeitiger Inkubation durchgeführt wird, desto wahrscheinlicher wird es, dass richtig positionierte Proteine an die RNA-Moleküle gekoppelt werden und aus dem Reaktionsgleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation der RNA-Protein-Komplexes entfernt werden, bis theoretisch alle freien Proteine kovalent an RNA gebunden sind (Rust, Diplomarbeit). Die Dauer der Bestrahlung kann, abhängig

vom RNase-Gehalt des Lysates, zwischen 10 – 30 Minuten variiert werden. Bei einer relativ kurzen Inkubationszeit der Bindereaktion zwischen Proteinen und RNA lassen sich auch Proteinextrakte gut untersuchen, die einen bestimmten Anteil an RNasen enthalten. Da die meisten RNA-bindenden Proteine relativ schnell an die RNA binden, ist durch die gleichzeitige oder anschließende UV-Bestrahlung ein Angriff von RNasen auf die eingesetzte RNA nicht mehr von Bedeutung, da deren an die Proteine gebundenen Bereiche vor den RNasen geschützt sind. Ein weiterer Vorteil ist die Empfindlichkeit dieser Methode, deren Nachweisgrenze sich im femtomolaren Bereich befindet.

Der Aspekt der sterischen Anordnung des RNA/Protein-Komplexes ist von großer Bedeutung und macht in dieser Arbeit den UV-Crosslink zu der Methode der Wahl für die Untersuchung der Bindung von eIF4G an die FMDV-Mutanten-IRES-RNA, da diese die Sekundärstruktur der FMDV-IRES und somit auch die räumlichen Bedingungen für eine RNA-Protein-Interaktion verändern. Dies führt natürlich auch zu einem Verlust der Bindung von eIF4G an die getesteten Mutanten-IRES-RNAs.

Der Faktor eIF4G kommt in der Zelle normalerweise im sogenannten eIF4F-Komplex, zusammen mit den Faktoren eIF4A und eIF4E vor. eIF4F ist einer der limitierten Faktoren in diesem System und wirkt nach der Bindung an die gecappte RNA synergistisch mit den Faktoren eIF4B und eIF3 durch Protein/Protein-Interaktionen an der Translationsinitiation mit. Es ist bekannt, dass eIF4B und eIF3 überwiegend an den Ribosomen lokalisiert sind und nicht frei im Cytoplasma vorliegen (Thomas *et al.*, 1979). Für eIF4G beziehungsweise eIF4F liegen solche Erkenntnisse nicht vor, es sind aber Mengenangaben aus der Literatur bekannt (siehe Tabelle 5), die mit Präparationen von gewaschenen Ribosomen erhalten wurden. Daraus kann geschlossen werden, dass eIF4G beziehungsweise eIF4F in einem nicht genau definierbaren „steady state“-Gleichgewicht an den Ribosomen und der zellulären mRNA gebunden vorkommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde Kaninchen-Retikulozyten-Lysat als Proteinquelle zur Durchführung der Crosslinks benutzt, um das Bindungsverhalten von eIF4G und anderer Faktoren an die FMDV-IRES zu untersuchen. Das von der Firma Promega bezogene Lysat wird als zellfreies Translationssystem angeboten und stellt eine Momentaufnahme des Zustandes der verarbeiteten Zellen dar. Es ist mit *micrococcus*-Nuklease behandelt, welche die zellulären mRNAs verdaut. Dadurch liegt der Faktor eIF4G beziehungsweise eIF4F, der zuvor an die mRNA gebunden war, frei im Cytoplasma vor. Für die Analyse der Bindung von eIF4G bedeutet das, dass wir nur eine Subpopulation an eIF4G betrachten können, dessen Menge im Lysat von Präparation zu Präparation unterschiedlich sein, was sich damit auch auf die Ergebnisse der Untersuchungen auswirken kann. Durch mehrmaliges Auftauen und wieder Einfrieren des Lysates wird zu dem eIF4G schnell degradiert, da es sehr sensitiv auf diese Prozesse und auf Temperaturänderungen reagiert. Dadurch wird die geringe Abundanz von eIF4G noch weiter reduziert. Diese Tatsache und die relativ niedrige Effizienz der Übertragung der radioaktiver Markierung im UV-Crosslink müssen bei der Interpretation der erhaltenen Daten berücksichtigt werden.

Im Bezug auf die gestellte Aufgabe wäre die Untersuchung der Thematik mit der „Western-Blot“-Analyse in diesem Falle die falsche Wahl, da hierbei nicht die Interaktion der RNA-bindenden Proteine mit einer RNA detektiert wird, sondern sämtliche im Extrakt vorhandenen Proteine, also auch die, die nicht an RNA gebunden sind, mit Antikörpern nachgewiesen werden.

Auch eine „North-Western-Blot“-Analyse ist zur Untersuchung des konservierten Sequenz-elementes aus mehreren Gründen schwierig. Abgesehen von den zusätzlichen Arbeitsschritten, durch die einige empfindlichen Proteine wie eIF4G, wie oben schon angemerkt, in Mitleidenschaft gezogen werden könnten, ist der Grad der Renaturierung der transferierten Proteine nicht zu kontrollieren, so dass der Verlust einer Bindungsaffinität nicht unbedingt auf die eingebrachte Mutation zurückzuführen ist. Das Haupthindernis ist aber, dass hier nicht mit gereinigten Faktoren gearbeitet wurde, sondern die Proteine aus einem Zell-Lysat stammen. Bei der Hybridisierung mit der radioaktiv markierten IRES-RNA würden auch viele unspezifische RNA/Protein-Wechselwirkungen detektiert werden, die vermutlich die spezifischen Bindungssignale der eukaryotischen Initiationsfaktoren überlagern würden, so dass diese nicht mehr zu analysieren wären. Das gleiche gilt auch für eine Analyse mit dem „Bandshift“-Assay (EMSA, „electrophoretic mobility shift assay“), in dem sich Proteine, die schwach an die eingesetzte RNA binden, in Anwesenheit anderer stark an die RNA bindenden Proteine nicht nachweisen lassen.

Vor- und Nachteile der verwendeten Translationssysteme

Der eukaryotische Translationsmechanismus ist im Bezug auf die Beschaffenheit der zu translatierenden RNA so unspezifisch, dass er ein offenes Leseraster auf nahezu jeder RNA, die die Voraussetzung für eine Translationsinitiation erfüllt und ein Startcodon aufweist, in eine Aminosäuresequenz übersetzt, unabhängig von der Herkunft der RNA. Des Weiteren kann der Vorgang der Translation unabhängig von einer intakten Zelle für Untersuchungen genutzt werden. Diese Umstand ermöglicht es, Produkte vermeintlicher Gene, den Charakter von Nukleotidsequenzen, wie zum Beispiel repetitive Elemente, die Translation und ihre Initiation, oder, wie in dieser Arbeit durchgeführt, die Aktivität einer veränderten FMDV-IRES, zu analysieren. So lassen sich auch Proteine untersuchen, die auf eine intakte Zelle toxisch wirken können.

Das Retikulozyten-Lysat ist vom Hersteller Promega nach Pelham & Jackson (1976) präpariert und an Hand von verschiedenen mRNA-Expressionen so eingestellt, dass die meisten zellulären mRNAs mit guter Effizienz translatiert werden können. Es ist bekannt, dass die Translation von zellulären mRNAs in intakten Zellen unter stark kompetitiven Bedingungen ablaufen (Carrasco & Smith, 1976; Alonso & Carrasco, 1981; Niepmann, 2003). Daher bietet das Retikulozyten-Lysat optimale Bedingungen für die Translation von vielen RNAs. Weitere Vorteile bestehen darin, dass das Lysat fast keine RNasen enthält und dass die experimentellen Bedingungen durch zum Beispiel Erhöhung von Salzkonzentrationen, oder Zugabe von rekombinanten beziehungsweise nativen Proteinen individuell verändert werden können.

Zu dem Befund, dass es möglich ist, in Retikulozyten-Lysat RNAs zu translatieren, ohne dass diese posttranskriptional modifiziert werden, wurde von Svitkin und Mitarbeitern folgendes Model

aufgestellt: Alle eukaryotischen Zellen enthalten RNA-bindende Proteine, wie zum Beispiel hnRNP A1, La Autoantigen, PTB und/oder das Core-Protein des cytoplasmatischen mRNP (p50), in unterschiedlichen Konzentrationen und in der gesamten Zelle vorkommend. Solche RNA-bindenden Proteine lagern sich sequenzspezifisch entlang einer mRNA an und verhindern so, dass sich Ribosomen an „unechte“ ribosomale Bindungsstellen in der mRNA anlagern. Durch die Proteine des Initiationskomplexes, wie eIF4F und eIF4B, werden die RNA-bindenden Proteine, die die RNA in unmittelbarer Nähe zum Cap besetzt halten, verdrängt und die ribosomale 40S Untereinheit kann auf der RNA platziert werden und ihr „scanning“, also die Suche nach dem nächstgelegenen Startcodon beginnen. Es ist eine schlüssige Annahme, dass eine Translationsinitiation bei ungecappten RNAs unter diesen Bedingungen nicht statt findet. Im Vergleich zu Lysaten aus nukleären Zellen sind die Konzentrationen dieser RNA-bindenden Proteine Reticulozyten-Lysat deutlich geringer (Pestova *et al.*, 1991; Meerovich *et al.*, 1993), so dass eine RNA nur partiell von diesen Proteinen bedeckt ist und es den Ribosomen so ermöglicht wird sich an die RNA anzulagern und diese zu translatieren (Svitkin *et al.*, 1996). Dementsprechend ist bekannt, dass auch ungecappte RNAs in Reticulozyten-Lysat translatiert werden. (Svitkin *et al.*, 1996).

In den oben beschriebenen Vorteilen verbirgt sich aber auch der Nachteil dieses Systems. Da es so konzipiert ist, dass es vielen experimentellen Bedürfnissen Rechnung trägt, lassen sich natürliche Bedingungen, die für spezifische Vorgänge nötig sind, nur annähernd simulieren. Daher ist es angebracht, die erzielten Resultate, wenn möglich, durch *in vivo* Versuche zu bestätigen. Im Bezug auf die vorliegende Arbeit wird damit der Vorteil ausgenutzt, dass die translatierte RNA automatisch posttranskriptionel modifiziert wird, so dass alle Voraussetzungen für eine zelluläre Translation gegeben sind. Weiterhin ist es möglich durch die Wahl der Zelllinie naturnahe Resultate (zum Beispiel: Translationsinitiation von HCV in Leberzellen) zu erhalten. Bei *in vivo*-Experimenten ist zu beachten, dass die Transfektionseffizienz von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich gut ausfällt, so dass diese zuvor mit geeigneten Plasmid-DNAs getestet werden muss. Auch innerhalb eines Experiments mit mehreren Ansätzen kann die Effizienz der Transfektion variieren, was dann einen Einfluss auf die Ergebnisse hat.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass eine Kombination beider Translationssysteme die jeweiligen Nachteile kompensieren kann und somit eine fundierte Basis für Untersuchung ermöglicht.

2 Ergebnisse II

2.2 Untersuchung zur CAT-Expression im dicistronischen Kontext unter dem Einfluss von IRES-Mutanten und monovalenten Kationen

Ein dicistronischer Vektor ist ein genetisches Werkzeug, mit dem man die Expression zweier Reportergene untersuchen kann. Hierzu wurde die Sequenz eines IRES-Elementes, wie in Abbildung 21 zu sehen, zwischen zwei offene Leseraster (ORFs) eingebracht, so dass das erste Gen 5'-abhängig und das zweite Gen IRES-vermittelt translatiert wird. *In vivo* sollte das Transkript eines solchen Vektors die posttranskriptionalen Modifikationen einer normalen zellulären mRNA („Capping“, Polyadenylierung) durchlaufen und die Translation der beiden Reportergene durch zwei unterschiedliche und voneinander unabhängige Initiationsmechanismen stattfinden. In einem translationsfähigem Lysat (zum Beispiel: Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, RRL) wird auch das 5'-vermittelte Gen ohne Modifikationen translatiert (Svitkin *et al.*, 1996). Die Expressionsraten beider Gene werden dann zueinander ins Verhältnis gesetzt, um Variationen der IRES-vermittelten Expression auf einer konstanten Basis zu quantifizieren.

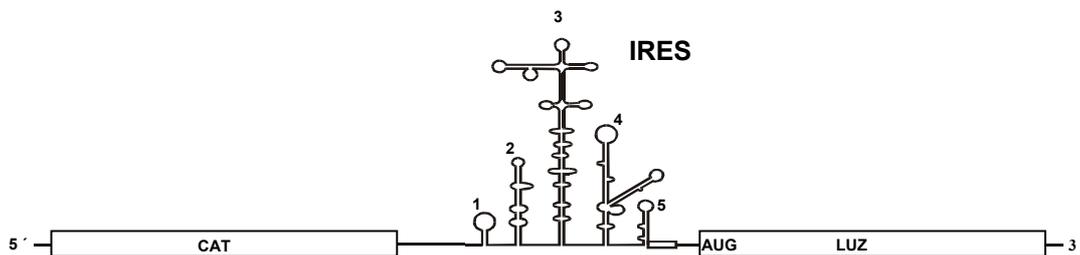


Abbildung 21: Schematische Darstellung eines dicistronischen Transkripts CAT: Chloramphenicol-Acetyltransferase, LUZ: Luziferase, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle

Das Thema dieser Arbeit war die Untersuchung des Typ II IRES-Elementes des FMD-Virus, das der hier verwendete dicistronische Vektor pD128 (Abb. 21) trägt. Wie im ersten Teil der Ergebnisse dargelegt, wurden in das IRES-Element Mutationen eingebracht und diese im UV-Crosslink-Assay und in der Translation getestet.

Neben den hierbei erhaltenen Resultaten wurde ein Einfluss der IRES-Aktivitäten auf die Expression des CAT-Reportergens festgestellt. Um mögliche Hinweise auf die Natur dieses Effektes zu bekommen, wurden für weitere Untersuchungen durchgeführt.

2.2.1 Die FMDV-Wildtyp-IRES erhält die Effizienz der 5'-abhängigen Translation bei steigender Salzkonzentration im dicistronischen Kontext

Zunächst sollte geklärt werden, welchen Einfluss verschiedene Salzkonzentrationen auf die 5'-abhängige Translation des CAT-Gens im monocistronischen Kontext haben. Das Transkript vom Plasmid pMCATpa synthetisiert, wurde bei verschiedenen Salzkonzentrationen in Translationsansätzen mit RRL getestet. Diese unmodifizierte RNA wird bis zu einer Konzentration von 100 mM KCl noch gut translatiert, wobei die optimale Salzkonzentration bei 75 mM KCl liegt (Abb. 22, Spuren 1 – 3). Bei physiologischen Kaliumkonzentrationen (120 mM) wird die Translation stark reduziert und findet bei 150 mM KCl nicht mehr statt (Spur 4 und 5).

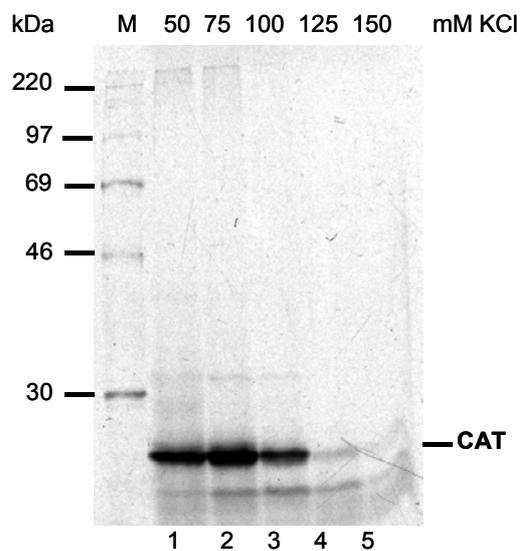


Abbildung 22: Untersuchung zur CAT-Expression bei verschiedenen Salzkonzentrationen im monocistronischen Kontext. In diesem Ansatz wurde in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin eine monocistronische mRNA bei verschiedenen Kaliumchlorid-Konzentrationen (wie oben angegeben) translatiert, die kein FMDV-IRES-Element enthält. Das Plasmid pMCATpa (SmaI linearisiert) wurde für die *in vitro*-Transkription benutzt.

Der nächste Untersuchungsschritt führte zum Ausschluss eines vermeintlichen Einflusses der Luziferasesequenz auf die CAT-Expression. Hierzu wurde der Vektor pD128, beziehungsweise ausgesuchte IRES-Mutanten, so linearisiert, dass die Matrize des CAT-Gens und noch das IRES-Element, aber nicht das Luziferase-Gen enthält (siehe auch Legende Abb.23).

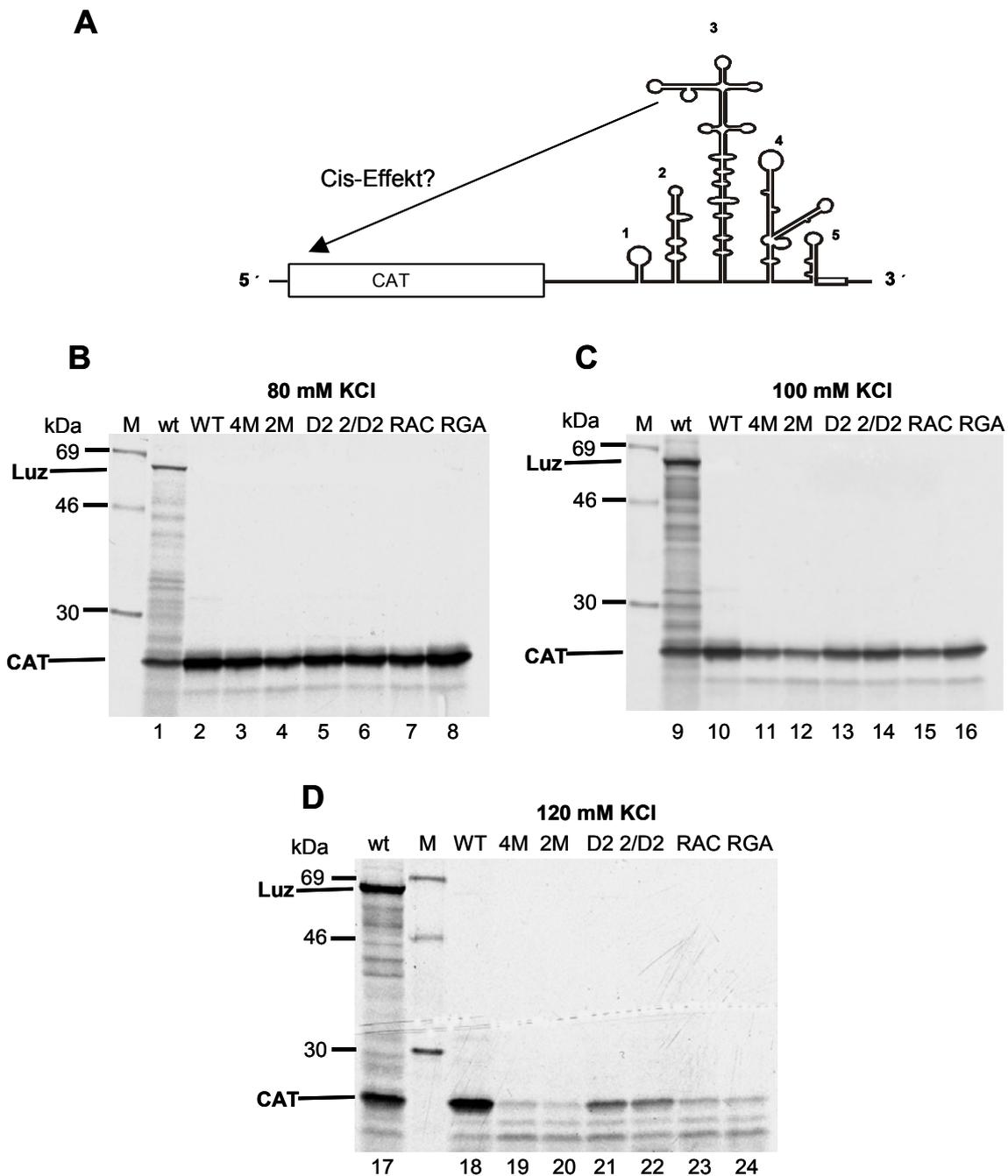


Abbildung 23: Einfluss des FMDV-IRES-Elements in „cis“ bei verschiedenen Salzkonzentrationen.

A: Schematische Darstellung des gekürzten monocistronischen Transkriptes. Als Matrize für die *in vitro*-Transkription diente das Plasmid pD128, das mit BsiWI 156 Nukleotide hinter dem Startcodon des Luziferasegens linearisiert wurde. Das Luziferase-Gen wird somit aus dem dicistronischen Kontext entfernt, so dass das Transkript nur noch das CAT-Gen und das FMDV-IRES-Element an seinem 3'-Ende enthält. Die *in vitro*-Translation wurde mit ausgesuchten FMDV-IRES-Mutanten-RNAs bei Salzkonzentrationen von 80 (B), 100 (C) und 120 mM (D) KCl und in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin durchgeführt. Zum Vergleich wurde eine dicistronische mRNA mit einem Wildtyp-IRES-Element (WT) benutzt.

Die *in vitro*- Transkripte wurden dann bei 80, 100 und 120 mM KCl in der Translation getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23B dargestellt. Zum Vergleich dient die Translation eines dicistronischen Transkriptes.

Bei Betrachtung der Ergebnisse wird klar, dass die Nukleotidsequenz der Luziferase keinen direkten Einfluss auf die Translation des CAT-Gens ausübt. Der Verlauf der CAT-Expression bei steigender KCl-Konzentration führt zu dem schon in Abschnitt 2.1.8 beschriebenen Bandenmuster. Bei 80 mM KCl erkennt man allmähliche eine Reduzierung der CAT-Expression in der Spur 4 (2M), die bei 100 mM (Spuren 12 und 15) weiter zunimmt. Bei 120 mM ist die Translation der CAT-RNA mit diesen Mutanten-IRES-RNAs fast nicht mehr zu detektieren (Spuren 20 und 23). Die 5'-abhängige Translation mit der IRES-Mutante 4M verhält sich bei steigendem Salzgehalt im wesentlichen wie in Abbildung 22 dargestellt. Ein ähnlich Expressionsverhalten, wie bei der IRES-Mutante 4M (Spuren 3, 11 und 19) zeigt sich in den Spuren 5, 13 und 21 (D2) beziehungsweise 6, 14 und 22 (2/D2), mit dem Unterschied, dass die Translation des CAT-Gens nicht so stark reduziert wird.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Expression des CAT-Reportergens im wesentlichen mit der Aktivität der hier getesteten IRES-Mutanten korreliert (vergleiche auch die Abb. 13), was zu der Vermutung führt, dass es sich hier um einen positiven „cis“-Effekt auf die Translation des CAT-Gens handeln könnte. Dabei hängt dieser Effekt ausschließlich von der Aktivität der sich stromabwärts des CAT-Gens befindlichen IRES ab, aber nicht von der tatsächlichen Translation des IRES-abhängig translatierten Luziferase-Reportergens.

2.2.2 Untersuchung zur weiteren Klärung des Einflusses der FMDV-IRES auf die CAT-Expression

In Abschnitt 2.2.1 wurde auf Grund der erzielten Ergebnisse die Annahme gemacht, dass die FMDV-IRES einen positiven „cis“-Effekt auf die 5'-vermittelte Translation des CAT-Gens im dicistronischen Kontext hat. Das folgende Experiment wurde durchgeführt, um festzustellen, ob dieser positive Effekt auch in „trans“ wirksam ist. Hierzu wurden monocistronische Mutanten-IRES-RNAs, die für die Luziferase codieren, gemeinsam mit dem Transkript des pMCATpa-Vektors in einem Translationsansatz bei 120 mM KCl getestet.

In den Kontrollspuren 1 - 3 der Abbildung 24 sind die Translationen eines dicistronischen Transkriptes mit Wildtyp-IRES (1), die 5'-vermittelte Translation der CAT-RNA (2) und die Translation einer monocistronischen Wildtyp-IRES-RNA dargestellt. Die hier ausgesuchten Mutanten-IRES-RNAs zeigen die für sie typische und im Ergebnisteil I beschriebene Luziferaseexpression (Spur 5 – 9), wie auch das Transkript mit der Wildtyp-IRES. In den Spuren 6, 7 und 8 erkennt man eine deutliche CAT-Expression, die aber schwächer ist als in Spur 2. Eine verstärkte Translation der CAT-RNA findet man mit der Wildtyp-IRES (Spur 4) und ganz deutlich mit der RAC-Mutanten-IRES-RNA (Spur 9). Eine klare Reduzierung der Translationseffizienz der CAT-RNA wird in der Spur 5 (4M) sichtbar.

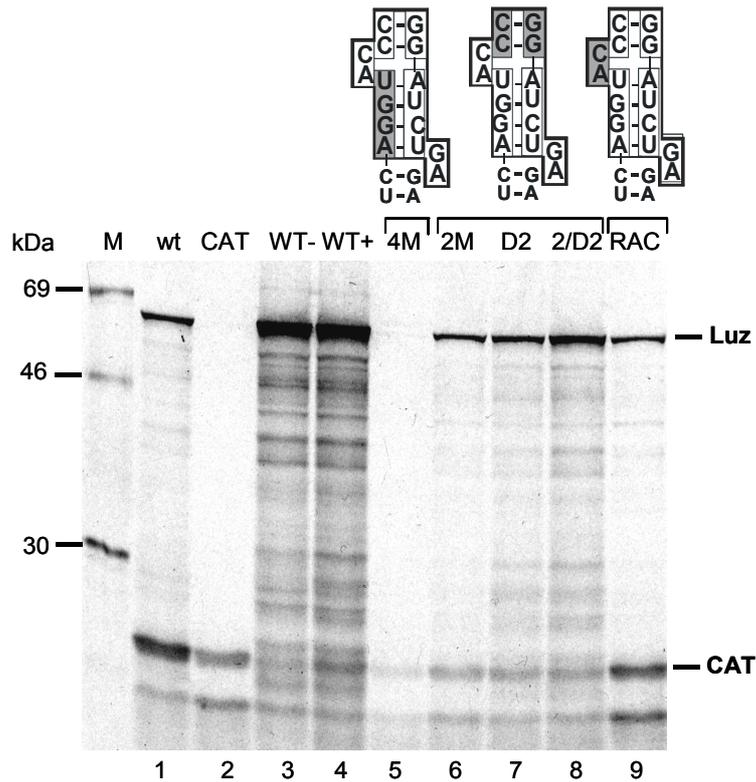


Abbildung 24: Einfluss des FMDV-IRES-Elements auf die CAT-Expression in „trans“. In dieser *in vitro*-Translation wurden monocistronische mRNAs von ausgesuchten FMDV-IRES-Mutanten eingesetzt, die für die Luziferase codieren, sowie ein Transkript, das das CAT-Gen enthält, aber dem kein IRES-Element vorgeschaltet ist. In Anwesenheit von ^{35}S -Methionin und bei einer KCl-Endkonzentration von 120 mM wurden beide Arten der mRNAs (Spuren 4 – 10) in einem Verhältnis von 1:2 in RRL bei 30°C inkubiert und die Translationsprodukte auf einem SDS-12%-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Spur 1: dicistronischer Vektor pD128 (WT; SmaI linearisiert); Spur 2: monocistronischer Vektor pMCATpa (SmaI linearisiert); Spur 3: monocistronischer Vektor pM128 (WT ;SmaI linearisiert), WT-: pM128 Wildtyp-RNA ohne CAT-RNA.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die FMDV-IRES stimulierend (Wildtyp-, RAC-Mutanten-IRES) auf die Expression des CAT-Gens wirken kann. Es lässt sich jedoch nicht zwischen einem inhibitorischen Effekt und einer fehlenden Stimulation im Falle der 4M-Mutante unterscheiden. Aus Zeitgründen konnte dieses Phänomen nicht mehr weiter analysiert werden.

2.2.3 Diskussion zu Teil II

Das Phänomen des „CAT-Effektes“ – ein positiver cis-Effekt?

In dieser Arbeit wurden, wie schon erwähnt, in den Translationsanalysen dicistronische Konstrukte verwendet, um die Aktivität der FMDV-IRES-Elements im Vergleich zur 5'-abhängigen Translation zu untersuchen. In der Regel wird ein zu untersuchendes Sequenzelement zwischen das erste und das zweite Cistron kloniert, und anhand der Expression des zweiten Reportergens können Schlussfolgerungen auf die Eigenschaften der zweiten Sequenz gezogen werden. Dabei geht man von der Annahme aus, dass die 5'-abhängige Translation konstant durchgeführt wird und so als Referenz benutzt werden kann, um die beobachtete Expression des zweiten Reportergens zwischen verschiedenen Reaktionsansätzen abzugleichen. So ist man zunächst auch im Falle des hier untersuchten IRES-Elements davon ausgegangen, dass beide Reportergene unabhängig voneinander translatiert werden, da es sich hier um zwei unterschiedliche Arten der Translationsinitiation handelt. Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass bei einer physiologischen Salzkonzentration (120 mM) das in cis gelegene IRES-Element einen Einfluss auf die 5'-abhängige Translation hat (vergleiche Abb. 11, Spuren 4 und Abb. 23, Spur 4). Es ist bekannt, dass gecappte RNAs bei höheren Kaliumchlorid Konzentrationen besser translatiert werden, als nicht gecappte RNAs (Borman *et al.*, 1995). Daher ist es verständlich, dass die Translation des CAT-Gens der hier ungecappten RNA in den *in vitro*-Versuchen bei steigender KCl-Menge abnahm (Abb. 22A). Da bei diesen Transkripten das Cap und das Poly-(A)-Ende nicht vorhanden sind, lag die Vermutung nahe, dass in den *in vitro*-Versuchen die Ursache für diesen ungewöhnliche Effekt möglicherweise in der Abwesenheit der typischen Modifikationen zu finden ist.

Die Auswertung der CAT-Expression aus der *in vivo*-Translation zeigt aber ebenfalls eine vergleichbare Reduzierung der Cap-abhängigen Translation bei den IRES-Mutanten (Abb. 19). Dass diese Reduzierung nicht so gravierend ausfällt wie bei den *in vitro*-Versuchen (Abb. 14) liegt anscheinend an den posttranskriptionalen Modifikationen. Vermutlich bildet, analog zur normalen zellulären Translation (Keiper *et al.*, 1999), das am Cap positionierte eIF4G mit seiner Bindungsstelle für das Poly-A bindende Protein (PABP) und dem am polyadenylierten Ende der RNA angelagerten Poly-(A)-Bindungs-Protein (PABP) eine pseudo-zirkuläre Struktur (Abb. 20), die es dem Ribosom ermöglicht, vor dem Abfall von der RNA, wieder auf das 5'-Ende aufzuspringen und das CAT-Gen erneut abzulesen.

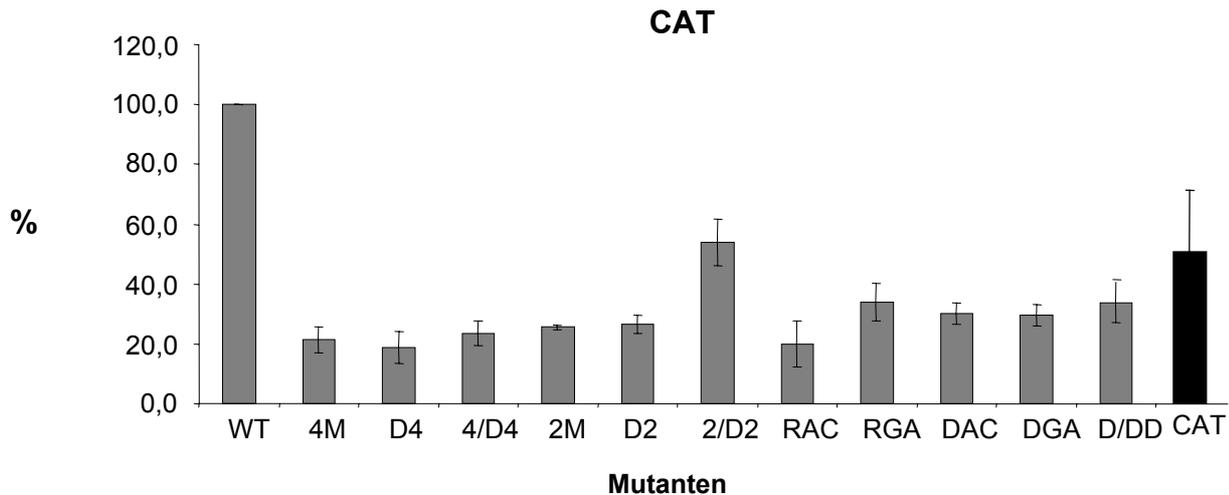


Abb. 19: Darstellung der Ergebnisse der *in vivo*-Translation des CAT-Gens im dicistronischen

Kontext. Zur Transfektion der BHK-Zellen wurde der dicistronische Vektor pD128 benutzt. Zur Standardisierung wurde die CAT-Expression des Wildtyps auf 100% gesetzt. Als Kontrolle diente der monocistronische Vektor pMCATpa, der das CAT-Gen und ein Polyadenylierungssignal enthält und kein IRES-Element (CAT).

Vermutlich bildet, analog zur normalen zellulären Translation (Keiper *et al.*, 1999), das am Cap positionierte eIF4G mit seiner Bindungsstelle für das Poly-A bindende Protein (PABP) und dem am polyadenylierte Ende der RNA angelagerten PABP eine pseudo-zirkuläre Struktur, die es dem Ribosom ermöglicht, vor dem Verlassen von der RNA wieder auf das 5'-Ende aufzuspringen und das CAT-Gen erneut abzulesen. Untersuchungen zu diesem Model (Abb. 20) wurden von Borman *et al.* (2002) durchgeführt.

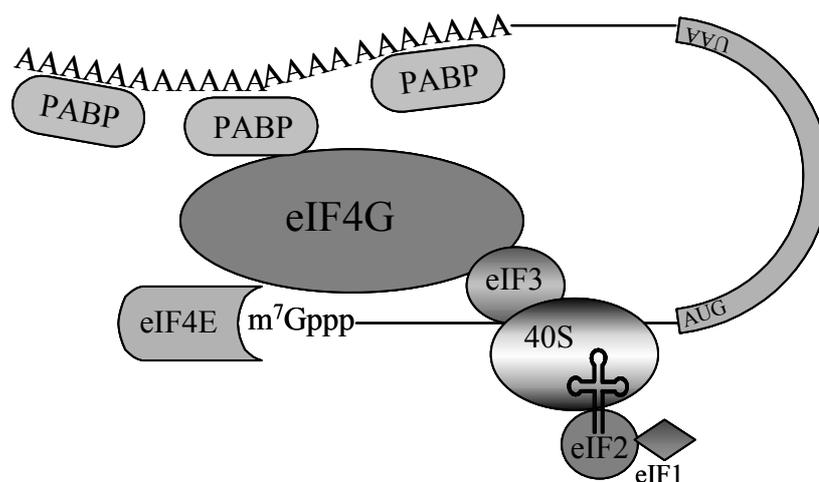


Abb. 20: Model der pseudo-zirkulären mRNA-Struktur. Eine Momentaufnahme zum Zeitpunkt der Rekrutierung des 43S Komplexes. m⁷Gppp: 7-Methyl-Guanosin-Kappe (Cap), 40S: kleine ribosomale Untereinheit, PABP: Poly-A-Bindungsprotein, eukaryotische Initiationsfaktoren eIF4E, eIF4G, eIF3, eIF2 und eIF1 (Modifiziert nach Keiper *et al.*, 1999).

In Anlehnung an dieses Modell wurde im Rahmen dieser Arbeit auch in Betracht gezogen, dass durch Anlagerungen homologer Sequenzabschnitte am Anfang und Ende der dicistronischen RNA sich eine solche Ringstruktur bilden können, die folgende Erklärung für den Einfluss des IRES-Elements liefern könnte. Dabei sollte unter physiologischen Bedingungen die Translationsinitiation an dem IRES-Element stattfinden, das Ribosom dann zunächst die Luziferase synthetisieren und im Anschluss auf das 5'-Ende der RNA übergreifen und das CAT-Gen exprimieren. Sequenzvergleiche zwischen den beiden Reportergenen zeigten, über eine Abfolge von 43 Nukleotiden mit mehreren Unterbrechungen Homologien von 4er- und 6er- Basenpaarungen zwischen dem 5'-Ende des CAT-Reporters und dem zweiten Drittel des Luziferasegens (siehe Anhang). Eine weitere Hoffnung für dieses Modell ergab sich aus dem Umstand, dass die hohen Salzkonzentrationen diese theoretische Sekundärstruktur stabilisieren. Die Untersuchungen der Transkripte, denen der ORF der Luziferase fehlt (Abb.22), führten jedoch zur Widerlegung dieser Theorie, und die Möglichkeit, dass diese RNA-RNA-Interaktion am 3'-Ende des IRES-Elements stattfinden könnte, wurde durch Sequenzvergleiche nicht ebenfalls bestätigt.

Eine weitere Überlegung manifestierte sich in dem Modell der intermolekularen Interaktion. Es wurde die Theorie aufgestellt, dass die oben beschriebene Hybridisierung zwischen zwei verschiedenen Transkripten vonstatten geht, so dass beide Genprodukte von ein und dem selben Ribosom synthetisiert werden, aber von verschiedenen Matrizen stammen. Die Ergebnisse der in Abbildung 23 dargestellten Translationsanalyse konnten leider keine eindeutige Erkenntnis zu diesem Sachverhalt erbringen. Es zeigte sich zwar, dass das IRES-Element anscheinend auch einen Einfluss in der trans-Position auf die 5'-abhängige Translation ausüben kann, aber die erhaltenen Daten unterstützten das aufgestellte Modell der intermolekularen Interaktion nicht. So zeigt sich keine nennenswerte Steigerung der CAT-Expression durch die Wildtyp-IRES-RNA oder durch die 2/D2 Revertanten IRES-RNA, wie es sich in den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt hat (Abb. 23, Spuren 4 und 8). Die sichtbare Inhibition der CAT-Expression durch die IRES-Mutante 4M spricht zwar für das Modell, steht damit aber im krassen Gegensatz zum Verhalten der übrigen IRES-Mutanten. Diese Beobachtung lässt sich auch nicht durch ein kompetitives Verhalten der CAT-RNA gegenüber erklären, da diese Mutante eine der translationsschwächsten und darüber hinaus die Bindungsaffinität von eIF4G sehr niedrig ist. Es konnten aus diesem Experiment keine gesicherten Hinweise auf einen Einfluss des IRES-Elements auf die CAT-Expression in „trans“ erhalten werden, da die Untersuchungen aus Zeitgründen nicht mehr weitergeführt werden konnten.

Um zu untersuchen, ob dies ein sequenzspezifischer Effekt ist, der nur das CAT-Gen betrifft, wurde dieser Reporter gegen ein Gen ausgetauscht, das für die beta-Untereinheit des Faktors eIF2 kodiert. Aus unbekanntem Gründen kam es hierbei zu keiner Expression dieses Gens (Daten nicht gezeigt). Auch aus Literaturrecherchen konnten keine weiteren Hinweise auf so ein Phänomen gefunden werden und aus Zeitgründen konnte dieses Phänomen leider nicht weiter untersucht werden.

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass das IRES-Element des FMD-Virus innerhalb eines dicistronischen Transkriptes einen Einfluss auf die 5'-abhängige Translation des CAT-Gens ausübt. Daher sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die mehr Licht auf dieses interessante Phänomen werfen können.

3. Schlussdiskussion

3.1 Der Einfluss des konservierten Elementes auf die Bindung von eIF4G

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Sequenzelement der IRES des FMD-Virus, das sowohl in der Primärsequenz als auch auf Ebene der Sekundärstruktur absolut konserviert ist, mittels Mutagenese untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die eingebrachten Mutationen unterschiedliche Einflüsse (siehe Abb. 13) auf die Bindung des Translationinitiationsfaktors eIF4G und damit auch auf die Translationsaktivität des IRES-Elementes haben.

Die Cardio- und Aphthoviren werden auf Grund der hochkonservierten Primär- und Sekundärstruktur in der 5'-Nichttranslatierten Region ihres viralen Plusstrang-RNA-Genoms (Jackson & Kaminski, 1995) zu einer Gruppe zusammengefasst. Diese Sekundärstrukturen zeigen sich in Form von mehreren sogenannten Stem-Loops (siehe auch Abb. 7) und werden als interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) bezeichnet, in der das hier untersuchte konservierte Sequenzelement lokalisiert ist. An die IRES binden Standard-Initiationsfaktoren der Translation und oft auch andere RNA-bindende Proteine der Zelle, die die Translation des viralen Plusstrang-RNA-Genoms einleiten. Ausschlaggebend für diesen Vorgang ist die Bindung des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF4G, dessen Bindungsdomäne nachweislich der Stem-Loop 4 (beziehungsweise J-K) in der FMDV- und EMCV-IRES ist (Abb. 22) (Lopez de Quinto & Martinez-Salas, 2000, Saleh *et al.*, 2001)

Das hier untersuchte konservierte Sequenzelement befindet sich im Stem-Loop 4 – 1 der FMDV-IRES (entsprechend der J-Domäne bei EMCV) und besteht aus ungepaarten und gepaarten Nukleotiden. Das aktuelle Model der Sekundärstruktur der FMDV- und EMCV-IRES (Abb. 7) (Pilipenko *et al.*, 1989a und 1989b; Jackson *et al.*, 1994) stellt die ungepaarten Dinukleotide im aufsteigenden und absteigenden Ast des Stem-Loops 4 – 1 in exponierter Lage dar, was nahe legt, dass es sich dabei um eine Bindungsstelle für eIF4G handelt, da diese Nukleotide nicht in einer doppelsträngigen Helixstruktur eingebunden sind und so vermutlich leichter von den Aminosäureresten des Polypeptids kontaktiert werden können.

Die in dieser Arbeit verwendeten IRES-Mutanten, in denen diese ungepaarten Dinukleotide deletiert wurden (DAC, DGA, D/DD), haben im UV-Crosslink (Abb. 8 und 11) gezeigt, dass eine eIF4G-Bindung bei keiner der getesteten Salzbedingungen zu detektieren ist. Das lässt darauf schließen, dass hier in erster Linie das Vorhandensein dieser Nukleotide und damit möglicherweise die Sekundärstruktur des konservierten Bereiches für die Bindung von eIF4G wichtig ist. Auch ein Nukleotidaustausch (RAC, RGA) dieser Nukleotide reduziert die Bindungsaffinität von eIF4G an die FMDV-IRES-RNA, was darauf hindeutet, dass in einem gewissen Ausmaß auch die Primärsequenz dieser ungepaarten Dinukleotid-Bereich wichtig ist.

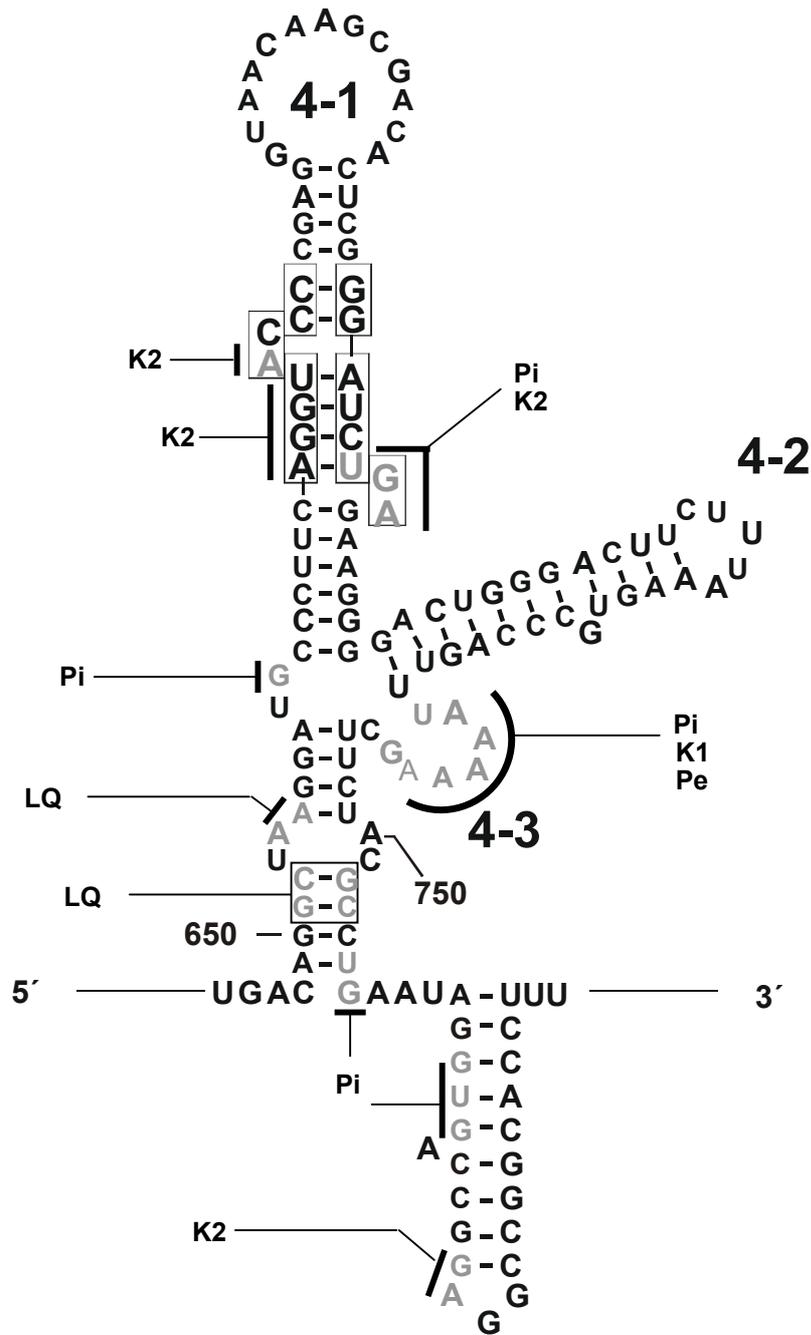


Abbildung 25: Übersicht der potentiellen Bindungsstellen von eIF4G an den Stem-Loop 4. Die hellgrauen Nukleotide bezeichnen die gefundenen Bindungsstellen an der EMCV- und FMDV-IRES mit Literaturangabe.

Das konservierte Sequenzelement ist eingerahmt.

Pi: Pilipenko *et al.*, 2000, *Genes & Dev.* 14:2028-2045;

Pe: Pestova *et al.*, 1996, *Mol. Cell. Biol.* 16:6870-6878;

K1: Kolupaeva *et al.*, 1998, *J. Biol. Chem.* 273:18599-604;

K2: Kolupaeva *et al.*, 2003, *Mol. Cell. Biol.* 23:687-698;

LQ: Lopez de Quinto & Martinez-Salas, 2000, *RNA* 7:1213-1226

Aus Versuchen anderer Arbeitsgruppen mit chemischen Modifikationen und „RNase-protection-assays“ an der EMCV- und der FMDV-IRES ist bekannt, dass eIF4G das Adenin im aufsteigenden und das ungepaarte Dinukleotid im absteigenden Ast vor chemischen Modifikationen beziehungsweise RNase-Verdau schützt (Pilipenko *et al.*, 2000; Kolupaeva *et al.*, 2003), was diese als Bindungsstellen für eIF4G ausweist. Für ein besseres Verständnis sollen hier kurz die in der diskutierten Literatur verwendeten Methoden erläutert werden. DMS (Dimethylsulfat) modifiziert überwiegend ungepaartes Adenosin, und zu einem geringeren Grad reagiert es mit ungepaartem Cytosin. CMCT (1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide metho-p-toluene sulphate) reagiert mit dem N3 (Stickstoff 3) von ungepaartem Uracil und mit dem N1 von ungepaartem Guanosin. RNase T₁ schneidet die RNA spezifisch nach ungepaartem Guanosin (Pilipenko *et al.*, 2000). RNase V1 schneidet ausschließlich doppelsträngige und RNA-Bereiche (Kolupaeva *et al.*, 2003).

3.2 Der Einfluss von Primärsequenz und Sekundärstruktur auf die Bindung von eIF4G ist nicht klar zu trennen

Die ungepaarten Dinukleotide flankieren den Bereich der vier gepaarten Nukleotide. An Hand des Modells der IRES-Sekundärstruktur (Abb. 7 und 25) ist ersichtlich, dass eine miss match-Mutation sowohl im aufsteigenden (4M) als auch im absteigenden Ast (D4) des Stem-Loops 4 – 1 die Sekundärstruktur erheblich stört, wobei vermutlich eine größere Blasenstruktur innerhalb des Stem-Loops gebildet wird. Dadurch sind die sterischen Verhältnisse innerhalb des Stem-Loops nicht mehr gegeben, die eine Bindung von eIF4G ermöglichen würden. Der UV-Crosslink-Ansatz mit der Revertanten-IRES-RNA (4/D4) zeigt jedoch, dass eine intakte Sekundärstruktur mit anderer Nukleotidsequenz ebenfalls keine Bindung von eIF4G erlaubt. Anscheinend ist hier auch die Primärsequenz von entscheidender Bedeutung, und es ist zu erwarten, dass eIF4G an eines oder mehrere Nukleotide in diesem Bereich bindet. Diese Annahme wird durch Befund anderen Arbeitsgruppen unterstützt.

EMCV-IRES/eIF4G-Komplexe wurden mit Hydroxyl-Radikalen in einem Reaktionsgemisch inkubiert (Kolupaeva *et al.*, 2003). Die Radikale greifen unspezifisch den Ribose-Anteil von Einzel- und Doppelstrang-RNA an und spalten diesen. Es folgt eine RT-PCR der gespaltenen RNA-Fragmente in Anwesenheit von [³²P]-dATP. Die Produkte dieser Reaktion werden auf einem Sequenziergel aufgetrennt und das Gel auf Röntgenfilm exponiert. Die Sequenzbereiche, an die sich eIF4G anlagert, sind vor dem Angriff der Hydroxyl-Radikale geschützt und in dem Filmexponat sichtbar. Das trifft auch auf die Gruppe der vier Nukleotide im aufsteigenden Ast der konservierten Region zu, was die zuvor getroffene Annahme, dass die Primärsequenz wichtig ist, erhärtet.

Die Mutanten der gepaarten Dinukleotide im oberen Bereich des konservierten Elements haben im Verlauf der Untersuchungen ein zunächst unerwartetes Bindungsverhalten von eIF4G gezeigt. Theoretisch sollten die miss-match-Mutationen 2M, D2 und D2MAT (Abb. 26C) einen vergleichbaren Effekt auf die Sekundärstruktur haben, da diese Mutationen die Sekundärstruktur auflösen sollten. Dennoch zeigt eIF4G eine unterschiedliche Affinität zu diesen Mutanten-IRES-RNAs. Erst durch die Revertanten 2/D2 und 2/D2AT wird eine partielle Wiederherstellung der Bindungsaffinität von eIF4G erreicht, die in erster Linie auf die intakte Sekundärstruktur des Stem-Loops zurückzuführen ist. Diese

Annahme wird von den Ergebnissen aus den Versuchen mit der „pseudo“-miss match-Mutante 2MAT untermauert, bei der die Cytidine im aufsteigenden Ast gegen Adenin und Uracil ausgetauscht wurden. Es ist bekannt, dass bei der Bildung von RNA-Sekundärstrukturen Uracil und Guanin eine Basenpaarung eingehen können. Ebenfalls besteht eine geringe Wahrscheinlichkeit einer Paarung von Adenin und Guanin (Knippers, Molekulare Genetik). Unter diesen Voraussetzungen wäre die eingebrachte Substitution der Cytosine keine echte miss-match-Mutation, und die Sekundärstruktur würde nicht aufgelöst (Abb. 26B). Des weiteren dürften die bestehenden sterischen Verhältnisse gar nicht oder nur geringfügig beeinflusst werden, so dass die Bindung von eIF4G folglich nur unwesentlich beeinträchtigt wird.

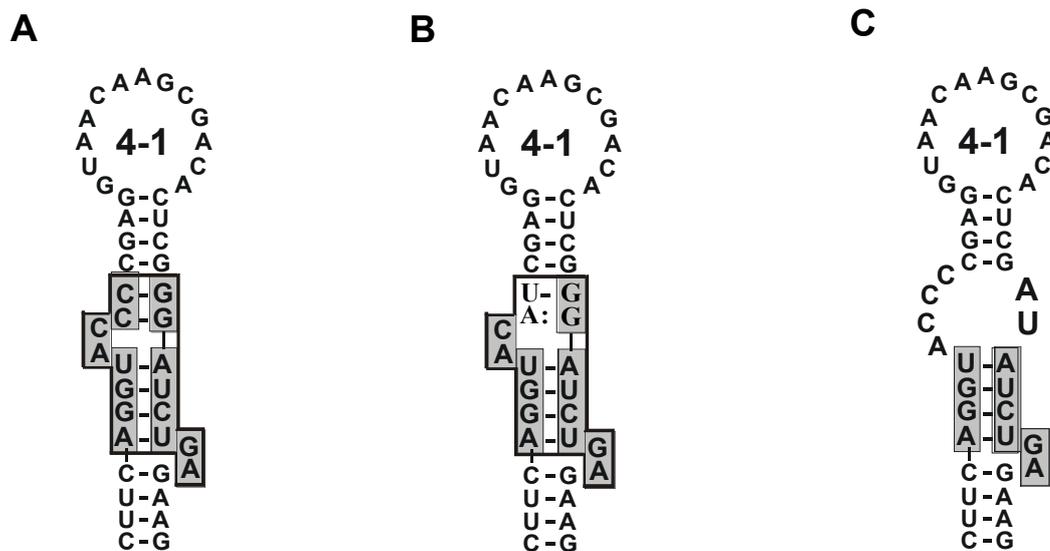


Abbildung 26: Mögliche Ausbildung der Sekundärstruktur der AT-Mutanten.

A: Wildtyp-Sequenz, B: Alternativ-Mutante 2MAT der gepaarten Dinukleotide, C: Alternativ-Mutante D2AT der gepaarten Dinukleotide. Der restliche Anteil der konservierten Region ist grau unterlegt.

Die sehr schwache Bindung von eIF4G an diese miss match-Mutanten und die Wiederherstellung der Bindung durch die Revertanten, vor allen Dingen durch die „pseudo“-miss match-Mutante 2MAT zeigt deutlich, dass in diesem Bereich des konservierten Elements der Sekundärstruktur eine wichtigere Rolle für die Bindung von eIF4G an den Stem-Loop 4 – 1 als der Primärsequenz zukommt.

Ein weiteres Indiz für die Abhängigkeit einer erfolgreichen Translationsinitiation von der genauen sterischen Positionierung von eIF4G an das IRES-Element scheint das Translationsexperiment mit dem L-Protease-behandelten Lysat zu zeigen (Abschnitt 2.1.13). Hierbei sind die Translationsresultate einer miss match-Mutante (2M), ihrer Revertante (2/D2) und einer Mutante mit Sequenzaustausch (RAC) den Translationsresultaten mit unbehandeltem Lysat gegenübergestellt, wobei eine deutliche Erhöhung der Expression des 3'-gelegenen Luziferase-Gens mit der 2/D2-Mutanten- und der RAC-Mutanten-IRES-RNA, aber nicht der 2M- Mutanten-IRES-RNA zu erkennen ist (Abb. 19). Im Prinzip ist bei der 2/D2-Mutante analog zu der RAC-Mutante nur die Primärsequenz und nicht die

Sekundärstruktur verändert worden, so dass die sterischen Verhältnisse innerhalb des IRES-Elements möglicherweise weniger gestört werden als bei der miss match-Mutante 2M. Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass die Abwesenheit des N-terminalen Fragments von eIF4G möglicherweise eine effizientere Anlagerung des C-terminalen Fragmentes erlaubt. Der aus den Mutationen der Primärsequenz resultierende Bindungsverlust von eIF4G an die Mutanten-IRES-RNA würde dadurch zum Teil kompensiert werden können. Ob die hier beschriebene Vermutung sich bestätigt, müssen nachfolgende Experimente zeigen. Sie würde zumindest ein weiteres Indiz für den Vorteil der proteolytischen Spaltung des Initiationsfaktors eIF4G für das FMD-Virus liefern.

3.3 Mögliche Bedeutung der Konservierung der Primärsequenz

Obwohl die miss match-Mutanten 2M und D2 die Sekundärstruktur des Stem-Loops stören, zeigt eIF4G nur eine moderate Reduktion der Bindung an diese Mutanten-IRES-RNAs. Dabei erlaubt die D2-Mutante eine vergleichbare bessere Bindung von eIF4G, als die 2M-Mutante. Bei der 2M-Mutante wurden Pyrimidine gegen Purine (2M) und bei der D2-Mutante Purine gegen Pyrimidine (D2) ausgetauscht. Da zwei gegenüberliegende Purine auf Grund ihrer Größe mehr Raum als zwei Pyrimidine benötigen, wirken diese Mutationen unterschiedlich auf die sterischen Verhältnisse nach der Auflösung der Sekundärstruktur. Hinzu kommt, dass dieser mutierte Bereich in direkter Nachbarschaft zu dem ungepaarten Dinukleotid AC im aufsteigenden Ast liegt, in dem eine Bindungsstelle (das Adenin) für eIF4G lokalisiert ist. Es lässt sich also vermuten, dass die 2M-Mutation (zwei gegenüberliegende Purine-Paare) im Vergleich zur D2-Mutation (zwei gegenüberliegende Pyrimidin-Paare) die sterischen Verhältnisse drastischer beeinflusst, so dass die übrigen Bindungsstellen von eIF4G im Stem-Loop 4 - 1 diese Störung nicht mehr kompensieren können.

Die niedrige Bindungsaffinität von eIF4G an die IRES-RNA der D2AT-Mutante, die mit der an die D2-Mutanten-IRES-RNA vergleichbar ist, könnte dagegen auf die Unfähigkeit der Cytidine zurück zu führen sein, keine ungewöhnlichen Basenpaarungen eingehen zu können, wie es für die 2MAT-Mutante beschrieben wurde (Abb.26C). Daher kann die Auflösung der Sekundärstruktur nicht durch neue Basenpaarungen kompensiert werden, und eine vergleichbare Situation, wie für die D2-Mutante beschrieben, würde auch hier zutreffen.

Die Tatsache, dass dieser Teil der konservierten Region durch die Bindung von eIF4G nicht vor chemischen Modifikationen oder Verdau durch RNase geschützt ist (Kolupaeva *et al.*, 2003), und die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate lassen vermuten, dass die Konservierung dieser Nukleotide vorwiegend zur Erhaltung der sterischen Bedingungen innerhalb der Sekundärstruktur dient, selbst aber keine direkte Bindungsstelle für eIF4G darstellen.

3.4 Die Bindung von eIF4B, PTB und dem p50-Polypeptid an die FMDV-Mutanten-IRES-RNA

Der Initiationsfaktor eIF4B bindet wie auch eIF4G an den Stem-Loop 4 (Meyer *et al.*, 1995) der FMDV-IRES. An partiell doppelsträngigen RNA-Substraten stimuliert eIF4B die ATP-abhängige Helikase-Aktivität des Initiationsfaktors eIF4A beziehungsweise eIF4F (Pause *et al.*, 1993). Gleichzeitig wird die Bindung von eIF4B an die mRNA durch eIF4A unterstützt. Basierend auf diesen Befunden ist das Bindungsverhalten von eIF4B an den in dieser Arbeit untersuchten FMDV-Mutanten-IRES-RNAs, dass mit dem Bindungsverhalten von eIF4G korreliert, nicht unerwartet, zumal gezeigt wurde, dass eIF4G beziehungsweise eIF4F und eIF4B synergistisch an ein IRES-Element binden (Pestova *et al.*, 1996).

PTB (polypyrimidine-tract-binding protein) stimuliert die Translation verschiedener Picornaviren und bindet vermutlich als Homodimer nicht nur an den Stem-Loop 2 und an den am 3'-Ende der IRES gelegenen Pyrimidin-Trakt (Luz & Beck, 1991), sondern interagiert auch mit der apikalen Schleife des Stem-Loops 4 – 2 (Kolupaeva *et al.*, 1996).

Da offensichtlich keine dieser PTB-Bindungsstellen direkt durch die Mutationen betroffen ist, könnte man annehmen, dass die verminderte Bindung von PTB an die Mutanten-IRES-RNAs eher aus der Abwesenheit von eIF4G (beziehungsweise dem eIF4F-Komplex) oder eIF4B resultiert, mit denen PTB mögliche Protein-Protein-Interaktionen eingehen könnte. Allerdings findet man die stärkste Reduzierung der PTB-Bindung an der RNA der Deletionsmutante DAC der ungepaarten Dinukleotide und der RNA der Doppeldeletionsmutante D/DD. Im Kontrast dazu steht die stärkere Bindung (vergleichbar zu der Bindung an die Wildtyp-RNA) von PTB an die RNA der Deletionsmutante DGA. Aus der Tatsache, dass weder eIF4G noch eIF4B bei diesen Mutanten-RNAs an das konservierte Sequenz-Element binden und im Bezug auf die helikale Drehung des Stem-Loops 4 – 1 könnte folgende Spekulation abgeleitet werden: Durch die helikale Drehung wird das Cytosin des ungepaarten Dinukleotids AC im aufsteigenden Ast bei der DGA-Mutante in räumliche Nähe des an die apikale Schleife des Stem-Loops 4 – 2 bindenden PTB gebracht. Hierdurch erhält das PTB eine weitere Bindungsmöglichkeit, die die oben vermutlich fehlenden Protein-Protein-Interaktionen kompensieren könnte. Allerdings müsste durch weitere Experimente diese Spekulation untersucht werden.

Das an die FMDV-IRES-RNA bindende Polyprotein p50 wurde bis jetzt noch nicht identifiziert und die Spezifität der Bindung analysiert. Ein möglicher Kandidat wäre das die Poliovirus-Translation stimulierende Autoantigen La (Meerovitch *et al.*, 1993), welches bei Patienten mit dem Autoimmun-Defekt *Lupus erythematosus* und dem Sjögren's Syndrom entdeckt wurde. Jedoch ist die Bindung des La-Proteins an eine FMDV-IRES-RNA bisher noch nicht untersucht worden.

Ein weiterer Kandidat wäre das mRNP („messenger-ribonucleoprotein particle“) YB-1(p50), das an der Regulation der zellulären Translation beteiligt ist (Nekrasov *et al.*, 2003). Dieser Befund würde für dieses Protein sprechen, jedoch bindet es vorwiegend an einzelsträngige RNA und weist eine starke Helikase-Aktivität auf. Bei geringer Abundanz stimuliert es die Translation von mRNAs, wirkt aber inhibierend bei höheren Konzentrationen (Nekrasov *et al.*, 2003). Weiterhin unterbindet es die Interaktion des eIF4F-Komplexes mit der Cap-Struktur, sowie die Bindung von eIF4B an die mRNA (Evdokimova *et al.*, 2001). Diese Befunde lassen es unglaublich erscheinen, dass das mRNP YB-1

identisch mit dem an die FMDV-IRES gebundene p50 Polyprotein ist. Auch wenn es spezifisch die Cap-abhängige Translation inhibiert, sprechen die starke Helikase-Aktivität und die bevorzugte Bindung an einzelsträngige RNA gegen dieses Protein. Daher kann man ohne weitere Untersuchungen nur spekulieren, um was für ein Protein es sich hierbei handelt.

3.5 Die Beteiligung der eukaryotischen Initiationsfaktoren bei der Translationsinitiation an picornaviralen IRES-Elementen

Die picornaviralen Typ I und II IRES-Elemente haben prinzipiell gemein, dass sie für die Translationsinitiation alle eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren benötigen, mit Ausnahme des „cap binding proteins“ eIF4E. Hinzu kommt, dass für die Initiation der Translation an den Typ I und II IRES-Elementen nur das C-terminale Fragment (2/3 des Gesamtproteins) von eIF4G benötigt wird. Dem gegenüber steht das IRES-Element des Typs III von HAV, das eIF4E und vollständiges eIF4G für eine effiziente Translation benötigt (Borman & Kean, 1997; Borman *et al.*, 1997b).

Der größte Teil der bisher bekannten Daten über die Translationsinitiation bei Picornaviren wurde durch Untersuchungen an Hand des IRES-Elements von EMCV erhalten. Dabei konnte unter Verwendung gereinigter beziehungsweise rekombinanter Initiationsfaktoren ermittelt werden, welche Faktoren zur Translationsinitiation essentiell sind beziehungsweise welche Faktoren stimulierend auf diesen Prozess wirken (Pestova *et al.*, 1996a; Pestova *et al.*, 1996b).

Die Bildung des initiierten Protein-Komplexes aus eIF4A, eIF4B und eIF4F (beziehungsweise dem C-terminalen Fragment von eIF4G, welches die Domänen für die Interaktion mit eIF3 und eine der eIF4A-Bindungsstellen beinhaltet), ist die notwendige Voraussetzung für die Anlagerung der ribosomalen 40S-Untereinheit an die EMCV-IRES (Pestova *et al.*, 1996a). Weitere Untersuchungen zeigten, dass für die Bindung der 40S-Untereinheit an die EMCV-IRES eIF2, eIF3 und ATP absolut essentiell sind (Lamphear *et al.*, 1995; Ohlmann *et al.*, 1996; Pestova *et al.*, 1996a; Imataka & Sonenberg, 1997).

Ohne die Faktoren eIF1 und eIF1A, denen in Anlehnung an die eukaryotischen Translation die Auswahl des Initiator-AUG am 3'-Ende der EMCV IRES zugeschrieben wird, wird die EMCV-RNA nicht translatiert (Pestova *et al.*, 1998). Damit gehören auch sie zu den Faktoren, die für die EMCV-Translation essenziell sind.

Im Einklang mit der Feststellung, dass durch L-Proteasen von FMDV beziehungsweise die Protease 2A des Poliovirus die N-terminale Domäne von eIF4G, die in der eukaryotischen Translationsinitiation das „cap binding protein“ eIF4E bindet (Mader *et al.*, 1995), proteolytisch abgespalten wird, konnte gezeigt werden, dass eIF4E für die EMCV-Translation nicht verwendet wird (Pestova *et al.*, 1996a).

In letzter Zeit steht der Initiationsfaktor eIF4G besonders im Mittelpunkt der Untersuchungen der picornaviralen Translationsinitiation, da er als multifunktionaler Adapter angesehen wird und vermutlich die Bindung der 40S-Untereinheit an die zelluläre wie auch an die virale RNA vermittelt (Henze, 1997). Die Bindungsstelle von eIF4G befindet sich am 3'-Ende der EMCV-IRES und dort in der J-K-Domäne, die sich in der Nähe des Initiator-AUGs befindet (Pestova *et al.*, 1996a; Pestova *et al.*, 1996b; Kolupaeva *et al.*, 1998). Analog zu diesen Befunden konnte durch „Toeprint“-Assays und

Deletionsmutationen gezeigt werden, dass die Hauptbindungsdomäne von eIF4G in der FMDV (O₁K)-IRES ebenfalls im Stem-Loop 4 liegt (Pilipenko *et al.*, 2000, Saleh *et al.*, 2001). Durch Punktmutationen in der Basis des Stem-Loop 4 konnte auch für den FMDV-Serotyps C-S8c1 gezeigt werden, dass eIF4G in dieser Region stark an die IRES bindet (López de Quinto & Martinez-Salas, 2000). Diskrepanzen kamen jedoch im Bezug auf die Beteiligung des Stem-Loops 5 an der Bindung von eIF4G auf. Während nach Daten des FMDV-Serotyp C-S8c1 der Stem-Loop 5 für die eIF4G-Bindung eher ausgeschlossen wird (López de Quinto & Martinez-Salas, 2000), zeigten Deletionsexperimente, dass der Stem-Loop 5 der FMDV (O₁K)-IRES vermutlich an der Bindung von eIF4G beteiligt ist (Saleh *et al.*, 2001). Diese Befunde werden auch durch neuste Untersuchungen gestützt, die zeigen konnten, dass die Anlagerung von eIF4G an die EMCV-IRES auch einen großen Teil der L-Domäne (Analog zum Stem-Loop 5) vor chemischen Modifikationen und RNase-Verdau schützt (Kolupaeva *et al.*, 2003). Ob diese Unterschiede serotypspezifisch sind und welche generelle Rolle der Stem-Loop 5 einnimmt, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Unabhängig vom Serotyp stimmen die Befunde überein, dass Mutationen im Stem-Loop 4, die die Bindung von eIF4G an die FMDV-IRES negativ beeinflussen, auch die Translationseffizienz erheblich beeinträchtigen, was darauf hinweist, dass eIF4G eine essentielle Funktion in der FMDV-Translation übernimmt (López de Quinto & Martinez-Salas, 2000; Saleh *et al.*, 2001; und diese Arbeit).

Auf Grund der Tatsache, dass jeder der genannten Initiationsfaktoren mit Ausnahme von eIF4E für die picornavirale Translation wichtig ist, stellte sich die Frage, in wie weit diese Faktoren und vor allem eIF4G unabhängig von einander an die IRES binden, und welche stimulierenden Effekte sie möglicherweise untereinander ausüben.

Aus Experimenten von UV-Crosslink-Assays konnte gezeigt werden, dass die Bindung von eIF4G an die EMCV-IRES durch die Anwesenheit von eIF4A und eIF4B erheblich verstärkt wird. Umgekehrt stimuliert eIF4G wiederum die Bindung von eIF4A und eIF4B an die EMCV-IRES (Kolupaeva *et al.*, 1998). Die Annahme, dass die drei Initiationsfaktoren eIF4G, eIF4B und eIF4A synergistisch an ein IRES-Element binden, wird durch die Beobachtungen unterstützt, dass eIF4B nur in Anwesenheit von ATP an den Stem-Loop 4 der FMDV IRES bindet, obwohl eIF4B selbst keine ATPase-Aktivität besitzt (MEYER *et al.*, 1995). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die ATP-abhängige RNA-Helikase eIF4A an der eIF4B-Bindung beteiligt ist. Des weiteren zeigten die Resultate aus UV-Crosslink-Assays, dass eIF4A und eIF4B nur sehr schwach im an die EMCV-IRES binden. In Anwesenheit von eIF4G konnte dagegen die Bindung beider Faktoren erheblich gesteigert werden (Pestova *et al.*, 1996b). Die Abwesenheit von entweder eIF4F (welches eIF4G beinhaltet), eIF4B oder eIF4A führte zu einer erheblichen Reduzierung der Bildung der 48S-Komplexe mit EMCV-IRES-RNA (Pestova *et al.*, 1996a).

Im Bezug auf die synergistischen Effekte zwischen eIF4G und eIF4B stehen die Ergebnisse aus der Gruppe um Martinez-Salas im Widerspruch zu den zitierten Arbeiten. UV-Crosslink-Analysen mit den Stem-Loops 4 – 5 der FMDV(C-S8c1)-IRES ergaben, dass beide Faktoren ohne den 5'-Bereich der

IRES gut binden. Bei Deletion des Stem-Loop 5 konnte dagegen keine eIF4B-Bindung detektiert werden, während eIF4G noch gut an den Stem-Loop 4 band. Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass die Bindung von eIF4G unabhängig von eIF4B erfolgt, obwohl die Bindungsstellen beider Proteine offensichtlich sehr nahe beieinander liegen (López de Quinto & Martínez-Salas, 2000). Zur Verifizierung dieser Schlussfolgerung fehlen jedoch Konkurrenzexperimente, die beweisen würden, dass es sich bei dem beobachteten Verschwinden der eIF4B-Bande im UV-Crosslink-Assay nicht nur um den Verlust einer UV-Crosslink-Stelle von eIF4B handelt.

Zusammenfassend weisen diese Daten daraufhin, dass eIF4G, eIF4B und eIF4A synergistisch mit der IRES interagieren und vermutlich gemeinsam die Bindung der ribosomalen 40S-Untereinheit an die IRES vermitteln.

Auch für die Typ I IRES von Poliovirus lässt sich annehmen, dass sich diese eukaryotischen Initiationsfaktoren in ähnlicher Weise an der Translationsinitiation beteiligen. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eIF4B und eIF4G an den Stem-Loop V der Poliovirus IRES bindet (Ochs *et al.*, 2002 und 2003). Des Weiteren ist die relative Position und die Anordnung der Sekundärstrukturen der Poliovirus IRES, an die eIF4B bindet, denen der Typ II IRES-Elemente, die mit eIF4B interagieren, sehr ähnlich (Ehrenfeld & Semler, 1995; Jackson & Kaminski, 1995; Niepmann, 1999), was auf einen vergleichbaren Mechanismus der Translation bei den Typ I und Typ II IRES-Elementen hinweist.

Im Vergleich zu den IRES-Elementen der Picornaviren zeigt sich den IRES-Elementen von HCV und der Pestiviren ein anderes Bild. Diese Viren rekrutieren kein eIF4G für die Initiation der Translation, was vermuten lässt, dass sich der Mechanismus der Translationsinitiation zwischen den Typ IV IRES-Elementen der HCV/Pestiviren-Gruppe und den picornaviralen Typ I und Typ II IRES-Elementen klar unterscheidet. Die Anlagerung der ribosomalen 40S-Untereinheit aus Retikulozyten-Lysat (jedoch nicht aus Weizenkeimextrakt) an die IRES-Elemente von HCV und Pestiviren kann in Abwesenheit von eIF3, eIF4A, eIF4B und eIF4F stattfinden, und dieser Vorgang wird nicht durch die Standard-Translationsfaktoren stimuliert (Pestova *et al.*, 1998). Die Bindungsstelle der 40S-Untereinheit befindet sich vermutlich in unmittelbarer Nähe zur Pseudoknot-Struktur der IRES-Elemente von HCV und CSFV („classical swine fever virus“, ein Vertreter der Pestiviren) (Pestova *et al.*, 1998). Die 3'-Region der IRES beinhaltet eine Nukleotidsequenz, die komplementär zu einer Sequenz in der 18S-rRNA der 40S-Untereinheit ist. Vermutlich wird eine Bindung zwischen der 40S-Untereinheit und IRES-RNA durch eine mögliche Basenpaarung dieser Regionen vermittelt (LE *et al.*, 1995). Hinzu kommt die spezifische Bindung eines ribosomalen 25 kDa-Proteins an die HCV IRES (Fukushi *et al.*, 1997), das von der 40S-Untereinheit stammt. Dies sind schon mindestens zwei mögliche Ankerpunkte zwischen Ribosom und IRES-RNA (LE *et al.*, 1995; Fukushi *et al.*, 1999), die die Unabhängigkeit der HCV-Translation von den meisten Standard-Initiationsfaktoren verständlich macht.

Die nachfolgende Anlagerung der 60S-Untereinheit dagegen ist abhängig von der Anwesenheit von eIF2 und eIF3. Die Bildung des 80S-Komplexes mit CSFV und HCV IRES wird vermutlich durch eine direkte Interaktion von eIF3 und IRES-RNA ermöglicht, indem eIF3 an zwei Regionen des Stem-

Loops III bindet, die Stem-Loops IIIb und IIIc (Buratti *et al.*, 1998; Sizova *et al.*, 1998). Die Anwesenheit von eIF4A, eIF4B und eIF4F ist für die Bildung von kompletten 80S-Initiationskomplexen mit CSFV dagegen nicht notwendig, jedoch sind anscheinend weitere Faktoren, die bis heute noch nicht charakterisiert wurden, an der Anlagerung der 60S-Untereinheit beteiligt (Pestova *et al.*, 1998). Auch die Faktoren eIF1 und eIF1A, die bei der eukaryotischen Translationsinitiation eine Funktion bei der Lokalisation des Initiator-AUGs übernehmen, werden für die HCV- und CSFV-Translation nicht benötigt.

3.6 Die Auswahl des Translationsstarts

Der Vorgang des „Ribosomen-Scanning“ an der zellulären mRNA, der auch bei der FMDV-Translation für das Erreichen des zweiten authentischen Startcodons angenommen wird, ist noch nicht bis ins Detail aufgeklärt. Die von M. Kozak aufgestellte Hypothese besagt, dass der ribosomale 43S-Präinitiationskomplex nach der Anlagerung an die zelluläre mRNA an dieser entlang gleitet, bis er das Startertriplett erreicht. Dabei werden mögliche Sekundärstrukturen von der Helikase-Aktivität des assoziierten Faktors eIF4A aufgelöst. Für die Erkennung des Translations-Startercodons und damit für die richtige Positionierung des 43S-Präinitiationskomplexes auf der mRNA ist eine flankierende Consensussequenz (A/GXXAUGA/G) nötig. Ausschlaggebend ist dabei die Besetzung der Positionen (ausgehend vom Adenin des AUGs als +1) -3 und +4 mit Purinen. Jede Abweichung von dieser Sequenz reduziert die Wahrscheinlichkeit einer Erkennung des AUGs und einer genauen Positionierung des ribosomalen 43S-Präinitiationskomplexes auf dem AUG (Kozak, 1989).

Am 3'-Ende der FMDV-IRES befinden sich zwei funktionelle Startcodons, die durch 81 Nukleotide getrennt sind, so dass je nach Translationsstart unterschiedlich lange L-Proteasen exprimiert werden. Die Präferenz zu einem der beiden AUGs kann vom Serotyp abhängen (Lopez de Quinto & Martinez-Salas, 1999). Es herrscht allgemein die Meinung vor, dass das 12. AUG in der FMDV-Gruppe überwiegend zum Translationsstart verwendet wird (Sangar *et al.*, 1987), obwohl es auch gegenteilige Meinungen gibt (Scheper *et al.*, 1994). Hierzu muss angemerkt werden, dass sich Resultate aus *in vivo* und *in vitro* Experimenten im Bezug auf die Wahl des Startcodons unterscheiden können und eine Erhöhung der Mg²⁺-Ionenkonzentration in der *in vitro*-Translation die Präferenz zum 11. AUG verschiebt (Sangar *et al.*, 1987).

Im Bezug auf den picornaviralen Translationsstart wurden Sequenzvergleiche angestellt, die belegen, dass bei allen sieben Serotypen der FMDV-Gruppe die flankierenden Sequenzen um das 11. AUG in der Position -3 (Pyrimidin statt Purin) von der oben beschriebenen Consensussequenz abweichen, aber um das 12. AUG mit dieser übereinstimmen (Sangar *et al.*, 1987), was mit der oben erwähnten allgemeinen Meinung konform geht, dass FMD-Viren bevorzugt das 12.AUG zum Start der Translation verwenden. Dieser Befund ist ein erster Hinweis darauf, dass das Model des „Ribosomen-Scanning“ auch auf die picornavirale Translation angewendet werden kann. Weitere Untersuchungen, die dieses Model unterstützen, zeigten eine starke Reduzierung der Effizienz des Translationsstartes am 12. AUGs, wenn zwei zusätzliche Startkodons (Distanz: 6 Nukleotide) „in-frame“ (passend zum Leseraster), flankiert von einer abweichenden beziehungsweise einer übereinstimmenden Consensus-

sequenz, zwischen dem 11. und 12. AUG einer FMDV-IRES-RNA einkloniert werden (Belsham, 1992). Nach der Deletion des IRES-Elements in diesem Konstrukt wurde das 11. AUG stärker frequentiert, da es das erste Startcodon ist, das durch das vom 5'-Ende scannende Ribosom erkannt wird (vergleichbar mit dem Vorgang bei der zellulären mRNA), obwohl die flankierende Sequenz von der Consensussequenz abweicht (Belsham, 1992). Dies wird als Indiz dafür gewertet, dass nicht nur die flankierenden Sequenzen um das 11. AUG ausschlaggebend für die geringere Präferenz als Translationsstart sind, sondern auch die räumliche Nähe des IRES-Elements bei der Platzierung des ribosomalen 43S-Präinitiationskomplexes (Belsham, 1992).

Experimente mit Deletionsmutanten zeigten, dass das 12. AUG, aber nicht das 11. AUG für die virale Replikation essentiell ist (Cao *et al.*, 1995). Insertionen zwischen den beiden funktionellen Startkodons (im FMDV-Genom des Serotyps C-S8c1), die ein Stoppcodon einbringen beziehungsweise das 12. AUG aus dem Leseraster schieben („out-of-frame“), führten zu der Vermutung, dass der Translationsstart am 12. AUG unabhängig von der Positionierung des 43S-Komplexes am 11. AUG bei der Translationsinitiation ist. Die Blockierung des 11. AUGs mit einem Antisense-Oligodesoxynukleotid (ODN) zeigt, dass dadurch die Präferenz zum 12. AUG nicht beeinträchtigt wird, umgekehrt wird aber die Expression ausgehend vom 11. AUG reduziert, was die vermutete Unabhängigkeit untermauert (López de Quinto & Martinez-Salas, 1999).

Diese Daten unterstreichen die Bedeutung des 12. AUGs, tragen aber nur bedingt zur Klärung der mechanischen Gegebenheiten bei, die dazu führen, dass dieses Startcodon bevorzugt zum Translationsstart verwendet wird.

Für die „spacer“-Region (die Nukleotidsequenz zwischen den funktionellen AUGs) des FMDV-Serotyps C-S8c1 (López de Quinto & Martinez-Salas, 1999) und für EMCV konnte eine putative Haarnadelstruktur ermittelt werden, die bei EMCV durch die Bindung des eIF4G/eIF4A-Komplexes teilweise vor chemischen Modifikationen geschützt wird (Koluaeva *et al.*, 2003). Beim FMDV-Serotyp O₁K wird eine Basenabfolge von vier Uracil-Resten, die etwa 15 Nukleotide vom 11. AUG entfernt sind und sich damit in der möglichen Haarnadelstruktur befinden, vom ribosomalen 48S-Komplex kontaktiert (Pilipenko *et al.*, 2000). Auf den ersten Blick scheint dieser Befund im Gegensatz zum Model des „Ribosomen-Scanning“ zu stehen, aber die Helikase-Aktivität des Faktors eIF4A, der auch mit dem ribosomalen 48S-Komplex assoziiert ist, würde diese Sekundärstruktur auflösen.

Ein weiterer Mechanismus zur Positionierung der ribosomalen 43S-Untereinheit könnte aus dem Umstand resultieren, dass das 3'-Ende der 18S rRNA eine mögliche Basepaarung sowohl mit dem hochkonservierten Polypyrimidintrakt (PolyY-Trakt), der zwischen dem 3'-Ende des FMDV-IRES-Elements und des 11. AUGs liegt (Beck *et al.*, 1983), als auch mit den flankierenden Sequenzen des 11. AUGs (Scheper *et al.*, 1994) eingehen könnte. Dies wäre vergleichbar mit der prokaryotischen Translation und der bei HCV.

Durch den Vergleich der möglichen Basenpaaranzahl im Polypyrimidin-Trakt und den flankierenden Sequenzen des 11. AUGs des FMDV wurde versucht, eine Korrelation zur präferenziellen Wahl des

12. AUGs zu finden. Dabei wurde angenommen, dass eine Hybridisierung des 3'-Ende der 18S rRNA an das 11. AUG, die aus den Sequenzvergleichen möglich erschien, dieses blockiert und somit die Wahl für den Translationsstart auf das 12. AUG fällt (Scheper *et al.*, 1994). Mutationen innerhalb des konservierten PolyY-Traktes zeigten eine reduzierte Translationseffizienz (Luz *et al.*, 1991), was darauf schließen lässt, dass er eine Funktion bei der Translation einnimmt. Eine Hybridisierung am Polypyrimidin-Trakt könnte durch einer potentielle Beteiligung von PTB an eine mögliche Stabilisierung des 43S-Komplexes am 11. AUG für die partielle Frequentierung dieses Startkodons sprechen. Auch vor dem 12. AUG befindet sich bei den meisten FMDV-Serotypen ein solcher Polypyrimidin-trakt. Die direkte Bindung (ohne „scanning“) an dieses Triplet zur Begründung der Präferenz scheint unter der Annahme der oben beschriebenen Strukturausbildung unwahrscheinlich, zumal die SAT-Serotypen solch ein Element nicht besitzen. Es ist eher denkbar, dass solche Basenpaarungen möglicherweise zur Stabilität der kleinen 40S-Untereinheit an der RNA bei der Zusammenführung der beiden ribosomalen Untereinheiten beitragen.

3.7 Die Wahl des Starter-AUGs in Abhängigkeit von der RNA-Menge

Bei der Untersuchung zur Steigerung der IRES-vermittelten Expression translationsdefizienter IRES-Mutanten durch die Erhöhung der RNA-Menge in einer *in vitro*-Translation wurde ein Einfluss der eingesetzten RNA-Mengen auf die Wahl des Starter-AUGs bei der Wildtyp- und den verwendeten Mutanten-IRES-RNAs beobachtet. Bei der Erhöhung der RNA-Mengen vollzieht sich ein Wechsel des Translationsstarts vom 12. AUG über eine Parität der beiden genutzten Startkodons bis hin zum bevorzugten Translationsstart am 11. AUG.

Der Grund hierfür könnte in einer Konkurrenz um limitierende Faktoren liegen könnte. Als Kandidaten kommen wegen ihrer geringen Abundanz (siehe auch Tabelle 5) im Reticulozyten-Lysat die eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF1 und eIF1A in Frage. Diese Annahme wird durch Ergebnisse aus der Gruppe um T. Pestova und C. Hellen unterstützt, die zeigten, dass die Faktoren eIF1 und eIF1A essenziell für das „Ribosomenscanning“ und die Positionierung des ribosomalen 43S-Komplexes am Startkodon einer zellulären mRNA sind (Pestova *et al.*, 1998). Aus den Befunden lässt sich ableiten, dass diese Faktoren mit hoher Wahrscheinlichkeit die gleiche Funktion bei der Positionierung der ribosomalen 43S-Untereinheit an die virale RNA übernehmen zumal sie überwiegend mit dem ribosomalen Komplex assoziiert sind.

Die meisten Erkenntnisse über diese beiden Proteine wurden durch Untersuchungen an den homologen Proteinen der Hefe gewonnen. Darüber hinaus konnten die dreidimensionalen Strukturen der humanen Faktoren mittels NMR („nuklear-magnetic-resonance“)-Spektroskopie ermittelt werden (Battiste *et al.*, 2000; Fletcher *et al.*, 1999). eIF1 ist homolog zum SUI1-Protein der Hefe und bindet mit niedriger Affinität an die p110-Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF3. Die strukturelle Analyse ergab eine kompakte Domäne, die an ribosomale Proteine und an RNA-Bindungsdomänen erinnert. Experimente mit Mutanten des homologen Hefeproteins zeigte, dass eIF1 an der Auswahl des Translationsstartkodons beteiligt ist, zumal es die Bindung des ribosomalen 43S-Komplexes an das Starterkodon einer zellulären mRNA unterstützt. Diese Bindung wird durch die Anwesenheit von eIF1A stark stimuliert (Belsham & Jackson, 2000).

eIF1A besitzt eine RNA-Bindungsdomäne, die sequenzspezifisch an RNA bindet. eIF1A ist an verschiedenen Vorgängen der Translation beteiligt. So beeinflusst es nicht nur die Dissoziation von Ribosomen, sondern ist auch an der Bindung der tRNA an die 40S-Untereinheit, an der mRNA-Bindung und am „Ribosomen-Scanning“ beteiligt. eIF1A interagiert mit dem Faktor eIF5B, der eine GTPase-Aktivität besitzt und für die Anlagerung der ribosomalen 60S-Untereinheit verantwortlich ist. Es wird angenommen, dass diese beiden Proteine den Erkennungsort der Aminoacyl-tRNA am Ribosom (die A-Stelle) besetzen können (Belsham & Jackson, 2000).

T. Pestova und Mitarbeiter konnten in Untersuchungen mit rekombinanten beziehungsweise aufgereinigten Faktoren einen Teil der oben beschriebenen Funktionen bestätigen, wie den synergistischen Effekt bei der Bildung des 48S-Komplexes oder die Dissoziation der Ribosomen auf Grund einer falschen Positionierung. Es wurde weiterhin ein positiver Einfluss von eIF1A auf die Bildung des 43S-Komplexes gezeigt, sowie auch eine stabilisierende Wirkung von eIF1 auf die Bindung von eIF1A an diesen Komplex (Pestova *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zum zusätzlichen „Ribosomen-Scanning“ bei der Translation des FMDV-Genoms wird bei EMCV nur eine direkte Platzierung des 43S-Komplexes an das Startkodon postuliert (Kaminski *et al.*, 1994; Pilipenko *et al.*, 1994). Die Untersuchungen mit diesen Initiationsfaktoren zur EMCV-Translation zeigten einen Translationsabbruch nach 15 – 17 Nukleotiden und die Dissoziation des ribosomalen 43S-Komplexes an einem AUG, das dem Initiator AUG vorgelagert ist (Pestova *et al.*, 1998).

Im Bezug auf die Translationsinitiation lassen sich FMDV und EMDV wegen der sehr ähnlichen Sekundärstrukturen der IRES gut vergleichen. Da die Startvorgänge an den AUGs bei den Viren aber unterschiedlich ablaufen, sind die zuvor beschriebenen Befunde für EMCV nur bedingt auf die Vorgänge bei der FMDV-Translation übertragbar. Allerdings wurde auch gezeigt, dass die Bildung der 48S-Komplexe an einer picornaviralen IRES-RNA bei Anwesenheit der Faktoren eIF1 und 1A stattfindet und diese auch falsch positionierte Komplexe dissoziieren lassen, was ein Grund für die präferentielle Nutzung des 12. AUGs bei FMDV wäre. Auch die Tatsache, dass eIF1A und möglicherweise auch eIF1 an RNA binden können, und eine eventuelle Positionierung von eIF1A am tRNA-Erkennungsort der ribosomalen 40S-Untereinheit (Belsham & Jackson, 2000; Pestova *et al.*, 1998), könnte so ausgelegt werden, dass sie an der Erkennung einer optimalen Consensussequenz beteiligt sind.

Faktor	Quelle	MW in kDa	Ausbeute	Molarität
eIF1	R	12.6	0.5 mg	10 nM
	C		n.d.	
eIF1A	R	16.5	1.25 mg	30.5 nM
	C		0.7 mg	
eIF2	R	124.5	3.5 mg	11 nM
	C		2.2 mg	
eIF3	R	690.4	32 mg	15 nM
	C		1 mg	
eIF4A	R	44.4	2.5 mg	749 nM
	C		128 mg	
eIF4B	R	69.2	5 mg	19.1 nM
	C		<0.5 mg	
eIF4F*	R	241.1	5.5 mg	2.9 nM
	C			
eIF4G**	R	171.6	~ 3.9 mg	~ 2.9 nM
	C			
eIF5	R	48.9	2.5 mg	9.9 nM
	C		0.75 mg	

Tabelle 5: Lokalisation und Konzentrationen eukaryotischer Initiationsfaktoren im Kaninchen-Retikulozyten-Lysat.

Die angegebenen Mengen (mg) beziehen sich auf eine Präparation aus 4000 ml Kaninchen-Retikulozyten-Lysates mit bis zu 7 Aufreinigungs- und Konzentrierungsschritten (Thomas *et al.*, 1979). Die Molekulargewichte (MW) der Faktoren wurden bei Mensch und Ratte bestimmt. * Die hier angegebenen Mengen beziehen sich auf eine Präparation aus 8000 ml (Grifo *et al.*, 1982). ** Die hier angegebenen Mengen sind aus den vorangegangenen Mengenangaben berechnet. R: Ribosomenfraktion, C: Cytoplasmafraktion

Wenn man die oben beschriebenen Funktionen von eIF1 und eIF1A im Zusammenhang mit ihrer geringen Abundanz im Retikulozyten-Lysat bedenkt, ließe sich also eine mögliche Erklärung für den in dieser Arbeit beschriebenen Wechsel des Translationsstartes bei zunehmenden RNA-Mengen finden. Durch die zunehmende Menge an RNA-Molekülen würden diejenigen ribosomalen Komplexe austitriert, die mit eIF1 und eIF1A assoziiert sind. Durch die reduzierte Abundanz der Faktoren eIF1 und eIF1A relativ zu der hohen RNA-Mengen wäre die Erkennung der hier unvorteilhaften Consensussequenz nicht möglich, und die mögliche Basenpaarung des Polypyrimidin-Traktes mit dem 3'-Ende der 18S rRNA wäre ein stabilisierender Faktor für die Bildung eines translationsfähigen 80S-Ribosoms. Damit würde bei steigender RNA-Menge die absolute Menge der am 12. AUG mit Hilfe von eIF1 und eIF1A korrekt platzierten 43S-Komplexen konstant bleiben, während die Menge der nicht auf diese Faktoren angewiesenen ribosomalen Komplexe am 11. AUG ansteigt.

Abschließend lässt sich sagen, dass fast alle erhaltenen Resultate bezüglich der Wahl des Translationsstartes auf die Consensussequenz fokussieren. Im Bezug auf Protein-Interaktionen ist der Ansatz mit den Faktoren eIF1 und eIF1A erfolgsversprechend und sollte weiter verfolgt werden.

4. Material

4.1 Bakterienstämme

***E. coli* X11-Blue**

E. coli X11-Blue (F^- :Tn10, $proA^+ B^+ lac^o$, ($lacZ$), M15/*recA1end*, *AlgyrA96*, (Nal^r)*thi*, *hsdR17* ($r_k^- m_k^-$), *supE44*, *relA1lac*) eignet sich gut für die Klonierung unmethylierter DNA. Der EndA - Phenotyp ermöglicht die Präparation von DNA mit sehr hoher Qualität.

***E. coli* HB101**

Dieser Stamm (F^- , *hsd S20* ($r_B^- m_B^-$), *recA13*, *ara-14*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20* (Sm^r), *xyl-5*, *mtl-1* (*supE44,1^-*)) ist ein *E. coli* K12/*E. coli* B-Hybrid. Er wird häufig als Rezipient in Transformationen genutzt und eignet sich sehr gut zur Darstellung größerer Mengen Plasmid-DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

***E. coli* GM2163**

E. coli GM2163 (F^- , *ara^-*, *leuB6 thi^-*, *fhuA31*, *lacY1 tsx^-*, *alk2*, *galT22*, *supE44*, *hisG4*, *rpsL136* (*StrR*), *xyl^-*, *mtl^- dam13::Tn9* (Cam^R), *dcm^-*, *mcrB1*, *hsdR2* ($r_K^- m_K^+$), *mcrA*) ist ein *E. coli*-K12-Abkömmling, der ein chromosomales Chloramphenicol-Resistenzgen trägt. Dieser Stamm ist methylierungs-defizient. In diesem Stamm klonierte Plasmid-DNA kann für Restriktionen mit methylierungs-sensitiven Enzymen verwendet werden.

***E. coli* BL21**

E. coli BL21 (F^- , *ompT*, [*lon*], *hsdS B*, ($r_B^- m_B^-$)) ist ein Stamm, der zur Expression von Genen in Expressionsvektoren, die Bakteriophagen T7-Promotoren enthalten, konstruiert wurde.

Die Bakteriophagen T7-RNA-Polymerase wird vom Bakteriophagen λ DE3 getragen, der ins Genom von BL21 integriert ist (Sambrook *et al.*, 1989).

4.2 Kulturmedien für Bakterien

Standard I-Nährbouillon (Merck, Darmstadt)

- mit 25 mg/ml Chloramphenicol und/oder 150 mg/ml Ampicillin
- mit 5 mg/ml Tetracyclin und/oder 150 mg/ml Ampicillin

Standard I-Platten

- Standard I-Nährbouillon mit 1,5 % Bacto Agar (Difco, Augsburg)

Antibiotikaplatten

- mit 25 mg/ml Chloramphenicol und/oder 150 mg/ml Ampicillin
- mit 5 mg/ml Tetracyclin und/oder 150 mg/ml Ampicillin

4.3 Plasmide

pSP449 (konstruiert von N. Lutz)

pD128, pD13 (konstruiert von M. Niepmann)

pGem2-2 β zur Verfügung gestellt von J.W. Hershey (**Pathak et. al., 1998**)

pEGFP-N1 (Clontech)

Die klonierten FMDV-Sequenzen stammen vom Serotyp O₁K (Beck *et al.*, 1983); die Nummerierung der Nukleotide erfolgte nach (Forss *et al.*, 1984).

4.4 Sequenzier- und Klonierungsprimer

Bezeichnung	Länge	Sequenz (5' - 3')
SL 41- 4Mis	49	GAC AGG CTA AGG ATG CCC TTC TCC GAC CCC GAG GTA ACA AGC GAC ACT C
SL 41- D4	49	CGA GGT AAC AAG CGA CAC TCG GGC GGA GAG AAG GGG ACT GGG ACT TCT T
SL41- 2Mis	49	GAC AGG CTA AGG ATG CCC TTC AGG TAC GGC GAG GTA ACA AGC GAC ACT C
SL41- D2	49	CGA GGT AAC AAG CGA CAC TCG CCA TCT GAG AAG GGG ACT GGC ACT TCT T
SL41- RAC	49	GAC AGG CTA AGG ATG CCC TTC AGG TBD CCC GAG GTA ACA AGC GAC ACT C
SL41- RGA	49	CGA GGT AAC AAG CGA CAC TCG GGA TCT HBG AAG GGG ACT GGC ACT TCT T
SL41- DAC	47	GAC AGG CTA AGG ATG CCC TTC AGG T CC CGA GGT AAC AAG CGA CAC TC
SL41- DGA	47	CGA GGT AAC AAG CGA CAC TCG GGA TCT GAA GGG GAC TGC GAC TTC TT
PSP449- Nsi	20	GGA ATT CCA TGG ATG CAT GC
SL 3	20	GTG AAA CCC ACT TCA AGG TG
Luz	20	GTT CCA TCC TCT AGA GGA TA
Luc	21	ATA CGA CGA TTC TGT GAT TTG
M13 rev.	21	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG
FMDV- 666 rev.	21	GAA GGG CAT CCT TAG CCT GTC
FMDV- 694 rev.	21	CGA GTG TCG CTT GTT ACC TCG

Alle Primer wurden von Carl Roth, Karlsruhe bezogen.

4.5 Enzyme

Enzym	U/ml	Puffer	Firma	Schnittsequenz
Aat II	20	NEB-4	Bio	GACGT↓C
Age I = BshTI	2	NEB-1	Bio	A↓CCGGT
AlwN I	10	NEB-4	Bio	CAGN ₃ ↓CTG
Bam HI	20	50 KCl	AGS	G↓GATCC
Bbs I	5	NEB-2	Bio	GAAGACN ₂ ↓N ₄
Bgl II	10	NEB-3	Bio	A↓GATCT
BpmI	2	NEB-3 + BSA	Bio	CTGGAG(N ₁₆)↓(N ₁₄)
Bsa I	5	NEB-4 + BSA	Bio	GGTCTCN↓
Bsm	5	NEB-2	Bio	GAATG↓CN↓
BsiW I	15	NEB-3	Bio	C↓GTACG
BstE II = Eco91I	10	NEB-3	Bio	G↓GTNACC
EcoN I	15	NEB-4	Bio	CCTN ₂ ↓N ₃ AGG
Eco RI	20	spez. Bio-P	Bio	G↓AATTC
Eco RV	12	NEB-2 + BSA	Pro	GAT↓ATC
Fsp I	5	NEB-4	Bio	TCG↓CGA
Hind III	20	NEB-2	Bio	A↓AGCTT
Hpa I	5	NEB-4	Bio	GTT↓AAC
Hpa II	10	NEB-1	Boe	C↓CGG
Kpn I	10	NEB-1	Bio	GGTAC↓C
Msc I (=Bal I)	3	NEB-4	Bio	TGG↓CCA
Nhe I	10	NEB-2 + BSA	Boe	G↓CTAGC
Nsi I	10	spec. B.	Bio	ATGCA↓T
Nsp I	10	NEB-2 + BSA	Am	PuCATG↓Py
PpuM I	2	NEB-4	Bio	PuG↓G(A/T)CCPy

Enzym	U/ml	Puffer	Firma	Schnittsequenz
Pst I	20	NEB-3	Bio	CTGCA↓G
Pvu II	10	NEB-2	Bio	CAG↓CTG
Sac II	20	NEB-4	Bio	CCGC↓GG
Sma I	20	NEB-4	Bio	CCC↓GGG
Xba I	20	NEB-2	Bio	T↓CTAGA
Xho I	20	NEB-2	Bio	C↓TCGAG
XcmI	10	NEB-2	Bio	CCANNNNN↓NNNNTGG
Xho I	20	NEB-2	Bio	C↓TCGAG

4.5.1 Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Amersham/Buchler (Am), Braunschweig; New England Biolabs (Bio), Schwalbach; Boehringer Mannheim; Angewandte Gentechnologie Systeme (AGS), Heidelberg und Promega Corp. (Pro), Heidelberg bezogen. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den Angaben der Hersteller.

Der Pfeil in der Schnittsequenz gibt die Spaltstelle an.

4.5.2 Sonstige Enzyme

Enzym	U/μl	Firma
DNA-Ligase (T4)	6 (Weiss-U)*	Biolabs, Schwalbach
DNA Polymerase (T4)	1,6 / 3,0	Biolabs, Schwalbach
Proteinase K	50 mg/ml	Merck, Darmstadt
Phosphatase alk. (CIP)	1	Boehringer, Mannheim
Rnase A	10 mg/ml	Boehringer, Mannheim
SP6 RNA Pol.	25	Biozym, Oldendorf
T7 RNA Polymerase	50	Biolabs, Schwalbach
Taq DNA Polymerase	5	Promega, Heidelberg

*1 Weiss Unit = 66.6 New England Biolabs Units

4.6 Radioaktive Chemikalien

Sämtliche Radiochemikalien wurden von Amersham Buchler, Braunschweig, bezogen.

α - [³²P]-rATP: > 400 Ci/mmol, 10mCi/ml

α - [³²P]-rCTP: > 400 Ci/mmol, 10mCi/ml

α - [³²P]-rGTP: □400 Ci/mmol, 10mCi/ml

α - [³²P]-rUTP: □400 Ci/mmol, 10mCi/ml

α - [³⁵S]-dATP: > 600 Ci/mmol, 10mCi/ml

α - [³⁵S]-Redivue Methionin: 1000 Ci/mmol, 15 mCi/ml

[¹⁴C]-Protein Marker, 5 μ Ci/ml

4.7 Nukleotide und Nukleotidanaloga

Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs): Pharmacia LKB GmbH, Freiburg

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs): Boehringer, Mannheim

Ribonukleosidtriphosphate (rNTPs): Boehringer, Mannheim

4.8 Größenstandards

4.8.1 Protein-Größenstandards

Protein	[¹⁴ C]-methylierte Proteine	(kDa) (Amersham)
Myosin	200,0	220,0
Phosphorylase B	97,4	97,4
Rinderserumalbumin	69,0	66,0
Ovalbumin	46,0	45,0
Carboanhydrase	30,0	30,0
Lysozym	14,3	14,3

4.8.2 DNA-Größenstandards

Größenmarker hergestellt von R. Füllkrug, Gießen:

pSP64 mit HindIII, DraI und Hinfl geschnitten, (Mischung der jeweils individuellen Schneideansätze im Verhältnis 1:2:4 bezüglich der eingesetzten DNA).

Längen: 2999 bp, 2288 bp, 1198 bp, 692 bp, 517 bp, 396 bp, 354 bp, 218 bp, 176 bp, 75 bp, 65 bp.

4.9 Chemikalien und anderes Material

Alle sonst nicht näher bezeichneten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Bachem, Heidelberg
 Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
 Biozym, Oldendorf
 Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
 Difco, Augsburg
 GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg
 Greiner Labortechnik, Frickenhausen
 Gibco-BRL, Eggenstein
 ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim
 Merck, Darmstadt
 Pharmacia LKB GmbH, Freiburg
 Qiagen GmbH, Hilden
 Roth, Karlsruhe
 Serva Feinbiochemika GmbH & Co., Heidelberg
 Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen. Material

4.9.1 Spezielle Chemikalien

Bromphenolblau (RNase frei)	Sigma
Coomassie-Brilliant-Blue R 250 (für Proteingele)	Serva
Dithiothreitol (DTT) (RNase frei)	Biomol
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Gibco-BRL
Formamid	Gibco-BRL
Foetal Bovine Serum (FBS)	Gibco-BRL
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])	Sigma
Luciferin	USB
Lipofectamine 2000	Invitrogen
MOPS	
NP-40	Sigma
Passiver Lyse Puffer (PLB)	Promega
Penicillin/Streptomycin	Gibco-BRL
Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate (Tween 20)	Merck
Rinder-Serumalbumin (BSA)	Merck
Sephadex G-50	Pharmacia
Spermidin	Sigma
Trypsin/EDTA	Gibco-BRL

4.9.2 *In vitro* Translationssystem

Kaninchen-Retikulozytenlysats, *micrococcus*-Nuklease behandelt, Promega, Heidelberg

4.9.3 Kits

DNA Reinigungs-Kit, Biozym, Oldendorf

Material zur Affinitätsreinigung von Plasmid-DNA:

Nukleobond, Macherey-Nagel GmbH & CoKG, Düren

GFX Micro Plasmid Prep Kit, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Ligations Kit, Eppendorf, Boulder, USA

PCR Kit:

CombiZyme DNA Polymerase Mix

Advantage 2 PCR Kits, Clontech, Palo Alto, USA

4.9.4 Fotomaterial und Röntgenfilme

Kodak X-omat XAR5 Röntgenfilme, Eastman Kodak, Rochester, NY, USA

Kodak Biomax BMS Röntgenfilme, Eastman Kodak, Rochester, NY, USA

Kodak Biomax BMR 1 Röntgenfilme, Eastman Kodak, Rochester, NY, USA

Polaroid 667 Professional, Polaroid Corporation, Cambridge, MA, USA

Cronex MD-Developer, Du Pont, Bad Homburg

Cronex MF-E Fixer, Du Pont, Bad Homburg

Filmkassetten Cronex Lightning Plus, Du Pont, Boston, USA

4.10 Geräte

Zentrifugen

Ultrazentrifuge: Optima LE-80K mit Rotor SW41, Beckman Instruments, Summerset, USA

Kühlzentrifuge: J2-21 mit den Rotoren JA 10, JA 14, JA 17, JA 20, Beckman Instruments, Summerset, USA

Kühlzentrifuge: Rotina 40R, Hettich

Tischzentrifugen: Biofuge A von Heraeus, Hanau

Biofuge fresco von Heraeus, Hanau

Gelelektrophoresesysteme

horizontales Minigel-System, AGS, Heidelberg

Minigelkammern, von Keutz, Reiskirchen

Spannungsgeber Bio-Rad Pover Pac 1000, Bio – Rad, München

Schüttler

Diffusions-Entfärbeapparatur, Desaga, Heidelberg

Vortex Genie2, Scientific Industries Bohemia, New York

Rührer Ikamag Ret, Ika-Werk, Staufen i.Br.

Sonstige Geräte

TRI-CARB 1500, Liquid Scintillation Analyser, PACKARD, A Canberra Company

PCR, Biometra GmbH, Göttingen

Ultraviolettstrahler (Handlampe) Konrad Benda, Wiesloch

Transilluminator, Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch

Polaroid MP-4 Land Camera, Polaroid Corporation, Cambridge, USA

Luminometer, Berthold, Firma

Hera safe Sterilbank, Heraeus, Hanau

Inkubator, Heraeus, Hanau

4.11 Lösungen und Puffer

Alle Puffer sind in ihren Endkonzentrationen und in den Klammern die empfohlenen Stocklösungen angegeben.

4.11.1 Puffer für DNA- und RNA-Gelelektrophorese

<u>TBE-Puffer</u>	90,0	mM	Tris-Borat pH 8,3
(Stocklösung 10 x)	2,5	mM	EDTA
<u>TAE-Puffer oder E-Puffer</u>	40,0	mM	Tris-OH pH 8,0
(Stocklösung 20 x)	40,0	mM	Natrium-Acetat
	2,0	mM	EDTA
<u>Farbmarker nativ (FM)</u>	75,0	% (v/v)	Glycerin
(Stocklösung)	0,1	mM	EDTA
	0,1	%	Bromphenolblau
	0,1	%	Xylencyanolblau
<u>Farbmarker denaturierend (FA)</u>	80,0	%	Formamid
Stocklösung	1,0	mM	EDTA
	0,1	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,1	% (w/v)	Xylencyanolblau
<u>Färbelösung</u>	2,0	µg/ml	Ethidiumbromid
(Stocklösung 10.000 x)			

4.11.2 Puffer für Protein-Gelelektrophorese

<u>Acrylamidlösung (29:1)</u>	40,0	% (w/v)	Monoacrylamid
	0,75	% (w/v)	Bisacrylamid
<u>Sammelgelpuffer</u>	125,0	mM	Tris-HCl pH 6,8
(Stocklösung 4 x)	0,1	% (w/v)	SDS

<u>Trenngelpuffer</u> (Stocklösung 4 x)	375,0 mM 0,1 %(w/v)	Tris-HCl pH 8,8 SDS
<u>Probenpuffer für Proteine</u>	125,0 mM 20,0 % 10,0 % 4,0 %(w/v) 0,02 %(w/v)	Tris-HCl pH 6,8 Glycerin β-Mercaptoethanol (frisch zusetzen) SDS Bromphenolblau
<u>Probenpuffer für Proteine</u> mit Harnstoff	125,0 mM 7,0 M 20,0 % 10,0 % 4,0 %(w/v) 0,02 %(w/v)	Tris-HCl pH 6,8 Harnstoff Glycerin β-Mercaptoethanol (frisch zusetzen) SDS Bromphenolblau
<u>Laufpuffer (TG)</u> (Stocklösung 10 x)	25,0 mM 192,0 mM 0,1 %(w/v)	Tris-OH pH 8,3 Glycin SDS
<u>Fixierer für Proteingele</u>	7,5 % 5,0 %	Essigsäure Ethanol

4.11.3 Puffer für molekularbiologische Methoden

<u>Ligasepuffer</u> (Stocklösung 10 x)	20,0 mM 5,0 mM 5,0 mM 50,0 µg/ml 0,5 mM	Tris-HCl pH 7,5 MgCl ₂ DTT BSA ATP (getrennt zugesetzt)
<u>Transkriptionspuffer</u> (Stocklösung 5 x)	50,0 mM 10,0 mM 10,0 mM	Tris-HCl pH 7,5 MgCl ₂ Spermidin
<u>Alkalische Phosphatase-(CIP) Puffer</u> (Stocklösung 10 x)	50,0 mM 0,1 mM	Tris-HCl pH 8,5 EDTA
<u>Proteinase K-Puffer</u> (Stocklösung 10 x)	50,0 mM 10,0 mM 5,0 %(w/v)	Tris-HCl pH 7,5 CaCl ₂ SDS

4.11.4 Puffer für Plasmid DNA-PräparationenPhenol, gepuffert

80,0	% (w/v)	Phenol
50,0	mM	Tris-OH
0,1	%	Hydroxychinolin

TE-Puffer

10,0	mM	Tris-HCl pH 8,0
0,1	mM	EDTA

4.11.5 Puffer und Lösungen für die DNA-Reinigung mit AffinitätsäulenSol A

(Zell-Resuspendierung)

5,0	mM	Tris-HCl pH 8,0
10,0	mM	EDTA
50,0	mM	Glucose

Sol B

(Zell-Lysierung)

0,2	M	NaOH
1,0	%	SDS

Sol C

(Neutralisation)

3,0	M	Natriumacetat
2,0	M	Essigsäure

QBT

(Equilibrierungs-Puffer)

50,0	mM	MOPS pH 7,0
750,0	mM	NaCl
15,0	%	Ethanol
0,15	%	Triton X-100

QC

(Wasch-Puffer)

50,0	mM	MOPS pH 7,0
1,0	M	NaCl
15,0	%	Ethanol

QE

(DNA Elution)

50,0	mM	MOPS pH 8,2
1,25	M	NaCl

4.11.6 Puffer für Protein-RNA-WechselwirkungenCrosslink-Puffer (für eIF4G)

(Stocklösung)

10,0	mM	HEPES, pH 7,5
1,0	mM	DTT
1,7	mM	MgCl ₂
1,0	µg/µl	tRNA
10,0	%	Glycerin
0,05	%	NP-40
0,1	mM	ATP (getrennt zugeben)

4.11.7 Puffer für die *in vitro* Translation

<u>Luciferase-Assay Reagenzien</u> (pH 7,8)	20,0 mM	Tricine
(Promega)	1,07 mM	(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ x 5 H ₂ O
	2,67 mM	MgSO ₄
	0,1 mM	EDTA
	33,3 mM	DTT
	270,0 μM	Coenzym A
	470,0 μM	Luciferin
	530,0 μM	rATP

<u>Verdünnungspuffer für</u> (pH 7,8)	25,0 mM	Glycylglycine pH 7,8
<u>Luciferasereagenz</u>	15,0 mM	MgSO ₄
(Verdünnung bis 1:4)	0,1 mM	EDTA
	33,3 mM	DTT
	1,0 mM	rATP

4.12 Materialien und Chemikalien für Zellkultur

10x PBS	1 M	NaCl
	20 mM	KCl
	60 mM	Na ₂ HPO ₄
	10 mM	NaH ₂ PO ₄

Nährmedium: DMEM (4 g/l Glukose; Pyrodoxin-HCL; L-Glutamin; ohne Natrium-pyrophosphat)

Trypsin/EDTA	0,5 %	Trypsin
(10x Stocklösung)	5,3 mM	EDTA
Penicillin/Streptomycin	10,0 mg/ml	
Fötales Rinderserum (FBS)		hitzeinaktiviert
Zellkulturflasche T ₂₅		

Zelllinie

BHK 21 (Baby Hamster Kidney)	ATCC Nummer: CRL – 1632
Organismus: <i>Mesocricetus auratus</i>	(syrischer Goldhamster)
Gewebe: Niere	

5. Methoden

5.1 Zellkultur

Um die Möglichkeit einer Kontamination durch Mikroorganismen (z.B. Bakterien, Mykoplasmen, Pilze) so gering wie möglich zu halten, ist ein steriles Arbeiten unbedingt erforderlich. Hierzu gehört der Gebrauch von sterilisierten Einmalartikeln, Desinfektion der Hände, Handschuhe und des Arbeitsplatzes (Sterilbank). Je nach Alter und Zustand der Sterilbank muss diese bis zu 30 Min. vorlaufen, um keimarme Bedingungen zu schaffen. Chemikalien und Kulturflaschen sind nur unter der Sterilbank zu verwenden.

Eingehendere Informationen zur Arbeitstechnik und Materialien sollte der einschlägigen Literatur entnommen werden. Ein Standardwerk ist z.B. Zell- und Gewebekultur von T. Lindel und J. Bauer, erschienen im Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

5.1.1 Nährmedium

Je nach Zellart ist ein geeignetes Nährmedium mit entsprechenden Zusätze zu wählen.

Für ein optimales Zellwachstum von BHK 21 Zellen zu einer Monolayer-Kultur wird dem Nährmedium (DMEM) Fötale Rinderserum (FBS) (10% Endkonzentration) und Antibiotika (Penicillin/Streptomycin 100 µg/ml) zugegeben. Dieses sollte bei häufigem Gebrauch bei + 4 °C gelagert werden.

Ansonsten ist eine Lagerung bei -20 °C zu empfehlen.

Vor Gebrauch des Mediums wird es auf 37°C vorgewärmt, um das Zellwachstum nicht durch einen „Kälteschock“ zu unterbrechen.

5.1.2 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen werden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und vorsichtig abzentrifugiert (1 - 3 Min. bei 5.000 UpM, RT). Der Überstand wird abgezogen und die Zellen in vorgewärmten Medium resuspendiert (behutsam auf- und abpipettieren). Anschließend werden die Zellen auf präparierte Kulturflaschen bzw. Petrischalen (mit vorgewärmten und angemessenem Volumen an Medium gefüllt) überimpft und unter einer CO₂ Atmosphäre bei 37°C im Inkubator belassen. Dort sollen sie mindestens einen Tag ruhen.

5.1.3 Mediumwechsel

Nach zwei bis drei Tagen ist ein Mediumwechsl nötig, da bestimmte Bestandteile des Mediums einschließlich der Zusätze von den Zellen metabolisiert werden oder zerfallen.

Die Kulturflaschen werden aufgeschraubt (Deckel mit der Öffnung nach unten) und das Medium mit einer Einmalpipette (Pipettierhilfe) vorsichtig abgesaugt. Bei mehreren Flaschen ist die Pipette nach fünfmaligen Gebrauch zu wechseln.

Nun wird ein adäquates Volumen an vorgewärmten Medium in die Flaschen gegeben, diese wieder verschlossen und in den Inkubator gestellt.

5.1.4 Passagieren von Monolayerkulturen (adhärente Zellen)

Das Passagieren wird notwendig, wenn eine Monolayerkultur eine Konfluenz von 100% erreicht hat.

Das heißt, der Boden der Flasche oder Schale ist völlig mit Zellen bedeckt.

Das Medium wird abgesaugt und die Zellen mit warmer 1x PBS-Lösung gewaschen. 1 ml einer 1 x Trypsin/EDTA-Lösung in die Flasche (T_{25}) geben, so dass der Boden gerade bedeckt ist, und die Flasche ca. 15 Min. bei 37°C inkubieren. Um die Trypsinierung zu inhibieren gibt man 2 - 3 ml Vollmedium dazu, da das FBS im Medium diese Reaktion stoppt.

Die Zellsuspension wird bei 500 x g für 10 Min. zentrifugiert, die Zellen in neuem Medium aufgenommen und in neue Kulturflaschen gegeben.

5.1.6 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen benutzt man Zellmedium (DMEM) mit 20% FBS und 10% DMSO (steril filtriert). Die Zellen werden trypsinisiert, behutsam abzentrifugiert, im Einfriermedium aufgenommen und zu je 1 ml in Einfrier-Röhrchen aliquotiert. Diese werden in ein Einfriergerät (Quallilab, Olivet, Frankreich) gestellt, das wie folgt konzipiert ist:

Eine verschließbare Plastikschaale wird mit 200 ml Isopropanol gefüllt. Der Halter für die Einfrier-Röhrchen wird eingesetzt und das Gefäß verschlossen. Dieses wird nun bei -20°C für mindestens 24 Stunden gelagert. Das Isopropanol gewährleistet die Abkühlung der Zellen um 1°C pro Stunde, so dass ein Teil der Zellen die Einfrierprozedur unbeschadet überleben. Danach können die Zellen in flüssigem Stickstoff für mehrere Jahre gelagert werden.

5.2 Mikrobiologische Methoden

5.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Stammpplatten

Die Stammhaltung von *E. coli* erfolgt auf Platten mit Standard-I-Nährmedium. Zur Selektionierung der gewünschten Klone werden dem Nährmedium, je nach Art des Stammes, Antibiotika zugesetzt. Die Kultivierung der Stämme HB101 und BL21 erfolgt ohne Antibiotika. Der Stamm *E. coli* GM2163 wird in Gegenwart von Chloramphenicol kultiviert, während der Bakterienstamm X11-blue auf Tetracyclin-platten kultiviert wird. Mit pSP- und pDS-Vektoren transformierte Bakterienstämme, die auf ihrem Plasmid eine Ampicillinresistenz tragen, werden zusätzlich auf Ampicillin selektioniert. Die Antibiotika werden in einer Konzentration von 150 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Chloramphenicol bzw.

5 µg/ml Tetracyclin dem Medium zugesetzt. Nach dem Ausplattieren der Bakterienzellen werden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Aufbewahrung der Platten erfolgt bei einer Temperatur von 4°C.

Flüssigkulturen

Die Kultivierung von *E. coli* Stämmen und deren Transformanten erfolgt unter ausreichender Belüftung und, je nach Art des Stammes, gegebenenfalls in Anwesenheit von Antibiotika (150 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Chloramphenicol, 5 µg/ml Tetracyclin). Als Medium dient Standard-I-Nährmedium. Optimales Wachstum der Bakterien erfolgt bei 37°C bis zu einer Dichte von 1 - 2 x 10⁹ Zellen/ml (stationäre Kultur).

Herstellung von Glycerin-Stocks von Bakterien

Glycerol-Stocks werden angelegt, um Bakterien über Jahre aufzubewahren. Dazu mischt man 0,8 ml einer Übernacht-Kultur mit 0,2 ml Glycerin (87% - 100%). Die Bakterien werden bei -20°C oder -70°C eingefroren und sind in dieser Form über mehrere Jahre lagerbar. Rekultiviert werden die gefrorenen Zellen, indem mit einer abgeflamten und abgekühlten Impfnadel etwas des tiefgefrorenen Glycerol-Stocks aufgenommen wird und auf Standard-I-Platten ausplattiert wird. Der Rest des Glycerol-Stocks soll beim Entnehmen der Zellen nicht auftauen.

5.2.2 Transformation von *E. coli*

Herstellung kompetenter Zellen

Die hier beschriebene CaCl₂-Methode zur Transformation kompetenter Zellen stellt eine Modifikation der von (Herrmann et al., 1980) beschriebenen Methode dar. Die Zellen einer Übernacht-Kultur werden mit Standard-I-Nährmedium 1:100 verdünnt und für weitere 1 - 1 1/2 Stunden bei 37°C bis zu einer Dichte von 1 - 2 x 10⁸ Zellen/ml inkubiert. Anschließend werden die Zellen pelletiert (5 Min. bei 4.000 UpM, 4°C) und in ½ Ausgangsvolumen eiskalter 30 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer 30 - 60 Min. Inkubation auf Eis werden die Zellen erneut pelletiert (5 Min., 4.000 UpM, 4°C) und in 1/20 Volumen eiskalter 30 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen. Die hergestellten kompetenten Zellen können direkt zur Transformation eingesetzt werden oder für 2 - 3 Tage ohne wesentliche Verschlechterung der Transformationseffizienz auf Eis aufbewahrt werden.

Transformation kompetenter Zellen (Bakterien)

Für die Transformation werden 0,01 - 0,001 pmol Plasmid-DNA oder Ligationsansätze (0,05 - 0,1 pmol) mit ca. 200 µl kompetenten Zellen für 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 Sek., 42°C) und kurzer Abkühlung auf Eis werden die kompetenten Bakterienzellen ohne Selektionsdruck, also ohne Antibiotika, mit ca. 1 ml Standard-I-Nährmedium versetzt und 45 Min. bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden vorsichtig pelletiert und der Überstand bis auf einen Rest dekantiert. Im restlichen Überstand werden die Zellen resuspendiert und auf Antibiotikaplatten ausplattiert.

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

Phenol-Extraktion, Chloroform-Extraktion, Ethanolpräzipitation

Mit Hilfe der Phenol-Extraktion ist es möglich, Nukleinsäuren von Proteinen zu trennen. Die hier beschriebene Methode bezieht sich auf größere Ausgangsvolumina, die zur Maxipräparation verwendet werden. Allerdings kann die Methode bis auf geringfügige Abweichungen auch zur Reinigung kleinerer Mengen Nukleinsäure angewendet werden. Der DNA-Präparationsansatz wird mit einem Volumen Phenol versetzt, gevortext, 5 Min. auf Eis inkubiert und zentrifugiert (5 Min., 8.000 UpM, 4°C). Denaturierte Proteine befinden sich in der unteren organischen

Phase und in der Interphase, während die DNA in der oberen wäßrigen Phase gelöst ist. Die DNA-haltige Phase wird vorsichtig abgehoben und mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) gemischt. Durch das Chloroform wird die Phasentrennung verbessert und zusätzlich Fette aus der wäßrigen Phase entfernt. Der Ansatz wird nochmals gut gemischt, 5 Min. auf Eis inkubiert und zentrifugiert (5 Min., 8.000 UpM, 4°C). Eine anschließende Chloroform-Extraktion dient zur Entfernung des restlichen Phenols. Durch die Zugabe von 2 Volumen 98 % Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat wird die DNA 10 Min. auf Eis präzipitiert. In Anwesenheit von einwertigen Kationen und Alkohol bilden Nukleinsäuren unlösliche Salze.

Die DNA wird in der Kühlzentrifuge (20 Min., 15.000 UpM, 4°C) pelletiert und anschließend zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wird im Exsikkator oder bei Raumtemperatur getrocknet und in TE/ RNase oder H₂O aufgenommen. Die Lagerung der gereinigten DNA erfolgt bei -20°C. Die Reinigung von Nukleinsäuren aus enzymatischen Reaktionen erfolgt durch Phenol/Chloroform-, Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation wie oben beschrieben.

Maxipräparation

Zur Isolierung und Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wird die klassische „Rapid Alkaline Plasmid Preparations“ Methode (RAPP) verwendet.

Eine 250 ml Übernacht-Kultur wird in der Kühlzentrifuge pelletiert (10 Min., 8.000 UpM, 4°C), der Überstand möglichst vollständig abgenommen und das Pellet in 10 ml Sol A resuspendiert. Der Bakterienaufschluß erfolgt in 20 ml Sol B durch kurzes Schütteln und 5 Min. Inkubation auf Eis. Die Natronlauge und das SDS in Sol B bewirken die Denaturierung der chromosomalen- und Plasmid-DNA. Im Anschluss daran wird die Lösung mit 15 ml Sol C neutralisiert, 10 - 20 Min. auf Eis inkubiert. Die Zugabe von Natriumacetat aus Sol C bewirkt die Präzipitation großer Proteinmengen, Zellmembranen und vor allem chromosomaler DNA, während die kleinen Moleküle der Plasmid-DNA in Lösung bleiben und schnell zur „supercoiled structure“ renaturieren können. Die chromosomale DNA ist nicht in der Lage, schnell zu renaturieren und bildet ein ungeordnetes Präzipitat mit den anderen Zellbestandteilen. Dann wird nochmals zentrifugiert (10 Min., 10.000 UpM, 4°C). Der Überstand wird durch einen mit Glaswolle gestopften Trichter abfiltriert und anschließend eine Phenol- Phenol/Chloroform- und Chloroform-Extraktion durchgeführt. Bei der darauffolgenden Ethanolpräzipitation kann auf eine weitere Zugabe von Salz verzichtet werden.

Aufreinigung von DNA über Nucleobond AX 100-Säulen

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur wurde in der Regel mit Nucleobond AX 100-Affinitätssäulen der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Dabei können aus 100 ml Bakterienkultur bis zu 200 µg Plasmid-DNA aufgereinigt werden. Mit dieser Methode werden zunächst die Bakterienzellen im Puffer S1 resuspendiert. Es hat sich gezeigt, dass die hier enthaltene RNase-Menge nicht ausreicht. Daher ist eine Zugabe von 5 - 10 µl RNase (10 mg/ml) zu empfehlen. Durch Natronlauge und SDS in Puffer S2 werden die Bakterien lysiert. Die chromosomale- und Plasmid-DNA denaturiert unter diesen Bedingungen. Die nachfolgende Zugabe von Natriumacetat in Puffer S3 bewirkt die Präzipitation von chromosomaler DNA und anderen Zellbestandteilen, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt und renaturiert.

Die Zellen einer 100 ml Übernacht-Kultur werden 10 Min. bei 8.000 UpM in der Kühlzentrifuge (4°C) pelletiert, der Überstand vollständig abgenommen und das Bakterienpellet in 4 ml S1 Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 4 ml S2 Puffer wird der Zentrifugenbecher vorsichtig 6 - 8 mal invertiert und nicht länger als 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Zu heftiges Schütteln während oder nach der Lyse führt durch Scherkräfte zum Bruch der chromosomalen DNA, die dann in den weiteren Schritten nicht mehr von der Plasmid-DNA

abgetrennt werden kann. Anschließend werden 4 ml S3 Puffer zugefügt und kurz 6 - 8 mal kräftig geschüttelt, bis eine homogene Suspension entsteht.

Nach 5 Min. Inkubation auf Eis wird die Lösung 25 Min. bei 10.000 UpM abzentrifugiert und die Lösung anschließend durch einen mit Wasser befeuchteten Papierfilter filtriert, um restliche Zelltrümmer von der DNA-Lösung abzutrennen. In der Zwischenzeit wird eine AX 100-Säule mit 2 ml Puffer N2 equilibriert und danach die filtrierte Lösung auf die Säule gegeben. Bei hohen Salzkonzentrationen und einem niedrigen pH-Wert haftet die DNA an der Matrix der Säule. Um die DNA möglichst vollständig an die Säule zu binden, wird das Filtrat ein zweites Mal auf die Säule aufgetragen und die Säule im Anschluss mit 2 x 4 ml Puffer N3 gewaschen. Die Elution der DNA von der Säule erfolgt mit 4 x 1 ml Puffer N5 in 2 ml Eppendorfgefäße. Aufgrund der Salzkonzentration von 1.000 mM KCl und des hohen pH-Wertes von 8,5 im Elutionspuffer löst sich die DNA von der Matrix ab und kann anschließend mit jeweils 0,7 ml Isopropanol für 10 Min. bei Raumtemperatur gefällt werden. Die Proben werden 25 Min. bei 11.000 UpM abzentrifugiert, die DNA-Pellets jeweils zweimal mit 0,5 ml 80 % Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur oder im Exsikkator getrocknet und in TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

Minipräparation

Die Zellen einer 1,5 ml Übernacht-Kultur werden pelletiert, der Überstand vollständig entfernt und das Pellet in 100 µl Sol A resuspendiert. Nach einer 5 Min. Inkubation bei Raumtemperatur werden die Zellen in 200 µl Sol B lysiert und nochmals 5 Min. auf Eis inkubiert. Die Natronlauge und das SDS in Sol B bewirken die Denaturierung der DNA. Durch Zugabe von 150 µl Sol C wird die Lösung neutralisiert. Das Kaliumacetat aus Sol C bewirkt eine sehr schnelle Ausfällung von Proteinen und hochmolekularer DNA, allerdings muß durch gemeinsames Ausflocken der DNA mit anderen Zellbestandteilen ein DNA-Ausbeuteverlust in Kauf genommen werden. Nach weiteren 25 Min. auf Eis wird die Probe pelletiert (5-10 Min., 14.000 UpM). Mit dem Überstand wird eine Phenol/Chloroform- (1:1) und Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die wäßrige Phase wird anschließend abgehoben und die DNA durch Zugabe von 2 Volumen 98 % Ethanol mindestens 15 Min. auf Eis oder bei -20°C gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 - 15 Min., 14.000 UpM) wird das Pellet 2 mal in 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer gelöst. Die durch diese Methode gereinigte Plasmid-DNA kann für Restriktionsanalysen und Sequenzierungen eingesetzt werden.

Aufreinigung von DNA über GFX-Säulen

Diese Methode ist für Übernachtskulturen von 1 - 2 ml ausgelegt. Sie ist eine schnelle und einfache Alternative zu Standardpräparationen. Die erhaltenen Mengen an DNA liegen in der Regel zwischen 3 und 6 µg.

Das Bakterienpellet wird im isotonischen Puffer (S1) gelöst, der auch RNase beinhaltet.

Mit dem alkalischen Puffer (S2) werden die Zellen lysiert und gleichzeitig die chromosomale DNA und die Proteine denaturiert. Nach 2 - 4 Min. wird der pH-Wert des Lysats mit Azetat-Puffer (S3) neutralisiert. Dieser enthält ein kaotropisches Salz, welches die Bindung der Plasmid-DNA an die Fieberglass-Matrix unterstützt. Die Lösung wird auf die Säule gegeben und für 1 - 2 Min. stehen gelassen, damit die DNA an die Matrix bindet. Die Säule wird bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert und der Durchfluss nochmals auf die Säule gegeben und nochmals zentrifugiert. Das erhöht nochmals die Ausbeute. Der alkoholische Waschpuffer entfernt die Salze und trocknet die Fiberglass-Matrix zur Elution vor (auf die Säule geben und abzentrifugieren). Der Durchfluss wird verworfen und die Säule nochmals für 1 Min. trocken zentrifugiert. Zur Elution wird Wasser oder TE-Puffer (pH 8,0) auf die Säule gegeben, die in ein neues Reaktionsgefäß überführt wird und für 1 Min. inkubiert. Dann wird

bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert (ca. 30 Sek.), die so aufgereinigte DNA kann für weitere Experimente direkt verwendet werden.

Minipräparation mit TELT-Puffer

Bakterien, die Plasmid-DNA besitzen, können durch Behandlung mit Lysozym, Triton (nichtionisches Detergenz) und Hitze aufgebrochen werden. Durch Zentrifugation können anschließend chromosomale DNA und Bakterienmembranen pelletiert werden. Die Plasmid-DNA wird dann durch Isopropanol aus dem Überstand präzipitiert. Diese Methode eignet sich zur Präparation kleiner Plasmid-DNA-Mengen aus Bakterienstämmen, die keine Endonuklease (EndA-) besitzen, z.B. X11-Blue Zellen. Die Endonuklease A wird durch das Kochen nicht vollständig inaktiviert und kann die Plasmid-DNA während der Aufreinigung (in Anwesenheit von Magnesium) oder während der Behandlung mit Restriktionsenzymen degradieren. Diese DNA-Präparation ist sehr schnell, allerdings ist die Qualität der gereinigten DNA niedriger als DNA-Präparationen aus der klassischen Minipräparation. Die Zellen einer 1,5 ml Übernacht-Kultur werden 15 - 25 Sek. bei 11.000 UpM abzentrifugiert, der Überstand vollständig abgesaugt und das Bakterienpellet in 200 µl TELT-Puffer resuspendiert. Sofort nach Zugabe von 20 µl Lysozymlösung (10 mg/ml) wird die Probe 1 Min. gekocht und anschließend 5 Min. auf Eis inkubiert. Die Proben werden erneut zentrifugiert (10 Min., 11.000 UpM). Das entstandene Pellet wird vorsichtig von der restlichen Lösung entfernt und die DNA im Überstand mit 400 µl Ethanol 15 – 30 Min. auf Eis oder –20°C gefällt. Die Probe muss nach Zugabe des Ethanols gut geschüttelt werden. Die DNA wird 15 Min. bei 14.000 UpM abzentrifugiert, das Pellet in 200 µl 80 % Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 30 µl TE/RNase-Puffer aufgenommen. Anschließend wird die Probe gevortext und mindestens 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Um restliche Partikel in der Probe zu entfernen, wird zum Schluss nochmals 1 Min. bei 11.000 UpM zentrifugiert, bevor die DNA-Präparation für Restriktionsanalysen verwendet werden kann.

Extraktion von DNA aus Agarose

Als Beispiel für eine Elution von DNA aus Agarosegel sei hier der von der Firma Biozym, Oldendorf, vertriebene Kit „Easy Pure“ erwähnt.

Zunächst wird die DNA-Bande unter UV-Licht aus dem Agarosegel knapp ausgeschnitten und ihr Volumen bestimmt (100 mg = 100 µl). Das Gelstück muss vor der Zugabe der „Bind-Matrix“ für ca. 5 Min. bei 55°C vollständig aufgelöst werden. Für eine erwartete Ausbeute an DNA von z.B. 1,5 µg werden 1,5 µl Bind-Matrix dem Ansatz zugefügt. Ein entscheidender Faktor für die Bindung der DNA an die Glasmilch-Matrix ist ein pH-Wert von 7,5 - 7,8. Dieser wird durch die Zugabe von 3 Volumen „SALT-Puffer“ eingestellt. Für eine hohe Ausbeute an DNA wird der Ansatz 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und dabei häufig sanft geschüttelt. Durch kurze Zentrifugation (nicht länger als 5 s) wird die Matrix mit der daran gebundenen DNA pelletiert, dreimal mit ca. 300 µl „Wash-Buffer“ gewaschen und das Pellet vollständig getrocknet.

Das Pellet wird in TE-Puffer resuspendiert und durch eine 5 Min. Inkubation bei Raumtemperatur die DNA von der Matrix gelöst. Durch kurze Zentrifugation wird die DNA von der Matrix getrennt, und der DNA-haltige Überstand kann als gereinigte DNA in die folgenden Reaktionen eingesetzt werden.

5.3.2 Gelfiltration von RNA

Die nicht in die RNA eingebauten Nukleotide aus einem *in vitro* Transkriptionsansatz können durch Gelfiltration (Sephadex-G50) von der RNA abgetrennt werden. Die RNA aus einem 50 µl Transkriptionsansatz wird phenol/chloroform-extrahiert und mit Ethanol gefällt. Das getrocknete RNA-Pellet wird in 100 µl TE-Puffer und

20 µl Gelauftragspuffer (FA-Puffer) gelöst und auf eine Sephadex-G50 Säule aufgetragen. Anschließend wird die RNA mit 8 mal 150 µl TE-Puffer von der Säule eluiert. Um die RNA-haltigen Fraktionen zu ermitteln, wird von jeder Fraktion 1 µl mit FA-Puffer versetzt, auf einem 6 % SDS-Polyacrylamidgel mit 6 % Harnstoff aufgetrennt und auf das Gel für 15 Min. ein Röntgenfilm aufgelegt, um die RNA Banden sichtbar zu machen. Die so ermittelten Fraktionen werden vereinigt, nochmals phenol-/chloroform- und chloroform-extrahiert und unter Zugabe von 0,3 M Natriumacetat mit Ethanol auf Eis gefällt. Die RNA wird pelletiert, zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Die RNA wird dann in H₂O oder TE-Puffer aufgenommen und kann bei -20 °C gelagert werden.

5.3.3 Enzymatische Modifikation von DNA

Restriktion von DNA

Die endonukleolytische Spaltung von DNA wird entsprechend den Standardvorschriften durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Reaktionsbedingungen werden entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. Für analytische Zwecke wird die Reaktionsdauer auf 1 – 2 Stunden beschränkt, präparative Ansätze werden mehrere Stunden oder über Nacht, also ca. 16 h, inkubiert.

Die Reaktionstemperatur wird in Abhängigkeit vom verwendeten Restriktionsenzym gewählt.

Die Vollständigkeit der Spaltung wird durch elektrophoretische Auftrennung der Fragmente über ein Agarosegel überprüft, die Reinigung der geschnittenen DNA erfolgt durch Phenol/Chloroform-Extraktion, Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanolpräzipitation unter Zugabe von Natriumacetat.

Behandlung von geschnittener DNA mit T4-DNA-Polymerase

Diese Enzym catalysiert die DNA-Synthese in 5' - 3' Richtung. Es besitzt ebenfalls eine

3'- 5'-Exonuklease Aktivität, die wesentlich höher ist, als die der DNA-Polymerase I aus *E. coli*. Mit diesem Enzym können DNA-Fragmente mit überhängenden Enden geglättet werden („blunt ends“).

Dem Reaktionsansatz werden dNTPs zur Endkonzentration von je 2,5 mM und 100 U/ml Enzym zugesetzt. Der Ansatz wird 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion, Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt. Alternativ kann das Enzym durch eine Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem Gel abgetrennt werden.

Entfernung von 5'-Phosphat-Resten

Mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (Calf Intestine Phosphatase, „CIP“) können 5'-Phosphatreste entfernt werden. Insbesondere nutzt man diese Methode, um die 5'-Phosphate von mit Restriktionsenzymen geschnittenen Vektoren zu entfernen. Dadurch wird bei der Ligation die Wahrscheinlichkeit für Rückligationen der Vektoren verringert und die Wahrscheinlichkeit für die Ligation zwischen Fragment und Vektor erhöht. Dem Restriktionsansatz werden 1/10 Volumen 10 x CIP-Puffer und alkalische Phosphatase (1 Unit CIP pro pmol DNA-Enden) zugesetzt. Nach einer Inkubation von 30 Min. bei 37°C und 30 Min. bei 50°C wird der Ansatz zum Entfernen der alkalischen Phosphatase mit Proteinase K verdaut. Gereinigt wird die DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion, Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation. Alternativ kann das Enzym durch eine Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem Gel abgetrennt werden.

Ligasereaktion

Die Ligation doppelsträngiger DNA-Moleküle erfolgt mit Bakteriophagen T4-DNA-Ligase. Dabei wird der Vektor in einer Konzentration von 3 - 5 pmol/ml eingesetzt und das Insert im molaren Verhältnis 3:1 bis 5:1 zum Vektor. Setzt man höhere Insert-Mengen ein, erhält man Multimere, bei geringeren DNA-Konzentrationen findet man häufig rückligierte Vektoren. Zu 0,03 - 0,05 pmol des Vektors und der entsprechenden Menge an Insert werden 1 µl 10 x Ligasepuffer gegeben, der Ansatz mit bidest. Wasser auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht und 0,5 U Ligase zugefügt. Die Ligation erfolgt bei 14°C über Nacht oder für 4 h bei Raumtemperatur.

Standard Ligationsansatz

1,0 µl 10 x Ligasepuffer
1,0 µl 5 mM ATP
x µl Vektor (0,03 - 0,05 pmol)
y µl Fragment
0,5 U Ligase
ad 10 µl bidest. Wasser

Blunt-End Ligation

Zur Ligation von „Blunt-End“ DNA wurde ein von der Firma 5 Prime, Boulder, USA, entwickelter Kit verwendet. Nach Angaben des Herstellers werden ca. 0,5 µg oder weniger DNA für einen 10 µl Ansatz verwendet. Eine Erhöhung der Insertmenge im Vergleich zum Vektor, oder die Dephosphorylierung des Vektors steigern die Ligationseffizienz.

Standard Ligationsansatz

0,5 µl 10 x Ligasepuffer
0,5 µl 50 mM DTT
x µl Vektor
y µl Fragment
0,25 µl T4 DNA-Ligase
ad 5 µl bidest Wasser

Der Reaktionsansatz wird zuerst 30 Min. bei 25°C und danach 10 Min. bei 65°C inkubiert. Durch leichte Zentrifugation wird das Kondensat am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt. Für die Transformation in kompetente Zellen kann der gesamte Ansatz oder nur die Hälfte davon verwendet werden.

5.3.4 Proteinase K- Verdau

Zur Entfernung von DNA-bindenden Proteinen und Enzymen, wie zum Beispiel alkalischer Phosphatase, wird der Reaktionsansatz mit Proteinase K behandelt.

Zum Ansatz gibt man 1/10 Volumen 10 x Proteinase K-Puffer und 50 µg/ml Proteinase K und inkubiert mindestens 30 Min. (oder maximal über Nacht) bei 37°C bis 56°C. Das SDS im Proteinase K-Puffer bewirkt die Entfaltung der Proteine. CaCl₂ bindet an die Proteinase K und bewirkt eine bessere Enzymaktivität. Vor weiteren Reaktionen wird die DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion, Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanolpräzipitation gereinigt. Für die Ethanolfällung wird dem Reaktionsansatz 0,2 M NaCl (anstelle von Natriumacetat) zugesetzt, um das im Proteinase K-Puffer enthaltene SDS bei der Ethanolpräzipitation in Lösung

zu halten. Alternativ kann das Enzym durch eine Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem Gel abgetrennt werden.

5.4 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Die PCR (polymerase chain reaction) dient der gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten. Neben dem DNA-„Template“ (der Matrize), das die gewünschte Zielsequenz trägt, werden in der Reaktion außerdem zwei Oligonukleotide („Primer“) benötigt, die die zu amplifizierende Sequenz zu beiden Seiten in entgegengesetzter Richtung begrenzen. Ein Zyklus der PCR-Reaktion besteht aus folgenden Schritten:

Denaturierung des DNA-Templates

Annealing („Hybridisierung“) der Primer und

Verlängerung der Primer in 5'→3' Richtung durch die DNA-Polymerase (Elongation).

Die Denaturierung des DNA-Templates erfolgt durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 94°C. Anschließend wird die Temperatur auf eine spezifische Hybridisierungs-Temperatur gesenkt, die von der Art der Primer und der DNA abhängt und in der Regel im Bereich von 40 - 65°C liegt. Die Verlängerung der Primer erfolgt durch die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt und ein Temperaturoptimum bei 72°C aufweist. Die Taq-DNA-Polymerase von Promega weist eine hohe Fehlerrate auf, so dass sie nur zur Optimierung der Bedingungen eingesetzt wird.

Dieser Zyklus wird in der PCR-Maschine dann häufig wiederholt (z.B. 25 - 45 mal), wodurch sich eine theoretisch exponentielle Vermehrung des DNA-Fragmentes ergibt.

Analytische PCR

Die analytische PCR dient zum Beispiel der Identifizierung positiver Klone nach der Transformation.

Standard Reaktionsansatz

5,0 µl Template DNA (Minipräparation)

3,0 µl 10 x Taq-Puffer

3,0 µl 25 mM MgCl₂

3,0 µl 2,5 mM dNTPs

3,0 µl 10 pmol Oligonukleotid A

3,0 µl 10 pmol Oligonukleotid B

0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/l)

ad 30 µl bidest. Wasser

Der PCR-Ansatz wird mit einem Tropfen Paraffinöl als Verdunstungsschutz überschichtet, sofern die PCR-Maschine keinen beheizbaren Deckel besitzt.

Als Standardprogramm für die Temperatur werden folgende Werte gewählt:

Denaturierung: 30 Sek. 94°C

Hybridisierung: 45 Sek. 60°C

Polymerisation: 60 Sek. 72°C

Dieser Zyklus wird 25 - 45 mal wiederholt.

Präparative PCR

Die präparative PCR wird zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten verwendet, die dann nach Behandlung mit geeigneten Restriktionsenzymen in entsprechende Vektoren ligiert werden können. Um die Mutationsraten in den Fragmenten möglichst gering zu halten, werden nicht mehr als 25 Zyklen durchgeführt. Weiterhin wird eine High-fidelity Polymerase benutzt.

Standard Reaktionsansatz:

0,1 pmol Template DNA
5,0 µl 10 x Taq-Puffer
5,0 µl 25 mM MgCl₂
5,0 µl 2,5 mM dNTPs
5,0 µl 10 pmol Oligonukleotid A
5,0 µl 10 pmol Oligonukleotid B
0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
5,0 µl 10 % DMSO
ad 50µl bidest. Wasser (20-30 µl Paraffinöl zum Überschichten).

Temperaturprogramm: ca. 20-25 Zyklen

Zu Beginn 1-2 Min. 94°C zur vollständigen Denaturierung der DNA.

30 Sek. 94°C

60 Sek. 50°C

60 Sek. 72°C

Anschließend nochmals 2-5 Min. 72°C zum Auffüllen noch unvollständiger Stränge.

Zielgerichtete Mutagenese mit PCR

Diese von Higuchi beschriebene Methode erlaubt es, mittels PCR-Technik punktgenaue Mutationen in Form von Deletionen, Transversionen oder Insertionen in einer bestimmten DNA-Sequenz einzufügen. Die Technik beruht auf einer zweistufigen PCR (Abb. 28) (Higuchi *et al.*, 1988).

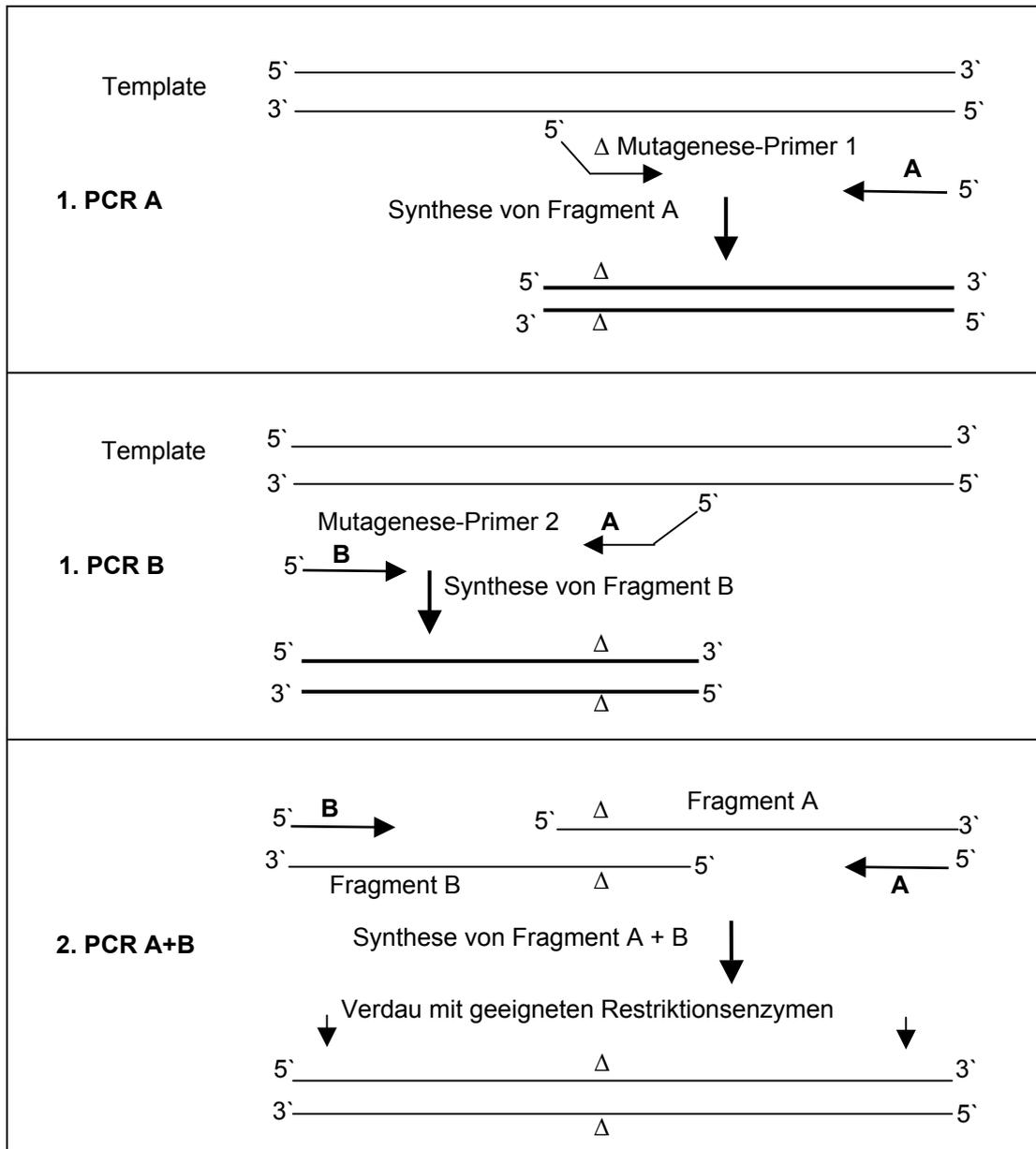


Abbildung 28: Schematische Darstellung der zielgerichteten PCR-Mutagenese.

Die Methode beruht auf zwei aufeinander folgende PCR-Reaktionen. In der ersten Stufe werden die gewünschten Mutationen in zwei DNA-Stränge eingefügt und in der zweiten Stufe werden diese Fragmente vereinigt. Im Einzelnen läuft diese Technik wie folgt ab: Benötigt werden zwei Mutageneseprimer (5'-Primer = 1; 3'-Primer = 2), welche die entsprechenden Mutationen tragen, sowie zwei flankierende Primer (5'-Primer = B; 3'-Primer = A). In einer ersten PCR werden die Fragmente A und B generiert, wobei die gewünschte Mutation in diese Fragmente eingefügt wird. Die beiden flankierenden Primer A und B werden im Vergleich zu den Mutageneseprimern in einem 10–100 fachen Überschuss in die Reaktion eingesetzt, so dass der mutierte Strang häufiger generiert wird. In der folgenden „Sekundär“-PCR wird dadurch die Hybridisierung der beiden DNA-Fragmente begünstigt und die Menge des Gesamtfragmentes erhöht. Die DNA-Fragmente A und B werden über ein analytisches Agarosegel gereinigt. Anschließend werden jeweils 150 ng der gereinigten DNA-Fragmente in die zweite PCR (50 μ l) eingesetzt und mit den beiden flankierenden Primern (A und B) ein entsprechend größeres Fragment synthetisiert, welches die gewünschte Mutation enthält. Dieses so gewonnene Fragment wird mit geeigneten Restriktionsendonukleasen nachgeschnitten und in die entsprechenden Vektoren ligiert. Die erstellten Klone werden durch Sequenzierung überprüft.

5.5 *In vitro* Transkription und *in vitro* Translation

5.5.1 *In vitro* Transkription mit SP6-Polymerase

Das Protokoll zur *in vitro* Transkription durch SP6-RNA-Polymerase (aus Salmonella-Phagen) entspricht im wesentlichen der von (Krieg & Melton, 1984) beschriebenen Methode (Krieg & Melton, 1984). Verwendet der durch die SP6-RNA-Polymerase erkannt wird. Diese Vektoren müssen vor Beginn der Transkription vollständig durch ein geeignetes Restriktionsenzym linearisiert werden, wodurch bei der Transkription sogenannte „run-off“-Transkripte entstehen. Die einzelnen Komponenten des Transkriptionsansatzes werden bei Raumtemperatur pipettiert, da das Spermidin aus dem Transkriptionspuffer bei 0°C zur Präzipitation der Template-DNA führen würde.

Standard Transkriptionsansatz

linearisierte Template-DNA (ca. 0,5 µg), (nach MELTON 20-40 µg/ml = 1 µg/50µl)
5,0 µl 10 x SP6-Puffer (Biolabs)
5,0 µl 100 mM DTT
10,0 µl 2,5 mM rNTPs (Pharmacia)
2,0 µl SP6-RNA Polymerase (25 U/µl)
ad 50,0 µl bidest. Wasser

Der Ansatz wird für eine Stunde bei 40°C inkubiert und die Reaktion anschließend auf Eis gestoppt.

Die Konzentrationen der übrigen Komponenten werden wie oben beschrieben eingesetzt. Die Reaktion erfolgt 1 Stunde bei 37°C. Die RNA-Ausbeute der Transkriptionsreaktion wird auf einem 1%igen Agarosegel überprüft. In der Regel wurde die RNA direkt in nachfolgende Reaktionen, z.B. *in vitro* Translationen oder RNA-Kompetitionsexperimente, eingesetzt. Zur Entfernung der SP6 RNA-Polymerase aus dem Transkriptionsansatz wird die Probe phenol/chloroform- (1:1) extrahiert, chloroform-extrahiert mit 98 % Ethanol präzipitiert und die RNA in TE-Puffer oder bidest. Wasser aufgenommen.

5.5.2 Synthese radioaktiv markierter RNA

Die Herstellung intern radioaktiv markierter RNA erfolgt in Transkriptionsansätzen mit einem Endvolumen von höchstens 50 µl. Für die Synthese von z.B. [α -³²P]-rUTP markierter RNA werden 2,5 µM [α -³²P]-rUTP (400 Ci/mmol, 10 mCi/ml) eingesetzt und die Konzentration des nicht radioaktiven UTP auf 10 µM herabgesetzt. Die Konzentration der drei übrigen Nukleotide beträgt jeweils 250 µM.

Standard Transkriptionsansatz zur Synthese radioaktiv markierter RNA

linearisierte Template-DNA (ca. 0,4 µg), (nach MELTON 20-40 µg/ml = 1-2µg/ 50µl)
5,0 µl 10 x SP6-Puffer (Biolabs)
5,0 µl 100 mM DTT
5,0 µl 2,5 mM rATP, rGTP, rCTP
5,0 µl 100 µM rUTP
5,0 µl [α -³²P]-rUTP (400 Ci/mmol, 10 mCi/ml)
2,0 µl SP6-RNA-Polymerase
ad 50 µl bidest. Wasser

Der Reaktionsansatz wird für eine Stunde bei 40°C inkubiert und die Reaktion anschließend auf Eis gestoppt. Die RNA kann direkt weiterverwendet werden oder alternativ phenol/chloroform- und chloroform-extrahiert, mit 98 % Ethanol gefällt und in TE-Puffer oder bidest. Wasser aufgenommen werden. Hierbei wird der größte Teil der nicht eingebauten Nukleotide entfernt. Soll die RNA zur Untersuchung von ribosomalen Translationsinitiations-Komplexen eingesetzt werden, muss die RNA nochmals durch Gelfiltration aufgereinigt werden.

5.5.3 *In vitro* Translation

Die *in vitro* synthetisierte RNA, mit einem Luciferase-Transkript am 3'-Ende der IRES, wird in Nuklease-behandeltem Kaninchen-Retikulozytenlysat (Promega) oder anderen Translationsextrakten *in vitro* translatiert. Das in dieser Arbeit verwendete Kaninchen-Retikulozytenlysat besitzt eine vom Hersteller zugefügte Menge von 113 mM Kalium-Acetat und 0,712 mM Magnesiumchlorid, die bei der Translationsreaktion berücksichtigt wurde. Soll die Translationseffizienz verschiedener IRES-RNAs miteinander verglichen werden, so muss zuerst die RNA auf einem 1%igem Agarosegel auf ihre Integrität und Menge hin überprüft werden. Die transkribierte RNA kann direkt in die Translationsreaktion eingesetzt werden.

10 µl *in vitro* Translationsansatz beinhalten in der Regel 50 % Kaninchen-Retikulozytenlysat oder Weizenkeim-Extrakt und 0,15 - 0,25 µg RNA. Die Proben werden 60 Min. bei 30°C inkubiert, die Reaktion auf Eis gestoppt und anschließend 4 µl des Translationsansatzes für die Messung der Luciferaseaktivität im Luminometer eingesetzt.

Typischer Ansatz für *in vitro* Translation

4,4 µl Kaninchen-Retikulozytenlysat (Promega)

0,15–0,25 µg RNA (direkt aus *in vitro* Transkription)

ad 10 µl bidest. Wasser

5.5.4 Synthese radioaktiv markierter Proteine durch *in vitro* Translation

Die Synthese radioaktiv markierter Proteine erfolgt in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin durch *in vitro* Translation. In dieser Arbeit wurde zum Nachweis der Effizienz der internen Initiation der Translation ein dicistronisches System verwendet, in dem die IRES (Interne Ribosomale Eintrittsstelle) zwischen zwei Reportergenen liegt. Das 5'-Ende der IRES ist mit dem Chloramphenicol-Acetyltransferase-(CAT) Gen fusioniert, während sich am 3'-Ende das Luciferasegen befindet. Die Aktivität des ersten Reportergens (CAT) ist in diesem System ein Maß für die 5'-abhängige Translations-Initiation, während die Aktivität des zweiten Reportergens, der Luciferase, ein Maß für die interne Translations-Initiation ist. In einen 10 µl Translationsansatz werden 0,25 µg dicistronische RNA, 5 µl Kaninchen-Retikulozytenlysat (Promega), 0,4 µl [³⁵S] - Methionin eingesetzt. Der Reaktionsansatz wird 45 Min. bis 1 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wird der Translationsansatz mit 10 µl Protein-Probenpuffer (mit Harnstoff) und 10 µl bidest. Wasser versetzt, 5 Min. gekocht, einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das getrocknete Gel auf einen Röntgenfilm aufgelegt, um die radioaktiv markierten Proteine sichtbar zu machen.

5.5.5 *In vivo* Translation (Transfektion von adhärennten Zellen)

Bei der *in vivo* Translation werden eukaryotische Zellen mit einem DNA-Vektor, der ein oder zwei Reporter-Gene trägt, transfiziert.

Hierzu werden die Zellen in Mikrotiterplatten (MTP) angezogen, bis sie eine Konfluenz von etwa 90% erreicht haben. Einen Tag vor der Transfektion wird das Medium durch ein Vollmedium ersetzt, das keine Antibiotika enthält. Während der Transfektion können die Antibiotika ebenfalls in die Zelle eindringen und diese töten.

In dieser Arbeit wurde zur Transfektion Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) benutzt und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Im Vorversuch werden die BHK Zellen auf ihre Transfektionseffizienz untersucht, indem sie mit dem Plasmid pEGFP-N1 (Clontech) transfiziert werden. Dieses Plasmid codiert für das GFP („green fluorescence protein“), das bei einer Bestrahlung mit der Wellenlänge von 488 nm grün fluoresziert und durch ein Binokular gut zu erkennen ist.

In einer 12-„well“-Platte werden die Zellen angezogen (1 ml Zellsuspension/well 1 ml Zellsuspension) und mit je 1 µg dicistronischer DNA transfiziert. Die Effizienz der Transfektion ist bei einem Verhältnis von 1:2 (DNA/Lipofectamine) optimal.

Hierzu werden die DNA und das Lipofectamine™ 2000, jeweils getrennt, in 50 µl Medium (ohne Antibiotika und Serum) aufgenommen und 5 Min. bei RT inkubiert. Danach werden beide Ansätze vermischt und weitere 20 Min. bei RT inkubiert. Dadurch entstehen DNA-Lipofectamine Komplexe, die durch Trübung sichtbar werden können. Diese Komplexe sind bei RT für ca. sechs Stunden stabil.

Dieser Mix wird nun zu den Zellen gegeben und durch leichtes Schütteln in den „wells“ verteilt.

Die Zellen werden dann für 24 - 48 Stunden im Inkubator belassen.

5.5.6 Präparation eines Zellextrakts aus *in vivo* Translation

Das Medium wird abgesaugt und die adhärennten Zellen mit 1 x PBS-Lösung gewaschen.

Zur Lyse der Zellen wird nun „Passiver Lyse Puffer“ (PLB/Promega) nach Angaben des Herstellers auf die Zellen gegeben und diese in der MTP 15 Min. bei RT auf einem Schwenker inkubiert.

Das Lysat wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zelltrümmer und Kerne abzentrifugiert (30 s bei 12.000 x g). Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei – 20 °C gelagert. Nach Angaben des Herstellers bleibt die Luziferaseaktivität in dieser Puffer besonders stabil.

5.6 Nachweis der Expression des Luciferasegens

Das Luciferasegen stammt aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*. Das Genprodukt ist ein Enzym, das die Oxidation von Luciferin unter Freisetzung eines Photons katalysiert. Diese Oxidationsreaktion findet in Anwesenheit von ATP und Coenzym A statt und läßt sich *in vitro* leicht und mit hoher Empfindlichkeit nachweisen (DE WET *et al.*, 1987). Die Aktivität des Luciferase-Enzyms wird direkt im Anschluß an die *in vitro* Translation im Luminometer bestimmt. Dazu werden jeweils 4 µl eines Translationsansatzes in ein Luminometer-Röhrchen gegeben und die Lichtemission nach automatischer Injektion von 100 µl Luciferasereagenz (1:5 mit Puffer verdünnt, auf Raumtemperatur erwärmt) für 30 s gemessen. Als Leerwert wird pro Messreihe ein gleich behandelter Translationsansatz ohne RNA eingesetzt.

5.7 RNA-Protein-Wechselwirkung

5.7.1 „UV-Crosslink“-Assay: Kovalente Bindung von Proteinen an RNA

Das Protokoll für die „UV-Crosslink“-Reaktion entspricht im wesentlichen der von Pelletier & Sonenberg (1985) beschriebenen Methode (Pelletier & Sonenberg, 1985). Dabei wird durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm eine Aktivierung der Pyrimidine der RNA erreicht, die dann mit bestimmten Aminosäuren der Proteine kovalente Bindungen eingehen können (Smith, 1976).

Standardansatz für Protein-“Crosslink“

2,0 µl Kaninchen-Retikulozytenlysats (Promega)
0,5 µl tRNA (10 µg/µl)
1,0 µl rATP (20 mM)
1,0 µl MgCl₂ (10 mM)
0,8 µl KAc (1 M)
intern radioaktiv markierte IRES RNA (0,05 – 0,1 pmol)
ad 10 µl bidest. Wasser

Der Reaktionsansatz wird auf Eis zusammenpipettiert und 10 Min. bei 30°C inkubiert, um das Binden der Proteine und Ribosomen an die RNA zu ermöglichen. Anschließend werden die Proben auf eine Mikrotiterplatte übertragen und auf Eis mit einer 8 W-UV-Handlampe mit 254 nm bestrahlt, wobei die Proteine kovalent an die RNA gebunden werden. Die Ansätze werden in Eppendorfgefäße überführt, 2 µl RNase A zugefügt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Proteine, die an die RNA kovalent gebunden sind, schützen diese vor dem Abbau durch RNasen und werden selbst indirekt durch die kovalente Bindung an die RNA radioaktiv markiert. Die Ansätze werden mit 5 µl Protein-Probenpuffer versetzt, 5 Min. gekocht und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wird dreimal 15 Min. in Proteingelentfärbler geschüttelt, um freie radioaktive Nukleotide zu entfernen, und danach auf Whatman Papier im Trockner getrocknet. Die radioaktiv markierten Proteinbanden werden durch Autoradiographie nachgewiesen.

Für einen effizienten „UV-Crosslink“ von Proteinen an FMDV IRES-RNA wird folgender Reaktionsansatz verwendet:

Standardansatz für Protein-„Crosslink“ an FMDV IRES-RNA

4,4 µl Kaninchen-Retikulozytenlysats Promega)
2,0 µl 5 x Crosslink-Puffer
0,2 µl ATP (100 µM)
intern radioaktiv markierte IRES RNA (0,05 – 0,1 pmol)
ad 10 µl bidest. Wasser

Dieser Ansatz wird wie oben beschrieben weiter behandelt. Die Proben werden mit 10 µl Protein-Probenpuffer versetzt und 5 Min. gekocht. Anschließend wird der Ansatz auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteinbanden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

5.8 Gelelektrophorese

5.8.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese eignet sich gut zur Analyse von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten. Je nach Größe des zu analysierenden Fragmentes werden 1 - 2%ige Agarosegele in einer horizontalen Gelapparatur gegossen. Als Laufpuffer wird TAE-Puffer verwendet, die angelegte Stromstärke beträgt 150 - 250 mA. Die DNA wird mittels eines Farbmärkers in die Geltaschen gefüllt. Dieser Farbmärker enthält Glycerin, das ein Absinken der DNA in die Taschen ermöglicht. Zudem liefern die Farbstoffe im Märker eine visuelle Kontrolle über das Laufverhalten des Gels. Auch *in vitro*-transkribierte RNA kann über Agarosegele analysiert werden, jedoch muß zuvor die Gelapparatur gründlich gereinigt werden und autoklavierter Laufpuffer sowie autoklavierte Agarose verwendet werden, um ein möglichst

RNase-freies Arbeiten sicherzustellen. Nach der Auftrennung über das Gel werden die DNA- bzw. RNA-Fragmente im Gel nach Färbung mit Ethidiumbromid unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht.

5.8.2 Denaturierende Polyacrylamidgele zur Auftrennung von RNA

Zur Kontrolle der Integrität der RNA sowie des erfolgten Einbaus von radioaktiv markierten Nukleotiden nach *in vitro* Synthese werden denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Dazu wird 1 % des Syntheseansatzes mit Farbmärker (FA) versetzt, 3 Min. auf 80°C erhitzt und auf ein 6%iges denaturierendes Polyacrylamid-Gel (mit 7 M Harnstoff) aufgetragen. Als Laufpuffer wird autoklaviertes 1 x TBE verwendet. Die Laufzeit bei 30 mA beträgt maximal 8 Min. bzw. bis das Bromphenolblau im Farbmärker ungefähr die Mitte des Gels erreicht hat. Im Anschluß wird das Gel in Frischhaltefolie eingeschlagen und 1 Min. bzw. 5 Min. auf einem Röntgenfilm exponiert. Die unterschiedlichen Expositionszeiten dienen zur Kontrolle der Qualität (Einzel- bzw. Doppelbanden) (1 Min.) und zur Ermittlung des Prozentsatzes der nicht-eingebauten Nukleotide (5 Min.).

5.8.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Proteine

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-(SDS-PAA) Gelelektrophorese (LAEMMLI, 1970). In der Regel werden 10 - 12,5%ige Trenngele und 6%ige Sammelgele in eine vertikale Gelapparatur gegossen. Der Vernetzungsgrad von Acrylamid zu Bisacrylamid beträgt 29:1. Zu Beginn der Elektrophorese werden 10 mA pro Gel angelegt. Später wird die Stromstärke auf 15 mA pro Gel erhöht. Analytische Proteingele werden direkt nach der Auftrennung mit Coomassie Blau gefärbt. Werden radioaktiv markierte Proteine aufgetrennt, so werden die Gele zunächst 15 Min. in Proteingel-Entfärber fixiert, auf Whatman-Papier aufgezogen, getrocknet und anschließend autoradiographiert.

Trenngel 10 %, 6 ml für 1 Gel

4 x Trenngel-Puffer	1,5 ml
40% AA (29:1)	1,5 ml
H ₂ O	3,0 ml
APS (10%)	120,0 µl
TEMED	6,0 µl

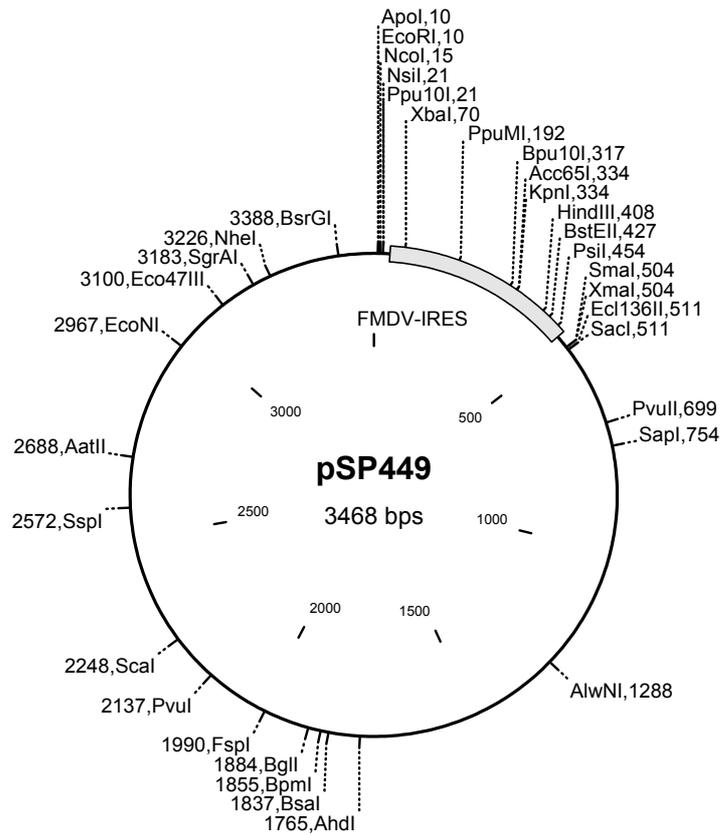
Sammelgel 6 %, 3 ml für 1 Gel

4 x Sammelge-Puffer	0,75 ml
40% AA (29:1)	0,45 ml
H ₂ O	1,8 ml
APS (10%)	120,0 µl
TEMED	3,0 µl

5.9 Autoradiographie

Die Position radioaktiver RNAs in Gelen wird durch Auflegen eines Röntgenfilms (direkte Autoradiographie) und Exposition bei Raumtemperatur ermittelt. Die Darstellung von Proteinen, die durch die Bindung an [α - ^{32}P] markierte RNA radioaktiv markiert sind, erfolgt durch Auto-radiographie bei Raumtemperatur oder bei -70°C . Die Exposition ohne Verstärkerfolien hat den Vorteil, dass Signale wesentlich schärfer werden, allerdings auch den Nachteil, dass der Hintergrund stark hervortritt. Ist die radioaktive Strahlung gering, werden Verstärkerfolien verwendet (indirekte Autoradiographie). Die Exposition erfolgt dann über Nacht bei -70°C .

6 Anhang



Plasmidkarte von pSP449 (Luz & Beck, 1990). Dieses Plasmid beinhaltet stromabwärts eines SP6-Promotors die FMDV-O₁K-IRES und codierende Sequenzen von Position 363 bis 831.

Molecule: psp449, 3468 bps DNA Circular
 Description:
 File Name: PSP449.CM5, dated 08 Nov 2003
 Printed: 1-3468 bps (Full), format Annotated: Enzymes, Genes

```

          NcoI
      EcoRI  ↓
      ApoI   ↓
1  GAATACACGG AATTCCATGG ATGCATGCCA CAAACCGTGC AACTTGAAAC TCCGCCTGGT

          XbaI
61  CTTTCCAGGT CTAGAGGGGT AACATTTTGT ACTGTGTTT ACTCCACGCT CGATCCACTA

          PpuMI
181  CCTTG GTAAC AAGGACCCAC GGGGCCGAAA GCCATGTCCT AACGGACCCA ACATGTGTGC

          KpnI
          Acc65I
301  CAAACACTGG TGACAGGCTA AGGATGCCCT TCAGGTACCC CGAGGTAACA AGCGACACTC

          HindIII
361  GGGATCTGAG AAGGGGACTG GGACTTCTTT AAAGTGCCCA GTTTAAAAAG CTTCTACGCC

          BstEII
          PstI
421  TGAATAGGTG ACCGGAGGCC GGCACCTTTC CTTTATAAC CACTGAACAC ATGAATACAA

          XmaI
          SmaI
          SacI
          Ecl136II
481  CTGACTGTTT TATCGCTCAG ATCCCCGGGC GAGCTCGAAT TAATTCGTAA TCATGGTCAT

541  AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT TGTATCCGC TCACAATTCC ACACAACATA CGAGCCGGAA

601  GCATAAAGTG TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT GAGTGAGCTA ACTCACATTA ATTGCGTTGC

          PvuII
661  GCTCACTGCC CGCTTTCAG TCGGGAAACC TGTCGTGCCA GCTGCATTAA TGAATCGGCC

          SapI
721  AACGCGCGGG GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GGCCTCTTTC CGCTTCCTCG CTCACTGACT

781  CGCTGCGCTC GGTCTGTCGG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC

841  GGTTATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA

901  AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCTG

961  ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGAATAAAA

1021  GATACCAGGC GTTTCCTCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCCG

1081  TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GCGCTTTTCT CATAGCTCAC

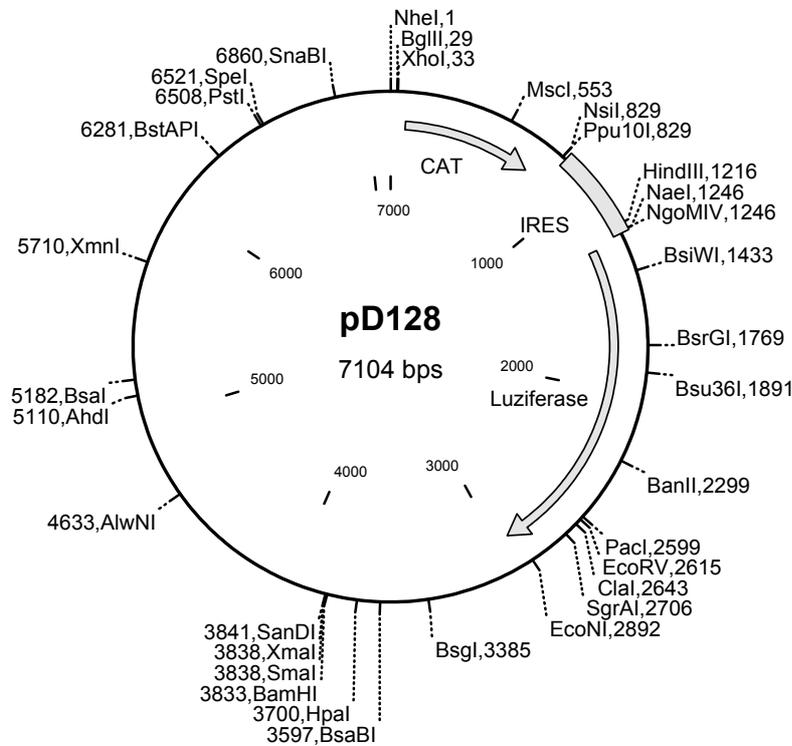
1141  GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC

1201  CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAAC TA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG

```

1261 TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG AlwNI CACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT
 1321 ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGGA
 1381 CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT
 1441 CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTTC AAGCAGCAGA
 1501 TTACGCGCAG AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTCTACG GGGTCTGACG
 1561 CTCAGTGGAA CGAAAACCTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT
 1621 TCACCTAGAT CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT
 1681 AAACCTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC
 1741 TATTTTCGTT ATCCATAGTT AhdI GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG
 1801 GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA BsaI TACCGCGAGA BpmI CCCACGCTCA CCGGCTCCAG
 1861 ATTTATCAGC AATAAACCCAG BglI CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT
 1921 TATCCGCCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG
 1981 TTAATAGTTT FspI GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT
 2041 TTGGTATGGC TTCATTCAGC TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA
 2101 TGTTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG PvuI GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG
 2161 CCGCAGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT
 2221 CCGTAAGATG CTTTTCTGTG ScaI ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA
 2281 TGCGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA
 2341 GAACTTTAAA AGTGCTCATC ATTGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAACCTC TCAAGGATCT
 2401 TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT
 2461 CTTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGAAAAAA
 2521 AGGGAATAAG GGCGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT SspI CTTCTTTTTT CAATATTATT
 2581 GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCATCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA
 2641 ATAAACAAAT AGGGGTTCAG CGCACATTTT AatII CCCGAAAAGT GCCACCTGAC GTCTAAGAAA
 2701 CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTTCGTCTCG

2761 CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG
 2821 CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG
 2881 GCGGGTGTGCG GGGCTGGCTT AACTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTACTG AGAGTGCACC
 2941 ATATCGACGC TCTCCCTTAT GCGACTCCTG EcoNI CATTAGGAAG CAGCCCAGTA GTAGGTTGAG
 3001 GCCGTTGAGC ACCGCCGCCG CAAGGAATGG TGCATGCAAG GAGATGGCGC CCAACAGTCC
 3061 CCCGGCCACG GGGCCTGCCA CCATACCCAC GCCGAAACAA Eco47III GCGCTCATGA GCCCGAAGTG
 3121 GCGAGCCCGA TCTTCCCCAT CGGTGATGTC GCGATATAG GCGCCAGCAA CCGCACCTGT
 3181 SgrAI GCGGCCGGTG ATGCCGGCCA CGATGCGTCC GCGGTAGAGG NheI ATCTGGCTAG CGATGACCCT
 3241 GCTGATTGGT TCGCTGACCA TTTCCGGGGT GCGGAACGGC GTTACCAGAA ACTCAGAAGG
 3301 TTCGTCCAAC CAAACCGACT CTGACGGCAG TTTACGAGAG AGATGATAGG GTCTGCTTCA
 3361 GTAAGCCAGA TGCTACACAA BsrGI TTAGGCTTGT ACATATTGTC GTTAGAACGC GGCTACAATT
 3421 AATACATAAC CTTATGTATC ATACACATAC GATTTAGGTG AACTATA



Plasmidkarte von pD128 (Niepmann *et al.*, 1997). Das Plasmid pD128 beinhaltet das Chloramphenicol-Acetyltransferase- (CAT) Gen und die FMDV-O₁K-IRES von Position 363 bis 831 einschließlich des 11. AUGs (Position 807). Das 11. authentische AUG der FMDV-IRES wurde direkt an das Luziferasegen fusioniert. Stromabwärts des Luziferasegens befindet sich das Intron des kleinen tAntigens von SV40 und die SV40-Polyadenylierungssignale (pA), die eine effizientere Expression in Zellkultur gewährleisten sollen. Das Plasmid steht unter der Kontrolle eines SP6-Promotors vor dem CAT-Gen, als auch eines T7-Promotors hinter dem Luziferasegen. Vor der FMDV-IRES befindet sich das Cytomegalovirus Immediate Early (CMV-IE) Promotor für die Transkription in Zellkultur.

Molecule: pD128, 7104 bps DNA Circular
 Description:
 File Name: PD128.CM5, dated 08 Nov 2003
 Printed: 1-7104 bps (Full), format Annotated: Enzymes, Genes

```

      XhoI
      |
      v
      BglIII
      |
      v
1  GCTAGCGATT TAGGTGACAC TATAGAATAG ATCTCGAGAG CTTGGCGAGA TTTTCAGGAG

61  CTAAGGAAGC TAAAATGGAG AAAAAAATCA CTGGATATAC CACCGTTGAT ATATCCCAAT
      >>>.....CAT.....>>>

121  GGCATCGTAA AGAACATTTT GAGGCATTTT AGTCAGTTGC TCAATGTACC TATAACCAGA
      >>.....CAT.....>>

181  CCGTTCAGCT GGATATTACG GCCTTTTTTAA AGACCGTAAA GAAAAATAAG CACAAGTTTT
      >>.....CAT.....>>

241  ATCCGGCCTT TATTCACATT CTTGCCCGCC TGATGAATGC TCATCCGGAA TTCCGTATGG
      >>.....CAT.....>>

301  CAATGAAAGA CGGTGAGCTG GTGATATGGG ATAGTGTTCA CCCTTGTTAC ACCGTTTTTC
      >>.....CAT.....>>

361  ATGAGCAAAC TGAAACGTTT TCATCGCTCT GGAGTGAATA CCACGACGAT TTCCGGCAGT
      >>.....CAT.....>>

421  TTCTACACAT ATATTCGCAA GATGTGGCGT GTTACGGTGA AAACCTGGCC TATTTCCCTA
      >>.....CAT.....>>

481  AAGGGTTTAT TGAGAATATG TTTTTCGTCT CAGCCAATCC CTGGGTGAGT TTCACCAGTT
      >>.....CAT.....>>

      MscI
      |
      v
541  TTGATTTAAA CGTGGCCAAT ATGGACAAC TCTTCGCCCC CGTTTTACCC ATGGGCAAAT
      >>.....CAT.....>>

601  ATTATACGCA AGGCGACAAG GTGCTGATGC CGCTGGCGAT TCAGGTTTAT CATGCCGTCT
      >>.....CAT.....>>

661  GTGATGGCTT CCATGTCGGC AGAATGCTTA ATGAATTACA ACAGTACTGC GATGAGTGGC
      >>.....CAT.....>>

721  AGGGCGGGGC GTAATTTTTT TAAGGCAGTT ATTGGTGCCC TTAAACGCCT GGTGCTACGC
      >>.....CAT.....>>

      Ppu10I
      |
      v
      NsiI
      |
      v
781  CTGAATAAGT GATAATAAGC GGATGAATGG CAGAAATTCG CCGGATCTAT GCATGCCACA

841  AACCGTGCAA CTTGAAACTC CGCCTGGTCT TTCCAGGTCT AGAGGGGTAA CATTTTGTAC

901  TGTGTTTGAC TCCACGCTCG ATCCACTAGC GAGTGTTAGT AGCGGTACTG CTGTCTCGTA

961  GCGGAGCATG TTGGCCGTGG GAACACCTCC TTGGTAACAA GGACCCACGG GGCCGAAAGC

1021  CATGTCCTAA CGGACCCAAC ATGTGTGCAA CCCAGCACG GCAGCTTAC TGTGAAACCC
  
```

1081 ACTTCAAGGT GACATTGATA CTGGTACTCA AACACTGGTG ACAGGCTAAG GATGCCCTTC

1141 AGGTACCCCG AGGTAACAAG CGACACTCGG GATCTGAGAA GGGACTGGG ACTTCTTTAA

1201 AGTGCCAGT HindIII TAAAAAGCT TCTACGCTG AATAGGTGAC NgoMIV CGGAGGCCGG NaeI CACCTTTCCT

1261 TTTATAACCA CTGAACACAT GGAAGACGCC AAAAACATAA AGAAAGGCC GGCGCCATTC
 »».....Luziferase.....»

1321 TATCCTCTAG AGGATGGAAC CGCTGGAGAG CAACTGCATA AGGCTATGAA GAGATACGCC
 ».....Luziferase.....»

1381 CTGGTTCCTG GAACAATTGC TTTTACAGAT GCACATATCG AGGTGAACAT BsiWI CACGTACGGC
 ».....Luziferase.....»

1441 GAATACTTCG AAATGTCCGT TCGGTTGGCA GAAGCTATGA AACGATATGG GCTGAATACA
 ».....Luziferase.....»

1501 AATCACAGAA TCGTCGTATG CAGTGAAAAC TCTCTTCAAT TCTTTATGCC GGTGTTGGGC
 ».....Luziferase.....»

1561 GCGTTATTTA TCGGAGTTGC AGTTGCGCCC GCGAACGACA TTTATAATGA ACGTGAATTG
 ».....Luziferase.....»

1621 CTCAACAGTA TGAACATTTT GCAGCCTACC GTAGTGTTTG TTTCCAAAAA GGGGTTGCAA
 ».....Luziferase.....»

1681 AAAATTTTGA ACGTGCAAAA AAAATTACCA ATAATCCAGA AAATTATTAT CATGGATTCT
 ».....Luziferase.....»

1741 AAAACGGATT ACCAGGGATT BsrGI TCAGTCGATG TACACGTTTCG TCACATCTCA TCTACCTCCC
 ».....Luziferase.....»

1801 GGTTTTAATG AATACGATTT TGTACCAGAG TCCTTTGATC GTGACAAAAC AATTGCACTG
 ».....Luziferase.....»

1861 ATAATGAATT CCTCTGGATC TACTGGGTTA Bsu36I CCTAAGGGTG TGGCCCTTCC GCATAGAACT
 ».....Luziferase.....»

1921 GCCTGCGTCA GATTCTCGCA TGCCAGAGAT CCTATTTTTG GCAATCAAAT CATTCCGGAT
 ».....Luziferase.....»

1981 ACTGCGATTT TAAGTGTGT TCCATTCCAT CACGGTTTTG GAATGTTTAC TACACTCGGA
 ».....Luziferase.....»

2041 TATTTGATAT GTGGATTTTC AGTCGTCTTA ATGTATAGAT TTGAAGAAGA GCTGTTTTTA
 ».....Luziferase.....»

2101 CGATCCCTTC AGGATTACAA AATTCAAAGT GCGTTGCTAG TACCAACCCT ATTTTCATTC
 ».....Luziferase.....»

2161 TTCGCCAAAA GCACTCTGAT TGACAAAATAC GATTTATCTA ATTTACACGA AATTGCTTCT
 ».....Luziferase.....»

2221 GGGGGCGCAC CTCTTTCGAA AGAAGTCGGG GAAGCGGTTG CAAAACGCTT CCATCTTCCA
 ».....Luziferase.....»

2281 BanII
 GGGATACGAC AAGGATATGG GCTCACTGAG ACTACATCAG CTATTCTGAT TACACCCGAG
 ».....Luziferase.....»

2341 GGGGATGATA AACCGGGCGC GGTCGGTAAA GTTGTTCAT TTTTGAAGC GAAGGTTGTG
 ».....Luziferase.....»

2401 GATCTGGATA CCGGGAAAAC GCTGGGCGTT AATCAGAGAG GCGAATTATG TGTCAGAGGA
 ».....Luziferase.....»

2461 CCTATGATTA TGTCCGGTTA TGTAACAAT CCGGAAGCGA CCAACGCCTT GATTGACAAG
 ».....Luziferase.....»

2521 GATGGATGGC TACATTCTGG AGACATAGCT TACTGGGACG AAGACGAACA CTTCTTCATA
 ».....Luziferase.....»

2581 PacI EcoRV
 GTTGACCGCT TGAAGTCTTT AATTAAATAC AAAGGATATC AGGTGGCCCC CGCTGAATTG
 ».....Luziferase.....»

2641 Clai
 GAATCGATAT TGTTACAACA CCCCAACATC TTCGACGCGG GCGTGGCAGG TCTTCCCGAC
 ».....Luziferase.....»

2701 SgrAI
 GATGACGCCG GTGAACTTCC CGCCGCCGTT GTTGTTTTGG AGCACGGAAA GACGATGACG
 ».....Luziferase.....»

2761 GAAAAAGAGA TCGTGGATTA CGTCGCCAGT CAAGTAACAA CCGCGAAAAA GTTGC GCGGA
 ».....Luziferase.....»

2821 GGAGTTGTGT TTGTGGACGA AGTACCGAAA GGTCTTACCG GAAAACTCGA CGCAAGAAAA
 ».....Luziferase.....»

2881 EcoNI
 ATCAGAGAGA TCCTCATAAA GGCCAAGAAG GCGGAAAAGT CCAAATTGTA AAATGTA ACT
 ».....Luziferase.....»»

2941 GTATTCAGCG ATGACGAAAT TCTTAGCTAT TGTAATGACT CTAGAGGATC TTTGTGAAGG

3001 AACCTTACTT CTGTGGTGTG ACATAATTGG ACAAACCTACC TACAGAGATT TAAAGCTCTA

3061 AGGTAAATAT AAAATTTTTTA AGTGTATAAT GTGTAAACT ACTGATTCTA ATTGTTTGTG

3121 TATTTTAGAT TCCAACCTAT GGAAGTATG AATGGGAGCA GTGGTGAAT GCCTTTAATG

3181 AGGAAAACCT GTTTTGCTCA GAAGAAATGC CATCTAGTGA TGATGAGGCT ACTGCTGACT

3241 CTCAACATTC TACTCCTCCA AAAAAGAAGA GAAAGGTAGA AGACCCCAAG GACTTTCCTT

3301 CAGAATTGCT AAGTTTTTTG AGTCATGCTG TGTTTAGTAA TAGAACTCTT GCTTGCTTTG

3361 BsgI
 CTATTTACAC CACAAAGGAA AAAGCTGCAC TGCTATACAA GAAAATTATG GAAAAATATT

3421 CTGTAACCTT TATAAGTAGG CATAACAGTT ATAATCATAA CATACTGTTT TTTCTTACTC

3481 CACACAGGCA TAGAGTGTCT GCTATTAATA ACTATGCTCA AAAATTGTGT ACCTTTAGCT
 3541 TTTTAATTTG TAAAGGGGTT AATAAGGAAT ATTTGATGTA TAGTGCCTTG ACTAGAGATC
 3601 BsaBI
 ATAATCAGCC ATACCACATT TGTAGAGGTT TTAAGTGGCTT TAAAAACCT CCCACACCTC
 3661 CCCCTGAACC TGAAACATAA AATGAATGCA ATTGTTGTTG HpaI
 TTAAGTGGCTT TATTGCAGCT
 3721 TATAATGGTT ACAAATAAAG CAATAGCATC ACAAATTTCA CAAATAAAGC ATTTTTTTCA
 3781 CTGCATTCTA GTTGTGGTTT GTCCAAACTC ATCAATGTAT CTTATCATGT BamHI
 CTGGATCCCC XmaI
SmaI
 3841 SanDI
 GGGTCCCTAT AGTGAGTCGT ATTAGCTTGG CGTAATCATG GTCATAGCTG TTTCCCTGTGT
 3901 GAAATTGTTA TCCGCTCACA ATTCCACACA ACATACGAGC CGGAAGCATA AAGTGTAAG
 3961 CCTGGGGTGC CTAATGAGTG AGCTAACTCA CATTAATTGC GTTGCCTCA CTGCCCCTT
 4021 TCCAGTCGGG AAACCTGTCG TGCCAGCTGC ATTAATGAAT CGGCCAACGC GCGGGGAGAG
 4081 GCGGTTTGCG TATTGGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTCG
 4141 TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT
 4201 CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA
 4261 AAAAGGCCGC GTTGTGGCG TTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAAA
 4321 ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC
 4381 CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT
 4441 CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA
 4501 GTTCGGTGTA GGTCGTTTCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCCG
 4561 ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT
 4621 AlwNI
 CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GCGGTTGCTA
 4681 CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT
 4741 GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC
 4801 AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTT TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA
 4861 AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA

6421 GGGGATGTGC TGCAAGGCGA TTAAGTTGGG TAACGCCAGG GTTTTCCCAG TCACGACGTT

6481 GTAAAACGAC GGCCAGTGAA TTTTCGACCTG PstI CAGATTATTG SpeI ACTAGTTATT AATAGTAATC

6541 AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCCATA TATGGAGTTC CGCGTTACAT AACTTACGGT

6601 AAATGGCCCG CCTGGCTGAC CGCCCAACGA CCCCCGCCCT TTGACGTCAA TAATGACGTA

6661 TGTTCACATA GTAACGCCAA TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG AGTATTTACG

6721 GTAAACTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA

6781 CGTCAATGAC GGTAATGGC CCGCCTGGCA TTATGCCAG TACATGACCT TATGGGACTT

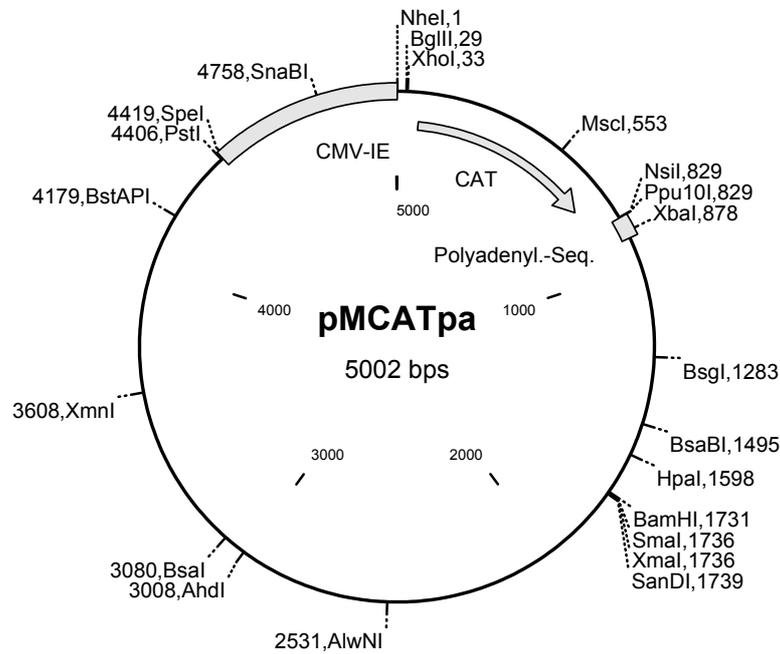
6841 TCCTACTTGG CAGTACATCT SnaBI ACGTATTAGT CATCGCTATT ACCATGGTGA TCGGTTTTTG

6901 GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT TGA CTCACGG GGATTTCCAA GTCTCCACCC

6961 CATTGACGTC AATGGGAGTT TGT TTTGGTA CAAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCG

7021 TAACAACTCC GCCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT

7081 AAGCAGTTTA GTGAACCGTC AGAA



Plasmidkarte von pMCATpa. Das Plasmid pMCATpa ist ein Derivat von Plasmid pD128. Es beinhaltet das Chloramphenicol-Acetyltransferase- (CAT) Gen. Stromabwärts des CAT-Gens befindet sich das Intron des kleinen t-Antigens von SV40 und die SV40-Polyadenylierungssignale (pA), die eine effizientere Expression in Zellkultur gewährleisten sollen. Dieses Konstrukt steht unter der Kontrolle sowohl eines SP6-Promotors vor dem CAT-Gen, als auch einem stromabwärtsgelegenen T7-Promotors. Vor der FMDV-IRES befindet sich der Cytomegalovirus Immediate Early (CMV-IE) Promotor für die Transkription in Zellkultur.

Molecule: pMCATpa, 5002 bps DNA Circular
 Description: Pd128* Circularized
 File Name: PMCATPA.CM5, dated 08 Nov 2003
 Printed: 1-5002 bps (Full), format Annotated: Enzymes, Genes

```

      NheI                               BglII XhoI
1  GCTAGCGATT TAGGTGACAC TATAGAATAG ATCTCGAGAG CTTGGCGAGA TTTTCAGGAG

61  CTAAGGAAGC TAAAATGGAG AAAAAAATCA CTGGATATAC CACCGTTGAT ATATCCCAAT

121 GGCATCGTAA AGAACATTTT GAGGCATTTT AGTCAGTTGC TCAATGTACC TATAACCAGA

181 CCGTTCAGCT GGATATTACG GCCTTTTTTAA AGACCGTAAA GAAAAATAAG CACAAGTTTT

241 ATCCGGCCTT TATTCACATT CTTGCCCGCC TGATGAATGC TCATCCGGAA TTCCGTATGG

301 CAATGAAAGA CGGTGAGCTG GTGATATGGG ATAGTGTTCA CCCTTGTTAC ACCGTTTTTCC

361 ATGAGCAAAC TGAAACGTTT TCATCGCTCT GGAGTGAATA CCACGACGAT TTCCGGCAGT

421 TTCTACACAT ATATTCGCAA GATGTGGCGT GTTACGGTGA AAACCTGGCC TATTTCCCTA

481 AAGGGTTTAT TGAGAATATG TTTTTCGTCT CAGCCAATCC CTGGGTGAGT TTCACCAGTT

541 TTGATTTAAA MscI ATGGACAAC TCTTCGCCCC CGTTTTTACC ATGGGCAAAT

601 ATTATACGCA AGGCGACAAG GTGCTGATGC CGCTGGCGAT TCAGGTTTAT CATGCCGTCT

661 GTGATGGCTT CCATGTCGGC AGAATGCTTA ATGAATTACA ACAGTACTGC GATGAGTGGC

721 AGGGCGGGGC GTAATTTTTT TAAGGCAGTT ATTGGTGCCC TTAAACGCCT GGTGCTACGC

781 CTGAATAAGT GATAATAAGC GGATGAATGG CAGAAATTCG CCGGATCTAT Ppu10I
      NsiI
841 AACCGTGCAA CTTGAAACTC CGCCTGGTCT TTCCAGGTCT XbaI AGAGGATCTT TGTGAAGGAA

901 CCTTACTTCT GTGGTGTGAC ATAATTGGAC AACTACCTA CAGAGATTTA AAGCTCTAAG

961 GTAAATATAA AATTTTTTAA TGTATAATGT GTTAAACTAC TGATTCTAAT TGTTTGTGTA

1021 TTTTAGATTC CAACCTATGG AACTGATGAA TGGGAGCAGT GGTGGAATGC CTTTAATGAG

1081 GAAAACCTGT TTTGCTCAGA AGAAATGCCA TCTAGTGATG ATGAGGCTAC TGCTGACTCT

1141 CAACATTCTA CTCCTCCAAA AAAGAAGAGA AAGGTAGAAG ACCCCAAGGA CTTTCCTTCA

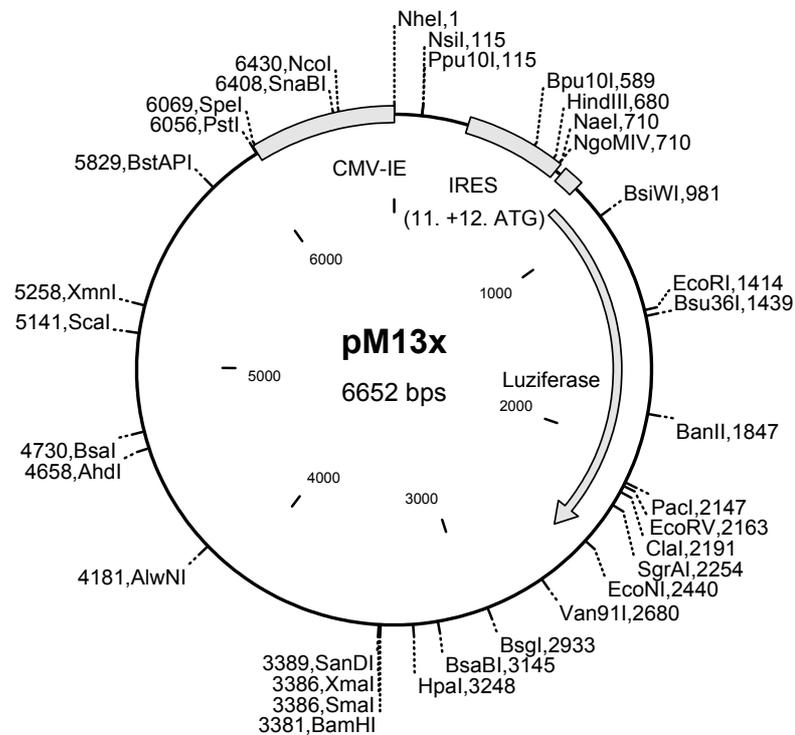
1201 GAATTGCTAA GTTTTTTGAG TCATGCTGTG TTTAGTAATA GAACTCTTGC TTGCTTTGCT

1261 ATTTACACCA CAAAGGAAAA BspI CTATACAAGA AAATTATGGA AAAATATTCT

```

1321 GTAACCTTTA TAAGTAGGCA TAACAGTTAT AATCATAACA TACTGTTTTT TCTTACTCCA
 1381 CACAGGCATA GAGTGTCTGC TATTAATAAC TATGCTCAA AATTGTGTAC CTTTAGCTTT
 1441 TTAATTTGTA AAGGGGTAA TAAGGAATAT TTGATGTATA GTGCCTGAC TAGAGATCAT BsaBI
 1501 AATCAGCCAT ACCACATTTG TAGAGGTTTT ACTTGCTTTA AAAACCTCC CACACCTCC
 1561 CCTGAACCTG AAACATAAAA TGAATGCAAT TGTGTGTGT AACTTGTTA TTGCAGCTTA HpaI
 1621 TAATGGTTAC AAATAAAGCA ATAGCATCAC AAATTCACA AATAAAGCAT TTTTTTCACT
 1681 GCATTCTAGT TGTGGTTTGT CCAAATCAT CAATGTATCT TATCATGTCT GGATCCCCGG XmaI
 1741 GTCCCTATAG TGAGTCGTAT TAGCTTGGCG TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA SmaI
 1801 AATTGTTATC CGCTCACAAT TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC BamHI SalDI
 1861 TGGGGTGCCT AATGAGTGAG CTAACTCACA TTAATTGCGT TGCCTCACT GCCCGCTTTC
 1921 CAGTCGGGAA ACCTGTCTGT CCAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAACGCGG GGGGAGAGGC
 1981 GGTTCGCGTA TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCGTT
 2041 CGGCTGCGGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA
 2101 GGGGATAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA
 2161 AAGGCCGCGT TGCTGGCGTT TTTCCATAGG CTCCGCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT
 2221 CGACGCTCAA GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GGCCTTTCCC
 2281 CCTGGAAGCT CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC
 2341 GCCTTTCTCC CTTCCGGGAA CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT
 2401 TCGGTGTAGG TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCGT TCAGCCCGAC
 2461 CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CCACTTATCG
 2521 CCACTGGCAG AlwNI CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CCGTGTCTACA
 2581 GAGTTCTTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACTACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC
 2641 GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAACAA
 2701 ACCACCGCTG GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAAA

2761 GGATCTCAAG AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC
 2821 TCACGTAAAG GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA
 2881 AATTAAAAAT GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT
 2941 TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTTCG TTCATCCATA
 3001 GTTGCCCTGAC AhdI TCCCCGTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC
 3061 AGTGCTGCAA TGATACCGCG BsaI AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC
 3121 CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCCCTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG
 3181 TCTATTAATT GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC
 3241 GTTGTTGCCA TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC
 3301 AGCTCCGGTT CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAGCG
 3361 GTTAGCTCCT TCGGTCCCTC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT GTTATCACTC
 3421 ATGGTTATGG CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT
 3481 GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC
 3541 TCTTGCCCGG CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC
 3601 ATCATTGGAA XmnI AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC
 3661 AGTTCGATGT AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC
 3721 GTTTCTGGGT GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA
 3781 CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT
 3841 TATTGTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT
 3901 CCGCGCACAT TTCCCCGAAA AGTGCCACCT GACGTCTAAG AAACCATTAT TATCATGACA
 3961 TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACGAGG CCCTTTCGTC TCGCGCGTTT CGGTGATGAC
 4021 GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT
 4081 GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG
 4141 CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC BstAPI ACCATATGCG GTGTGAAATA
 4201 CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCC ATTCGCCATT CAGGCTGCGC



Plasmidkarte des pM13x. Das Plasmid pM13x ist ein Derivat von Plasmid pD13. Es beinhaltet die FMDV-O₁K-IRES von Position 185 bis 889 einschließlich des 11. und 12. AUGs. Das 12. authentische AUG der FMDV IRES wurde direkt an das Luciferasegen fusioniert, wie in dem Konstrukt pM13. Stromabwärts des Luciferasegens befindet sich das Intron des kleinen t-Antigens von SV40 und die SV40-Polyadenylierungssignale (pA), die eine effizientere Expression in Zellkultur gewährleisten sollen. Das Luciferasegen stehen unter der Kontrolle sowohl eines SP6-Promotors (vor dem Gen), als auch eines T7-Promotors hinter dem Luciferasegen. Vor der FMDV-IRES befindet sich der Cytomegalovirus Immediate Early (CMV-IE) Promotor für die Transkription in Zellkultur.

Molecule: pM13x, 6652 bps DNA Circular
 Description:
 File Name: PM13X.CM5, dated 08 Nov 2003
 Printed: 1-6652 bps (Full), format Annotated: Enzymes, Genes

```

1   NheI
   GCTAGCGATT TAGGTGACAC TATAGAATAG GCAGTTATTG GTGCCCTTAA ACGCCTGGTG
61   CTACGCCTGA ATAAGTGATA ATAAGCGGAT GAATGGCAGA AATTCGCCGG Ppu10I
   ATCTATGCAT NsiI
121  GCGCCGTCTT TCCCGACGTT AAAGGGATGA AACCACAAGA CTTACCTTCG CTCGGAAGTA
181  AAACGACAAA CACACACAGT TTTGCCCGTT TTCATGAGAA ATGGGACGTC TGCGCACGAA
241  ACGCGCCGTC GCTTGAGGAG GACTTGTACA AACACGATCT ATGCAGGTTT CCCCAACTGA
301  CACAAACCGT GCAACTTGAA ACTCCGCCTG GTCTTTCCAG GTCTAGAGGG GTAACATTTT
361  GTACTGTGTT TGA CTCCACG CTCGATCCAC TAGCGAGTGT TAGTAGCGGT ACTGCTGTCT
421  CGTAGCGGAG CATGTTGGCC GTGGGAACAC CTCCTTGATA ACAAGGACCC ACGGGGCCGA
481  AAGCCATGTC CTAACGGACC CAACATGTGT GCAACCCCAG CACGGCAGCT T TACTGTGAA
541  ACCCACTTCA AGGTGACATT GATACTGGTA CTCAAACACT GGTGACAGGC Bpu10I
   TAAGGATGCC
601  CTTCAGGTAC CCCGAGGTAA CAAGCGACAC TCGGGATCTG AGAAGGGGAC TGGGACTTCT
661  TTAAAGTGCC CAGTTTAAAA HindIII
   AGCTTCTACG CCTGAATAGG TGACCGGAGG NgoMIV
   CCGGCACCTT NaeI
721  TCCTTTTATA ACCACTGAAC ACATGAATAC AACTGACTGT TTTATCGCTT TGGTACAGGC
781  TATCAGAGAG ATTAAAGCAC TTTTCTATC ACGCACCACA GGGAAAATGG AAGACGCCAA
841  AAACATAAAG AAAGGCCCGG CGCCATTCTA TCCTCTAGAG GATGGAACCG CTGGAGAGCA
901  ACTGCATAAG GCTATGAAGA GATACGCCCT GGTTCCTGGA ACAATTGCTT TTACAGATGC
961  ACATATCGAG GTGAACATCA BsiWI
   CGTACGCGGA A TACTTCGAA ATGTCCGTTT GGTGGCAGA
1021 AGCTATGAAA CGATATGGGC TGAATACAAA TCACAGAATC GTCGTATGCA GTGAAAACCTC
1081 TCTTCAATTC TTTATGCCGG TGTTGGGCGC GTTATTTATC GGAGTTGCAG TTGCGCCCGC
1141 GAACGACATT TATAATGAAC GTGAATTGCT CAACAGTATG AACATTTTCG AGCCTACCGT
1201 AGTGTGTTGTT TCCAAAAAGG GGTGCAAAA AATTTTGAAC GTGCAAAAAA AATTACCAAT
1261 AATCCAGAAA ATTATTATCA TGGATTCTAA AACGGATTAC CAGGGATTTT AGTCGATGTA

```

1321 CACGTTTCGTC ACATCTCATC TACCTCCCGG TTTTAATGAA TACGATTTTG TACCAGAGTC
 1381 CTTTGATCGT GACAAAACAA TTGCACTGAT EcoRI AATGAATTCC TCTGGATCTA Bsu36I CTGGGTTACC
 1441 TAAGGGTGTG GCCCTTCCGC ATAGAACTGC CTGCGTCAGA TTCTCGCATG CCAGAGATCC
 1501 TATTTTTGGC AATCAAATCA TTCCGATAC TGCGATTTTA AGTGTGTTC CATTCCATCA
 1561 CGGTTTTGGA ATGTTTACTA CACTCGGATA TTTGATATGT GGATTTTCGAG TCGTCTTAAT
 1621 GTATAGATTT GAAGAAGAGC TGTTTTTACG ATCCCTTCAG GATTACAAAA TTCAAAGTGC
 1681 GTTGCTAGTA CCAACCCAT TTTTATTCTT CGCCAAAAGC ACTCTGATTG ACAAATACGA
 1741 TTTATCTAAT TTACACGAAA TTGCTTCTGG GGGCGCACCT CTTTCGAAAG AAGTCGGGGA
 1801 AGCGGTTGCA AAACGCTTCC ATCTTCCAGG GATACGACAA BanII GGATATGGGC TCACTGAGAC
 1861 TACATCAGCT ATTCTGATTA CACCCGAGGG GGATGATAAA CCGGGCGCGG TCGGTAAAGT
 1921 TGTTCCATTT TTTGAAGCGA AGGTTGTGGA TCTGGATACC GGGAAAACGC TGGGCGTTAA
 1981 TCAGAGAGGC GAATTATGTG TCAGAGGACC TATGATTATG TCCGGTTATG TAAACAATCC
 2041 GGAAGCGACC AACGCCTTGA TTGACAAGGA TGGATGGCTA CATTCTGGAG ACATAGCTTA
 2101 CTGGGACGAA GACGAACACT TCTTCATAGT TGACCGCTTG PacI AAGTCTTTAA TTAAATACAA
 2161 EcoRV AGGATATCAG GTGGCCCCCG CTGAATTGGA Clal ATCGATATTG TTACAACACC CCAACATCTT
 2221 CGACGCGGGC GTGGCAGGTC TTCCCGACGA SgrAI TGACGCCGGT GAACTTCCCG CCGCCGTTGT
 2281 TGTTTTGGAG CACGGAAAGA CGATGACGGA AAAAGAGATC GTGGATTACG TCGCCAGTCA
 2341 AGTAACAACC GCGAAAAAGT TGCGCGGAGG AGTTGTGTTT GTGGACGAAG TACCGAAAGG
 2401 TCTTACCGGA AAACCTGACG CAAGAAAAAT CAGAGAGATC EcoNI CTCATAAAGG CCAAGAAGGG
 2461 CGGAAAGTCC AAATTGTAAA ATGTAAGTGT ATTCAGCGAT GACGAAATTC TTAGCTATTG
 2521 TAATGACTCT AGAGGATCTT TGTAAGGAA CCTTACTTCT GTGGTGTGAC ATAATTGGAC
 2581 AAACCTACCTA CAGAGATTTA AAGCTCTAAG GTAAATATAA AATTTTTAAG TGTATAATGT
 2641 GTTAAACTAC TGATTCTAAT TGTTTGTGTA TTTTAGATTTC Van9II CAACCTATGG AACTGATGAA
 2701 TGGGAGCAGT GGTGGAATGC CTTTAATGAG GAAAACCTGT TTTGCTCAGA AGAAATGCCA
 2761 TCTAGTGATG ATGAGGCTAC TGCTGACTCT CAACATTCTA CTCCTCCAAA AAAGAAGAGA

2821 AAGGTAGAAG ACCCCAAGGA CTTTCCTTCA GAATTGCTAA GTTTTTTGAG TCATGCTGTG
 2881 TTTAGTAATA GAACTCTTGC TTGCTTTGCT ATTTACACCA CAAAGGAAAA BsgI
 AGCTGCACTG
 2941 CTATACAAGA AAATTATGGA AAAATATTCT GTAACCTTTA TAAGTAGGCA TAACAGTTAT
 3001 AATCATAACA TACTGTTTTT TCTTACTCCA CACAGGCATA GAGTGTCTGC TATTAATAAC
 3061 TATGCTCAAA AATTGTGTAC CTTTAGCTTT TTAATTTGTA AAGGGGTAA TAAGGAATAT
 3121 TTGATGTATA GTGCCCTGAC BsaBI
 TAGAGATCAT AATCAGCCAT ACCACATTTG TAGAGGTTTT
 3181 ACTTGCTTTA AAAAACCTCC CACACCTCCC CCTGAACCTG AAACATAAAA TGAATGCAAT
 3241 HpaI
 TGTGTGTGTT AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA ATAGCATCAC
 3301 AAATTCACA AATAAAGCAT TTTTTTCACT GCATTCTAGT TGTGGTTTGT CCAAACTCAT
 3361 XmaI
SmaI
BamHI SanDI
 CAATGTATCT TATCATGTCT GGATCCCCGG GTCCCTATAG TGAGTCGTAT TAGCTTGGCG
 3421 TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC CGCTCACAAT TCCACACAAC
 3481 ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGTGCCT AATGAGTGAG CTAACTCACA
 3541 TTAATTGCGT TGCGCTCACT GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA ACCTGTCGTG CCAGCTGCAT
 3601 TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GGTTCGCGTA TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC
 3661 TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCGTT CGGCTGCGGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA
 3721 AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA
 3781 AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCGT TGCTGGCGTT TTTCCATAGG
 3841 CTCCGCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA GTCAGAGGTG GCGAAACCCG
 3901 ACAGGACTAT AAAGATACCA GCGTTCCTCC CCTGGAAGCT CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT
 3961 CCGACCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTCTCC CTTCGGGAAG CGTGGCGCTT
 4021 TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC
 4081 TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT
 4141 GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG AlwNI
 CAGCCACTGG TAACAGGATT
 4201 AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCTTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC

4261 TACTACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA
 4321 AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAACAA ACCACCGCTG GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT
 4381 TGCAAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAAA GGATCTCAAG AAGATCCTTT GATCTTTTCT
 4441 ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC TCACGTTAAG GGATTTTGGT CATGAGATTA
 4501 TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT GAAGTTTAA ATCAATCTAA
 4561 AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC
 4621 TCAGCGATCT GTCTATTTTCG TTCATCCATA GTTGCCTGAC AhdI TCCCCGTCGT GTAGATAACT
 4681 ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA BsaI TGATACCGCG AGACCCACGC
 4741 TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT
 4801 GGTCCGTCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAATT GTTGCCGGA AGCTAGAGTA
 4861 AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTGCCA TTGCTACAGG CATCGTGGTG
 4921 TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTT CCCAACGATC AAGGCGAGTT
 4981 ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAAGCG GTTAGCTCCT TCGGTCCCTC GATCGTTGTC
 5041 AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT GTTATCACTC ATGGTTATGG CAGCACTGCA TAATTCTCTT
 5101 ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG ScaI AGTACTCAAC CAAGTCATTC
 5161 TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG CGTCAATACG GGATAATACC
 5221 GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTTGAA XmnI AACGTTCTTC GGGGCGAAAA
 5281 CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT AACCCACTCG TGCACCCAAC
 5341 TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC GTTCTGGGT GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA
 5401 AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCCTT
 5461 TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA
 5521 TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT TTCCCCGAAA AGTGCCACCT
 5581 GACGTCTAAG AAACCATTAT TATCATGACA TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACGAGG
 5641 CCCTTTCGTC TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG
 5701 GAGACGGTCA CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCC TCAGGGCGCG

5761 TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA
5821 CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC
5881 ATCAGGCGCC ATTCGCCATT CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC
5941 TCTTCGCTAT TACGCCAGCT GGCGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGGCGATT AAGTTGGGTA
6001 ACGCCAGGGT TTTCCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGAATT TCGACCTGCA
6061 GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
6121 TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC
6181 CCCGCCCTTT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC
6241 ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AACTGCCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT
6301 ATCATATGCC AAGTACGCCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
6361 ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTIONGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
6421 TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGTA TAGCGGTTTG
6481 ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGTACC
6541 AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG
6601 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGTTTAGT GAACCGTCAG AA

```
CAT          GCATGC-ATAGATCCGGCGAATTTCTGCCATTCA----- 33
LUZr.      AACTGCCTGCGTCAGATTCTCGCATGCCAGAGATCC----TATTTTTGGCAATCAAATCA 1136

CAT      -TCCGCTTATT----- 43
LUZr.    TTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTTGTTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTTACTA 1196
```

Sequenzvergleich der Reportergene. Der komplementäre nichtcodogene Nukleotidstrang des Luziferasegens wird vom 5'-Ende her mit dem 5'-Ende des codogenen Nukleotidstranges des CAT-Gens verglichen. Die Nukleotidsequenz des CAT-Gens (Position 1 - 43) ist partiell mit einer Nukleotidabfolge im mittleren Teil der Luziferasesequenz (Position 1136 – 1196) vergleichbar .

7 Literatur

- Abramson, R. D.**, Dever, T. E., Lawson, T. G., Ray, B. K., Thach, R. E. & Merrick, W. C. (1987). The ATP-dependent interaction of eukaryotic initiation factors with mRNA. *J. Biol. Chem.* **262**:3826-3832.
- Ali, N. & Siddiqui, A.** (1995). Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J. Virol.* **69**:6367-6375.
- Allen, M. L.**, Metz, A. M., Timmer, R. T., Rhoads, R. E. & Browning, K. S. (1992). Isolation and sequence of the cDNAs encoding the subunits of the isozyme form of wheat protein synthesis initiation factor 4F. *J. Biol. Chem.* **267**:23232-23236.
- Alonso, M. A. & Carrasco, L.** (1981). Reversion by hypotonic medium of the shutoff of protein synthesis induced by encephalomyocarditis virus. *J. Virol.* **37**:535-540.
- Andino, R.**, Rieckhof, G. E., Achacoso, P. L. & Baltimore, D. (1993). Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J.* **12**:3587-3598.
- Andrade, M. A. & Borg, P.**, (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat. Genet.* **11**:115-116.
- Aragon, T.**, de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortin, J., Nieto, A. (2000). Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol* **20**:6259-6268.
- Baglioni, C.**, Simili, M. & Shafritz, D. A. (1978). Initiation activity of EMC virus RNA, binding to initiation factor eIF-4B and shut-off of host cell protein synthesis. *Nature* **275**:240-243.
- Battiste, J. L.**, Pestova, T. V., Hellen, C. U., Wagner, G. (2000). The eIF1A solution structure reveals a large RNA-binding surface important for scanning function. *Mol Cell* **5**:109-119.
- Beck, E.**, Forss, S., Strebel, K., Cattaneo, R. & Feil, G. (1983). Structure of the FMDV translation initiation site and of the structural proteins. *Nucleic Acids Res.* **11**:7873-7885.
- Beck, E., and K. Strohmaier.** (1987). Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.* **61**:1621-9.
- Belsham, G. J.** (1992). Dual initiation sites of protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA are selected following internal entry and scanning of ribosomes in vivo. *EMBO J.* **11**:1105-1110.
- Belsham, G. J. & Jackson, R. J.** (2000). Translation initiation on picornavirus RNA. In *Translational control of gene expression*, pp. 869-900. Edited by N. Sonenberg, J. W. B. Hershey & M. B. Mathews. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Benne, R. & Hershey, J. W.** (1978). The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **253**:3078-3087.
- Bernstein, H. D.**, N. Sonenberg, and D. Baltimore. 1985. Poliovirus mutant that does not selectively inhibit host cell protein synthesis. *Mol Cell Biol.* **5**:2913-23.
- Bernstein, H. D.**, Sarnow, P. & Baltimore, D. (1986). Genetic complementation among poliovirus mutants derived from an infectious cDNA clone. *J. Virol.* **60**:1040-1049.

- Borman, A.**, Howell, M. T., Patton, J. G. & Jackson, R. J. (1993). The involvement of a spliceosome component in internal initiation of human rhinovirus RNA translation. *J. Gen. Virol.* **74**:1775-1788.
- Borman, A. M. & Kean, K. M.** (1997). Intact eukaryotic initiation factor 4G is required for hepatitis A virus internal initiation of translation. *Virology* **237**:129-136.
- Borman, A. M.**, P. Le Mercier, M. Girard, and K. M. Kean. (1997a). Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res.* **25**:925-32.
- Borman, A. M.**, R. Kirchweger, E. Ziegler, R. E. Rhoads, T. Skern, and K. M. Kean. (1997b). eIF4G and its proteolytic cleavage products: Effect on initiation of protein synthesis from capped, uncapped and IRES-containing mRNAs. *RNA*. **3**:183-96.
- Bradley, C. A.**, Padovan, J. C., Thomson, T. L., Benoit, C. A., Chaint, B. T., Rhoads, R. E. (2002). Mass spectrometric analysis of the N terminus of translation initiation factor eIF4G-1 reveals novel isoforms. *J. Biol. Chem.* **277**:12559-12571
- Buratti, E.**, Tisminetzky, S., Zotti, M. & Baralle, F. E. (1998). Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3. *Nucleic Acids Res.* **26**:3179-3187.
- Bushell, M.**, McKendrick, L., Janicke, R.U., Clemens, M. J., Morley, S. J.(1999). Caspase-3 is necessary and sufficient for cleavage of protein synthesis eukaryotic initiation factor 4G during apoptosis. *FEBS Lett.* **451**:332-336.
- Byrd, M. P.**, Zamora, M., Lloyd, R. E. (2002). Generation of multiple isoforms of eukaryotic translation initiation factor 4GI by using of alternate translation initiation codons. *Mol. Cell. Biol.* **22**:4499-4511.
- Cao, X.**, I. E. Bergmann, R. Füllkrug, and E. Beck. 1995. Functional analysis of the two alternative translation initiation sites of foot-and-mouth disease virus. *J Virol.* **69**:560-3.
- Carrasco, L. & Smith, A.E.** (1976). Sodium ions and the shut-off of host cell protein synthesis by picornaviruses. *Nature* **264**:807-809.
- Cigan, A. M.**, L. Feng, and T. F. Donahue. (1988a). tRNAⁱ(met) functions in directing the scanning ribosome to the start site of translation. *Science.* **242**:93-7.
- Cigan, A. M.**, E. K. Pabich, and T. F. Donahue. (1988b). Mutational analysis of the HIS4 translational initiator region in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **8**:2964-75.
- Clemens, M. J.**, Bushell, M., Morley, S. J. (1998). Degradation of eukaryotic polypeptide chain initiation factor (eIF) 4G in response to induction of apoptosis in human lymphoma cell lines. *Oncogene Dec* **17**:2921-2931.
- Craig, A. W., De Gregorio, E.**, E. Preiss, and M. H. Hentze. (1999). Translation driven by an eIF4G core domain in vivo. *EMBO J.* **18**:4865-74.
- Ehrenfeld, E. & Semler, B. L.** (1995). Anatomy of the poliovirus internal ribosome entry site. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **203**:65-83.
- Ehrenfeld, E.** 1996. Initiation of translation by picornavirus RNAs, p. 549-572. In M. B. M. J.W.B. Hershey, and N. Sonenberg (ed.), Translational control. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Etchison, D.**, Milburn, S. C., Edery, I., Sonenberg, N. & Hershey, J. W. (1982). Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton

- polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J. Biol. Chem.* **257**:14806-14810.
- Evdokimova, V.**, Ruzanov, P., Imataka, H., Raught, B., Svitkin, Y., Ovchinnikov, L. P., Sonenberg, N. (2001). The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *EMBO J* **20**:5491-5502.
- Flanegan, J. B.**, R. F. Pettersson, V. Amborse, M. J. Hewlett, and Baltimore. (1977). Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of the viron and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc Natl Sci USA* **74**: 961-965.
- Fletcher, C. M.**, Pestova, T. V., Hellen, C. U. T., Wagner, G. (1999). Structure and interactions of the translation initiation factor eIF1. *EMBO J* **18**:2631-2637.
- Follet, E. A. C.**, C. R. Pringle, and T. H. Pennington. 1975. Virus development in enucleate cells: Echovirus, poliovirus, pseudorabies virus, reovirus, respiratory syncytial virus and Semliki forest virus. *J Gen Virol.* **26**:183-96.
- Forss, S.**, K. Strebel, E. Beck, and H. Schaller. (1984). Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.* **12**:6587-601.
- Fukushi, S.**, Kurihara, C., Ishiyama, N., Hoshino, F. B., Oya, A., Katayama, K. (1997). The sequence element of the internal ribosome entry site and a 25-kilodalton cellular protein contribute to efficient internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* **71**:1662-1666.
- Fukushi, S.**, Okada, M., Kageyama, T., Hoshino, F. B., Katayama, K. (1999). Specific interaction of a 25-kilodalton cellular protein, a 40S ribosomal subunit protein, with the internal ribosome entry site of hepatitis C virus genome. *Virus Genes* **19**:153-161.
- Gallie, D. R.** (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* **5**:2108-16.
- Garçia-Blanco, M. A.**, Jamison, S. F. & Sharp, P. A. (1989). Identification and purification of a 62,000-dalton protein that binds specifically to the polypyrimidine tract of introns. *Genes Dev.* **3**:1874-1886.
- Gil, A.**, Sharp, P. A., Jamison, S. F. & Garçia-Blanco, M. A. (1991). Characterization of cDNAs encoding the polypyrimidine tract-binding protein. *Genes Dev.* **5**:1224-1236.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **93**:5578-5583.
- Goke, A.**, Goke, R., Knolle, A., Trusheim, H., Schmidt, H., Wilmen, A., Carmody, R., Goke, B., Chen, Y. H. (2002). DUG is a novel homologue of translation initiation factor 4G that binds eIF4A. *Biochem Biophys Res Commun* **297**:78-82.
- Golini, F.**, Thach, S., Lawrence, C. & Thach, R. (1976). Regulation of protein synthesis in EMC virus infected cells. pp. 717-34. In: Baltimore D, et al., ed. *Animal virology. New York, Academic Press* **4**.
- Goumans, H.**, Thomas, A., Verhoeven, A., Voorma, H. O. & Benne, R. (1980). The role of eIF-4C in protein synthesis initiation complex formation. *Biochim. Biophys. Acta* **608**:39-46.
- Goyer, C.**, Altmann, M., Lee, H. S., Blanc, A., Deshmukh, M., Woolford, J. L., Jr., Trachsel, H. & Sonenberg, N. (1993). TIF4631 and TIF4632: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition motif-like sequence and carry out an essential function. *Mol. Cell. Biol.* **13**:4860-4874.

- Gradi, A.,** Imataka, H., Svitkin, Y. V., Rom, E., Raught, B., Morino, S. & Sonenberg, N. (1998). A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol. Cell. Biol.* **18**:334-342.
- Grifo, J. A.,** Tahara, S. M., Morgan, M. A., Shatkin A. J. and W. C. Merrick. (1983). New initiation factor activity required for globin mRNA translation. *J Biol Chem.* **258**:5804-10.
- Gunnery, S. & Mathews, M. B.** (1995). Functional mRNA can be generated by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* **15**:3597-3607.
- Haghighat, A.,** Svitkin, Y., Novoa, I., Kuechler, E., Skern, T., Sonenberg, N. (1996). The eIF4G-eIF4E complex is the target for direct cleavage by the rhinovirus 2A proteinase. *J. Virol.* **70**:8444-8450.
- Han, B. & Zhang, J. T.** (2002). Regulation of gene expression by internal ribosome entry sites or cryptic promoters: the eIF4G story. *MCB* **22**:7372-7384.
- Hanecak, R.,** Semler, B. L., Anderson, C. W. & Wimmer, E. (1982). Proteolytic processing of poliovirus polypeptides: antibodies to polypeptide P3-7c inhibit cleavage at glutamine-glycine pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:3973-3977.
- Hellen, C. U.,** Pestova, T. V., Litterst, M. & Wimmer, E. (1994). The cellular polypeptide p57 (pyrimidine tract-binding protein) binds to multiple sites in the poliovirus 5' nontranslated region. *J. Virol.* **68**:941-950.
- Hentze, M. W.** (1997). eIF4G: a multipurpose ribosome adapter? *Science* **275**:500-501.
- Hershey, J. W. B., & Merrick W. C.** (2000). The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In N. Sonenberg and J. W. B. Hershey and M. B. Mathews (ed.), *Translational control of gene expression*. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Huang, J.T.,** Schneider, R.J. (1991). Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein. *Cell* **65**:271-280.
- Iizuka, N.,** L. Najita, A. Franzusoff, and P. Sarnow. (1994). Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **14**:7322-30.
- Imataka, H. & Sonenberg, N.** (1997). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 6940-6947
- Imataka H,** Gradi A, Sonenberg N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J* **17**:7480-7489.
- Jackson, R. J.** (1991). Potassium salts influence the fidelity of mRNA translation initiation in rabbit reticulocyte lysates: unique features of encephalomyocarditis virus RNA translation. *Biochim Biophys Acta.* **26**:345-58.
- Jackson, R. J.,** Hunt, S. L., Gibbs, C. L. Gibbs, Kaminski, A. (1994). Internal initiation of translation of picornavirus RNAs. *Mol Biol Rep.* **19**:147-59.
- Jackson, R. J. & Kaminski, A.** (1995). Internal initiation of translation in eukaryotes: the picornavirus paradigm and beyond. *RNA* **1**: 985-1000.
- Jang, S. K. & Wimmer, E.** (1990). Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry *Genes Dev.* **4**:1560-1572.

- Kaminski, A.,** Howell, M. T. & Jackson, R. J. (1990). Initiation of encephalomyocarditis virus RNA translation: the authentic initiation site is not selected by a scanning mechanism. *EMBO J.* **9**:3753-3759.
- Kaminski, A.,** Belsham, G. J. & Jackson, R. J. (1994). Translation of encephalomyocarditis virus RNA: parameters influencing the selection of the internal initiation site. *EMBO J.* **13**:1673-1681.
- Keiper, B. D. & Rhoads, R. E.** (1997). Cap-independent translation initiation in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res.* **25**:395-402.
- Keiper, B.D. & Rhoads, R. E.** (1999). Translational recruitment of *Xenopus* maternal mRNAs in response to poly(A) elongation requires initiation factor eIF4G-1. *Dev Biol* **206**:1-14.
- Kirchweger, R.,** E. Ziegler, B. J. Lamphear, D. Waters, H. D. Liebig, W. Sommergruber, F. Sobrino, C. Hohenadl, D. Blaas, R. E. Rhoads, and et al. (1994). Foot-and-mouth disease virus leader proteinase: purification of the Lb form and determination of its cleavage site on eIF-4 gamma. *J Virol.* **68**:5677-84.
- Knippers, R.** (2001). Molekulare Genetik. 8. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- 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. *J. Biol. Chem.* **273**:18599-18604.
- Kolupaeva, V.G.,** Lomakin, I.B., Pestova, T.V., Hellen, C.U. (2003). Eukaryotic initiation factors 4G and 4A mediate conformational changes downstream of the initiation codon of the encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site. *Mol Cell Biol* **23**:687-698.
- Kozak, M.** (1989). Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Mol. Cell. Biol.* **9**:5073-5080.
- Krausslich, H. G.,** Nicklin, M. J., Toyoda, H., Etchison, D. & Wimmer, E. (1987). Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J. Virol.* **61**:2711-2718.
- Kuhn, R. J. & Wimmer, E.** (1987). The replication of picornaviruses. In A. M. M. D.J. Rowlands, and B.W.J. Mahy (ed.), The molekular biology of the positive strand RNA viruses. Academic Press Inc, London.
- 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. *J Biol Chem* **268**:19200-19203.
- Lamphear, B. J., Kirchweger, R., Skern, T. & Rhoads, R. E.** (1995). Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J. Biol. Chem.* **270**:21975-21983.
- Levy-Strumpf, N.,** Deiss, L. P., Berissi, H., Kimmich, A. (1997). DAP-5, a novel homolog of eukaryotic translation initiation factor 4G isolated as aputativ modulator of gamma interferon-induced programmed cell death. *Mol. Cell. Biol.* **17**:1615-1625.
- Lawson, T. G.,** Lee, K. A., Maimone, M. M., Abramson, R. D., Dever, T. E., Merrick, W. C. & Thach, R. E. (1989). Dissociation of double-stranded polynucleotide helical structures by eukaryotic initiation factors, as revealed by a novel assay. *Biochemistry* **28**:4729-4734.

- Le, S. Y.,** Sonenberg, N., Maizel, J. V., Jr. (1995). Unusual folding regions and ribosome landing pad within hepatitis C virus and pestivirus RNAs. *Gene* **154**:137-143.
- Li, J. P. & D. Baltimore.** (1988). Isolation of poliovirus 2C mutants defective in viral RNA synthesis. *J. Virol.* **62**: 4016-21.
- Lin, C. H., & Patton, J. G.** (1995). Regulation of alternative 3' splice site selection by constitutive splicing factors. *RNA.* **1**:234-45.
- Lloyd, R. E.,** M. J. Grubman, and E. Ehrenfeld. (1988). Relationship of p220 cleavage during picornavirus infection to 2A proteinase sequencing. *J Virol.* **62**:4216-23.
- Loeffler, F. & Frosch, P.** (1964). Report of the commission for research on foot-and-mouth disease virus. *Zentrabl. Bacteriol. Parasi. Infec. Krankh.* **23**: 371-391.
- Lopez de Quinto S. & Martinez-Salas E.** (1999). Involvement of the aphthovirus RNA region located between the two functional AUGs in start codon selection. *Virology* **255**:324-336.
- Lopez de Quinto, S. & Martinez-Salas, E.** (2000). Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *RNA* **6**:1380-1392.
- Lopez de Quinto, S. E.,** Lafuente, Martinez-Salas, E. (2001). IRES Interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4G. *RNA* **7**:1213-1226.
- Luz, N. & Beck, E.** (1990). A cellular 57 kDa protein binds to two regions of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *FEBS Lett.* **269**:311-314.
- Luz, N. & Beck, E.** (1991). Interaction of a cellular 57-kilodalton protein with the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **65**:6486-6494.
- Macejak, D. G. & Sarnow, P.** (1991). Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* **353** :90-94.
- Mader, S.,** H. Lee, A. Pause, and N. Sonenberg. (1995). The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol.* **15**:4990-7.
- Marissen, W. E. & Lloyd, R. E.** (1998). Eukaryotic translation initiation factor 4G is targeted for proteolytic cleavage by capase 3 during inhibition of translation in apoptotic cells. *Mol. Cell. Biol.* **18**:7565-7574.
- Meerovitch, K.,** Svitkin, Y. V., Lee, H. S., Lejbkowitz, F., Kenan, D. J., Chan, E. K., Agol, V. I., Keene, J. D. & Sonenberg, N. (1993). La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J. Virol.* **67**:3798-3807.
- Merrick, W.C.** (1992). Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev.* **56**:291-315.
- Méthot, N.,** Pause, A., Hershey, J. W. & Sonenberg, N. (1994). The translation initiation factor eIF-4B contains an RNA-binding region that is distinct and independent from its ribonucleoprotein consensus sequence. *Mol. Cell. Biol.* **14**:2307-2316.
- Méthot, N.,** Song, M. S. & Sonenberg, N. (1996a). A region rich in aspartic acid, arginine, tyrosine, and glycine (DRYG) mediates eukaryotic initiation factor 4B (eIF4B) self-association and interaction with eIF3. *Mol. Cell. Biol.* **16**:5328-5334.

- Méthot, N.**, Pickett, G., Keene, J. D. & Sonenberg, N. (1996b). In vitro RNA selection identifies RNA ligands that specifically bind to eukaryotic translation initiation factor 4B: the role of the RNA recognition motif. *RNA* **2**:38-50.
- Meyer, K.**, Petersen, A., Niepmann, M. & Beck, E. (1995). Interaction of eukaryotic initiation factor eIF-4B with a picornavirus internal translation initiation site. *J. Virol.* **69**:2819-2824.
- Milburn, S. C.**, Hershey, J. W., Davies, M. V., Kelleher, K. & Kaufman, R. J. (1990). Cloning and expression of eukaryotic initiation factor 4B cDNA: sequence determination identifies a common RNA recognition motif. *EMBO J.* **9**:2783-2790.
- Naranda, T.**, Strong, W. B., Menaya, J., Fabbri, B. J. & Hershey, J. W. (1994). Two structural domains of initiation factor eIF-4B are involved in binding to RNA. *J. Biol. Chem.* **269**:14465-14472.
- Nekrasov, M. P.**, Ivshina, M. P., Chernov, K. G., Kovrigina, E. A., Evdokimova, V. M., Thomas, A. A., Hershey, J. W., Ovchinnikov, L. P. (2003). The mRNA-binding Protein YB-1 (p50) Prevents Association of the Eukaryotic Initiation Factor eIF4G with mRNA and Inhibits Protein Synthesis at the Initiation Stage. *J Biol Chem* **278**:13936-13943.
- Niepmann, M.** (1999). Internal initiation of translation of picornaviruses, hepatitis C virus and pestiviruses. *Recent Res. Devel. Virol.* **1**:229-250.
- Niepmann M.** (2003). Effects of potassium and chloride on ribosome association with the RNA of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* **93**:71-78.
- Ochs, K.**, Rust, R. C. & Niepmann, M. (1999). Translation initiation factor eIF4B interacts with a picornavirus internal ribosome entry site in both 48S and 80S initiation complexes independently of initiator AUG location. *J. Virol.* **73**:7505-7514.
- Ochs, K.**, Saleh, L., Bassili, G., Sonntag, V. H., Zeller, A., Niepmann, M. (2002). Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus internal ribosome entry site. *J Virol* **76**:2113-2122.
- Ochs, K.**, Zeller, A., Saleh, L., Bassili, G., Song, Y., Sonntag, A., Niepmann, M. (2003). Impaired binding of standard initiation factors mediates poliovirus translation attenuation. *J Virol* **77**:115-122.
- Ohlmann, T.**, Rau, M., Pain, V. M. & Morley, S. J. (1996). The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *EMBO J.* **15**:1371-1382.
- Ohlmann, T.**, Pain, V. M., Wood, W., Rau, M., Morley, S. J. (1997). The proteolytic cleavage of eukaryotic initiation factor (eIF) 4G is prevented by eIF4E binding protein (PHAS-I; 4E-BP1) in the reticulocyte lysate. *EMBO J* **16**:844-855.
- Ohlmann, T. & Jackson, R. J.** (1999). The properties of chimeric picornavirus IRESes show that discrimination between internal translation initiation sites is influenced by the identity of the IRES and not just the context of the AUG codon. *RNA* **5**:764-778.
- Ohlmann T.**, Prevot, D., Decimo, D., Roux, F., Garin, J., Morley, S. J., Darlix, J.L. (2002). In vitro cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system. *J Mol Biol* **318**:9-20.
- Pain, V. M.** (1996). Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* **236**:747-771.
- Palmer, T. D.**, Miller, A. D., Reeder, R. H. & McStay, B. (1993). Efficient expression of a protein coding gene under the control of an RNA polymerase I promoter. *Nucleic Acids Res.* **21**:3451-3457.

- Patton, J. G.,** Mayer, S. A., Tempst, P. & Nadal Ginard, B. (1991). Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* **5**:1237-1251.
- Pause, A.,** Méthot, N., Sonenberg, N. (1993). The HRIGRXXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol Cell Biol* **13**:6789-6798.
- Pause, A.,** Méthot, N., Svitkin, Y., Merrick, W. C. & Sonenberg, N. (1994). Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *EMBO J.* **13**:1205-1215.
- Pelham, H. & Jackson, R.** (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* **67**:247.
- Pestova, T. V.,** Hellen, C. U. and E. Wimmer. (1994). A conserved AUG triplet in the 5' nontranslated region of poliovirus can function as an initiation codon in vitro and in vivo. *Virology.* **204**:729-37.
- Pestova, T. V.,** Hellen, C. U. & Shatsky, I. N. (1996a). Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol. Cell. Biol.* **16**:6859-6869.
- Pestova, T. V.,** Shatsky, I. N. & Hellen, C. U. (1996b). Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Mol. Cell. Biol.* **16**:6870-6878.
- Pestova, T. V.,** Borukhov, S. I. & Hellen, C. U. T. (1998). Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* **394**:854-859.
- Pestova, T. V.,** Lomakin, I. B., Lee, J. H., Choi, S. K., Dever, T. E. & Hellen, C. U. (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* **403**:332-335.
- Peterson, D. T.,** W. C. Merrick, and B. Safer. (1979) Binding and release of radiolabeled eukaryotic initiation factors 2 and 3 during 80 S initiation complex formation. *J Biol Chem.* **254**:2509-16.
- Pilipenko, E. V.,** Blinov, V. M., Chernov, B. K., Dmitrieva, T. M. & Agol, V. I. (1989a). Conservation of the secondary structure elements of the 5'-untranslated region of cardio- and aphthovirus RNAs. *Nucleic Acids Res.* **17**:5701-5711.
- Pilipenko, E. V.,** Blinov, V. M., Romanova, L. I., Sinyakov, A. N., Maslova, S. V. & Agol, V. I. (1989b). Conserved structural domains in the 5'-untranslated region of picornaviral genomes: an analysis of the segment controlling translation and neurovirulence. *Virology* **168**:201-209.
- Pilipenko, E. V.,** Maslova S. V. , Sinyakov, A. N. and Agol, V. I. (1992). Towards identification of cis-acting elements involved in the replication of enterovirus and rhinovirus RNAs: a proposal for the existence of tRNA-like terminal structures. *Nucleic Acids Res.* **20**:1739-45.
- Pilipenko, E. V.,** Gmyl, A. P., Maslova, S. V., Belov, G. A., Sinyakov, A. N., Huang, M., Brown, T. D. & Agol, V. I. (1994). Starting window, a distinct element in the cap-independent internal initiation of translation on picornaviral RNA. *J. Mol. Biol.* **241**:398-414.
- 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 Dev.* **14**:2028-2045.
- Piron, M.,** Vende, P., Cohen, J. & Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *Embo Journal. Oct* **17**:5811-5821.

- Prévôt, D.**, Darlix, J. L., Ohlmann, T. (2003). Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol. Cell* **95**: 141-156.
- Pyronnet, S.**, Imataka, H., Gingras, A. C., Fukunaga, R., Hunter, T. & Sonenberg, N. (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J.* **18**:270-279.
- Ray, B. K.**, Lawson, T. G. Kramer, J. C., Cladaras, M. H., Grifo, J. A., Abramson, R. D., Merrick, W. C. and R. E. Thach. (1985). ATP-dependent unwinding of messenger RNA structure by eukaryotic initiation factors. *J Biol Chem.* **260**:7651-8.
- Rogers, G. W.**, Richter, N. J. & Merrick, W. C. (1999). Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *J. Biol. Chem.* **274**:12236-12244.
- Rueckert, R. R.** (1996). Picornaviridae: the viruses and their replication. In *Virology*, 3 edn. Edited by B. N. Fields, Knipe, D. M., Howley, P. M. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publ.
- Rozen, F.**, Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T. E., Merrick, W. C. & Sonenberg, N. (1990). Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol. Cell. Biol.* **10**:1134-1144.
- Rust, R. C.**, Ochs, K., Meyer, K., Beck, E. & Niepmann, M. (1999). Interaction of eukaryotic initiation factor eIF4B with the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus is independent of the polypyrimidine tract-binding protein. *J. Virol.* **73**:6111-6113.
- Saleh, L.**, Rust, R. C., Füllkrug, R., Beck, E., Bassili, G., Ochs, K. & Niepmann, M. (2001). Functional interaction of translation initiation factor eIF4G with the foot-and-mouth-disease virus internal ribosome entry site. *J. Gen. Virol.* **82**:757-763.
- Saleh, L.** 2002. Ph.D. thesis. University of Giessen, Germany.
- Sangar, D. V.**, Newton, S. E., Rowlands, D. J. & Clarke, B. E. (1987). All foot and mouth disease virus serotypes initiate protein synthesis at two separate AUGs. *Nucleic Acids Res.* **15**:3305-3315.
- Scheper, G. C.**, Voorma, H. O. & Thomas, A. A. (1994). Basepairing with 18S ribosomal RNA in internal initiation of translation. *FEBS Lett.* **352**:271-275.
- Schultz, D. E.**, Hardin, C. C. & Lemon, S. M. (1996). Specific interaction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the 5'-nontranslated RNA of hepatitis A virus. *J. Biol. Chem.* **271**:14134-14142.
- 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. Edited by S. Y. Wang. New York, San Francisco, London: Academic Press.
- Sonenberg, N.**, M. A. Morgan, W. C. Merrick, and A. J. Shatkin. (1978). A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* **75**:4843-4847.
- Svitkin, Y. V.**, Ovchinnikov, L. P., Dreyfuss, G., Sonenberg, N. (1996). General RNA binding proteins render translation cap dependent. *EMBO J* **15**:7147-7155.
- Sizova, D. V.**, Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V., Shatsky, I. N. & Hellen, C. U. (1998). Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J. Virol.* **72**:4775-4782.

- Thomas, A.,** Goumans, H., Amesz, H., Benne, R., Voorma, H. O. (1997). A comparison of the initiation factors of eukaryotic protein synthesis from ribosomes and from the postribosomal supernatant. *Eur. J. Biochem.* **98**:329-337.
- Vagner, S.,** Gensac, M. C., Maret, A., Bayard, F., Amalric, F., Prats, H. & Prats, A. C. (1995). Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol. Cell. Biol.* **15**:35-44.
- Valcárcel, J. & Gebauer, F.** (1997). Post-transcriptional regulation: the dawn of PTB. *Curr. Biol.* **7**:705-708.
- van Heugten, H. A.,** A. A. Thomas, and H. O. Voorma. (1992). Interaction of protein synthesis initiation factors with the mRNA cap structure. *Biochimie.* **74**:463-75.
- Ventoso, I.,** Blanco, R., Perales, C., Carrasco, L. (2001). HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **23**:23.
- Wahle, E.** (1995). Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. *J Biol Chem.* **270**:2800-8.
- Weber, L. A.,** Hickey, E. D., Maroney, P. A., Baglioni, C. (1977). Inhibition of protein synthesis by Cl. *J Biol Chem* **252**:4007-4010.
- Wells, S. E.,** P. E. Hillner, R. D. Vale, and A. B. Sachs. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell.* **2**:135-40.
- Yamanaka S.,** Poksay K. S., Arnold, K. S., Innerarity, T. L. (1997). A novel translational repressor mRNA is edited extensively in livers containing tumors caused by the transgene expression of the apoB RNA-editing enzyme. *Genes Dev* **11**:321-333.
- Yan, R.,** Rychlik, W., Etchison, D. & Rhoads, R. E. (1992). Amino acid sequence of the human protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma. *J. Biol. Chem.* **267**:23226-23231.
- Yan, R. & Rhoads, R. E.** (1995). Human protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma is encoded by a single gene (EIF4G) that maps to chromosome 3q27-qter. *Genomics* **26**:394-398.
- Zhang, Y.,** Feigenblum, D., Schneider, R. J. (1994). Adenovirus factor induces eIF-4E dephosphorylation and inhibition of cell protein synthesis. *J. Virol.* **68**:7040-7050.

Publikationen

Erstautor-Publikationen

Bassili, G., Tzima, E., Song, Y., Saleh, L., Ochs, K., Niepmann, M. 2003

A highly conserved sequence element of the foot- and mouth-disease virus internal ribosome entry site is essential for interaction with eIF4G and for translation.

Eingereicht bei Journal of Virology

Koautor-Publikationen

• Mauerer, W., G. Bassili, R. Arnold, R. Renkawitz, and J. T. Epplen. 1999. The (gt)n(ga)m containing intron 2 of HLA-DRB alleles binds a zinc-dependent protein and forms non B-DNA structures. *Gene* **226**:9-23.

• Mauerer, W., G. Bassili, C. Epplen, H. G. Keyl, and J. T. Epplen. 1999. Protein binding to simple repetitive sequences depends on DNA secondary structure(s). *Chromosome Res* **7**:163-166.

• Arnold, R., W. Mauerer, G. Bassili, M. Lutz, L. Burke, T. J. Epplen, and R. Renkawitz. 2000. The insulator protein CTCF represses transcription on binding to the (gt)(22)(ga)(15) microsatellite in intron 2 of the HLA-DRB1(*)0401 gene. *Gene* **253**:209-214.

• Mauerer, W., Bassili, G., Hart, C., Kkeyl, H.G., Epplen, J.T. 2001

A complex containing at least one zinc dependent HeLa protein binds to the intronic(gaa)(n) block of the frataxine gene. *Gene* **270** (1-2):131-43

• Saleh, L., R. C. Rust, R. Füllkrug, E. Beck, G. Bassili, K. Ochs, and M. Niepmann. 2001. Functional interaction of translation initiation factor eIF4G with the foot-and-mouth-disease virus internal ribosome entry site. *J. Gen. Virol.* **82**:757-763.

• Ochs, K., Saleh, L., Bassili, G., Sonntag, V. H., Zeller, A., Niepmann, M. (2002). Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus internal ribosome entry site. *J Virol* **76**:2113-2122.

• Ochs, K., Zeller, A., Saleh, L., Bassili, G., Song, Y., Sonntag, A., Niepmann, M. (2003). Impaired binding of standard initiation factors mediates poliovirus translation attenuation. *J Virol* **77**:115-122.

Kongressbeiträge

• Ochs, K., G. Bassili, L. Saleh, and M. Niepmann. Interaction of eIF4B with the IRES of poliovirus. Meeting of Translational Control, September 2000, Cold Spring Harbor, New York, USA.

• Saleh, L., R. C. Rust, R. Füllkrug, E. Beck, G. Bassili, K. Ochs, and M. Niepmann. 2001. The RNA-ribosome adaptor: interaction of initiation factor eIF4G with the internal ribosome entry site of foot-and-mouth-disease virus, Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie, März 2001, Dresden.

• Ochs, K., G. Bassili, L. Saleh, and M. Niepmann. Interaction of eIF4B with the IRES of poliovirus. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie, März 2001, Dresden. (Erster Posterpreis)

• Bassili, G., Tzima, E., Song, Y., Saleh, L., Ochs, K., Niepmann, M. 2003, Berlin. A highly conserved sequence element of the foot- and mouth-disease virus internal ribosome entry site is essential for interaction with eIF4G and for translation.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit
selbständig durchgeführt und verfaßt und
keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel
verwendet zu haben.

Gießen im Dezember 2003